Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

DZIEDZINA: nauki medyczne i nauki o zdrowiu

DYSCYPLINA: nauki o zdrowiu

ROZPRAWA DOKTORSKA

Poszukiwanie markerów stłuszczeniowej choroby wątroby związanej z zaburzeniami metabolicznymi (MASLD)

Beata Zyśk

Promotor: prof. dr hab. n. med. Lucyna Ostrowska

Zakład Dietetyki i Żywienia Klinicznego

Wydział Nauk o Zdrowiu

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Rozprawa doktorska została zrealizowana w ramach kształcenia
w Szkole Doktorskiej UMB

Białystok, 2025

Medical University of Bialystok

FIELD OF SCIENCE: medical and health sciences

SCIENTIFIC DISCIPLINE: health sciences

DOCTORAL THESIS

In search for markers of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD)

Beata Zyśk

Supervisor: prof. Lucyna Ostrowska, M.D., PhD

Department of Dietetics and Clinical Nutrition

Faculty of Health Sciences

Medical University of Bialystok

The doctoral thesis was carried out as a part of education
at the Doctoral School of MUB

Bialystok, 2025

Składam najserdeczniejsze podziękowania

Pani prof. dr hab. n. med. Lucynie Ostrowskiej

za wprowadzenie w świat nauki i otwarcie nowych perspektyw rozwoju

oraz za nieocenioną pomoc merytoryczną, motywację do pracy i wiarę w moje możliwości

podczas wszystkich wyzwań związanych z realizacją tego projektu,

a także za całą dotychczasową współpracę – był to dla mnie zaszczyt i wielka przyjemność

Pragnę również podziękować moim najbliższym –

Rodzicom, bratu Adamowi oraz Kamilowi

za nieustanne wsparcie i bezgraniczną wiarę,

okazaną szczególnie w trudnych momentach

oraz towarzyszenie na każdym etapie mojego rozwoju naukowego

Spis treści

1. Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej 5
2. Spis stosowanych skrótów i oznaczeń.....6
3. Wprowadzenie.....8
4. Cel pracy z uzasadnieniem podjętej tematyki badawczej 13
5. Materiał i metody 14
5.1. Przegląd piśmiennictwa z zakresu tematyki pracy doktorskiej.....14
5.2. Materiał badawczy 14
5.3. Metody badawcze.....15
6. Omówienie cyklu publikacji.....19
6.1. Salivary adipokine and cytokine levels as potential markers for the development of obesity and metabolic disorders.....19
6.2. Pro-inflammatory adipokine and cytokine profiles in the saliva of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) – pilot study 21
6.3. Evaluation of the diagnostic utility of selected serum adipokines and cytokines in subjects with MASLD – a pilot study.....26
7. Ograniczenia badania 31
8. Wnioski.....32
9. Piśmiennictwo 33
10. Streszczenie w języku polskim.....39
11. Streszczenie w języku angielskim 42
12. Publikacje stanowiące rozprawę doktorską.....45
12.1. Publikacja przeglądowa (P.1).....45
12.2. Publikacja oryginalna nr 1. (P.2).....59
12.3. Publikacja oryginalna nr 2. (P.3).....74
13. Zgody Komisji Bioetycznej.....91
14. Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej.....94
15. Oświadczenia współautorów publikacji 95
16. Życiorys.....103
17. Dorobek naukowy 104

1. Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej

Łączna wartość Impact Factor (IF) dla cyklu publikacji (P.1-P.3): **15,908**

Łączna liczba punktów Ministra Edukacji i Nauki (MEiN) dla cyklu publikacji (P.1-P.3): **420**

Lista publikacji stanowiących rozprawę doktorską:

Publikacja nr 1 (P.1) – Zyśk B, Ostrowska L, Smarkusz-Zarzecka J. Salivary adipokine and cytokine levels as potential markers for the development of obesity and metabolic disorders. International Journal of Molecular Sciences 2021, 22: 11703; doi: 10.3390/ijms222111703.

IF=6,208; MEiN=140

Publikacja nr 2 (P.2) – Zyśk B, Ostrowska L, Smarkusz-Zarzecka J, Witczak-Sawczuk K, Gornowicz A, Bielawska A. Pro-inflammatory adipokine and cytokine profiles in the saliva of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) - a pilot study.
International Journal of Molecular Sciences 2023, 24: 2891; doi: 10.3390/ijms24032891.

IF=4,900; MEiN=140

Publikacja nr 3 (P.3) – Zyśk B, Ostrowska L, Smarkusz-Zarzecka J, Orywal K, Mroczko B, Cwalina U. Evaluation of the diagnostic utility of selected serum adipokines and cytokines in subjects with MASLD - a pilot study.
Nutrients 2024, 16: 1381; https://doi.org/10.3390/nu16091381.

IF=4,800; MEiN=140

2. Spis stosowanych skrótów i oznaczeń

ALP	*Alkaline phosphatase,* Fosfataza alkaliczna
ALT	*Alanine aminotransferase,* Aminotransferaza alaninowa
AST	*Aspartate aminotransferase,* Aminotransferaza asparaginianowa
BIA	*Bioelectrical impedance analysis,* Impedancja bioelektryczna
BMI	*Body mass index,* Wskaźnik masy ciała
CAP	*Controlled attenuation parameter,* Parametr kontrolowanego tłumienia
CD40/CD40L	*CD40/CD40L system,* Układ receptor CD40 – ligand CD40
CRP	*C-reactive protein,* Białko C-reaktywne
CT	*Computed Tomography,* Tomografia komputerowa
DXA	*Dual-energy X-ray absorptiometry,* Dwuwiązkowa absorpcjometria rentgenowska
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Test immunoenzymatyczny
GGTP	*Gamma-glutamyl transpeptidase,* Gamma-glutamylotranspeptydaza
HDL	*High density lipoprotein cholesterol,* Lipoproteiny o wysokiej gęstości
HMRS	*1H magnetic resonance spectroscopy*, Protonowa spektroskopia rezonansu magnetycznego
HOMA-IR	*Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance,* Wskaźnik insulinooporności
ICD-10	*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision*, Międzynarodowa Statystyczna Klasyfikacja Chorób i Problemów Zdrowotnych – Rewizja Dziesiąta
ICD-11	*International Classification of Diseases 11th Revision*, Międzynarodowa Klasyfikacja Chorób – Rewizja Jedenasta
IL-1β	*Interleukin 1β,* Interleukina 1β
IL-6	*Interleukin 6,* Interleukina 6
IL-8	*Interleukin 8,* Interleukina 8
IL-10	*Interleukin 10,* Interleukina 10
IL-12	*Interleukin 12,* Interleukina 12
IL-23	*Interleukin 23,* Interleukina 23
LDL	*Low density lipoprotein cholesterol,* Lipoproteiny o niskiej gęstości
MAFLD	*Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease,* Stłuszczeniowa choroba wątroby związana z zaburzeniami metabolicznymi

MASH	*Metabolic dysfunction-associated steatohepatitis*, Stłuszczeniowe zapalenie wątroby związane z zaburzeniami metabolicznymi
MASLD	*Metabolic dysfunction–associated steatotic liver disease,* Stłuszczeniowa choroba wątroby związana z zaburzeniami metabolicznymi
MCP-1	*Monocyte chemoattractant protein-1,* Białko chemotaktyczne monocytów
MMP-2	*Matrix metalloproteinase2,* Metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 2 *Gelatinase A*, Żelatynaza A
MMP-9	*Matrix metalloproteinase9,* Metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 9 *Gelatinase B*, Żelatynaza B
MONW	*Metabolically obese normal weight,* Otyłość metaboliczna z prawidłową masą ciała
MRI	*Magnetic resonance imaging,* Rezonans magnetyczny
NAFLD	*Non-alcoholic fatty liver disease,* Niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby
NASH	N*onalcoholic steatohepatitis*, Niealkoholowe stłuszczeniowe zapalenie wątroby
PAI-1	*Plasminogen activator inhibitor-1,* Inhibitor aktywatora plazminogenu
PTX3	*Pentraxin 3,* Pentraksyna 3
QUICKI	*Quantitative Insulin Sensitivity Check Index,* Wskaźnik insulinowrażliwości
sICAM	*Soluble intercellular adhesion molecule-1*, Rozpuszczalna cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1
TBIL	*Total bilirubin,* Bilirubina całkowita
TG	*Triglycerides,* Triglicerydy
TNF-α	*Tumor necrosis factor alpha,* Czynnik martwicy nowotworu α
USG	*Ultrasonography,* Ultrasonografia
VAT	*Visceral adipose tissue,* Wisceralna tkanka tłuszczowa
VAT/SAT	*Visceral to subcutaneous fat ratio,* Stosunek tkanki tłuszczowej wisceralnej do podskórnej
VCTE	*Vibration-controlled transient elastography,* Metoda elastografii dynamicznej impulsowej
WAT	*White adipose tissue*, Biała tkanka tłuszczowa
WHO	*World Health Organization,* Światowa Organizacja Zdrowia
WHR	*Waist-hip ratio,* Stosunek obwodu talii do obwodu bioder
WOF	*World Obesity Federation,* Światowa Federacja ds. Otyłości

3. Wprowadzenie

Choroba otyłościowa stała się problemem globalnym XIX wieku. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) na przestrzeni lat 1990-2022 globalne rozpowszechnienie otyłości wśród osób dorosłych zwiększyło się ponad 2-krotnie. Choroba ta występowała u 890 milionów osób w 2022 roku, co stanowiło 16% światowej populacji, czyli około 1 na 8 osób. Nadwagę rozpoznano u 2,5 miliarda osób dorosłych (43%). Znaczny wzrost rozpowszechnienia nadmiernej masy ciała zaobserwowano również wśród dzieci i młodzieży. Występowanie otyłości w tej grupie wiekowej zwiększyło się 4-krotnie od 1990 roku. Ponad 160 mln dzieci i młodzieży (5-19 lat) w 2022 roku chorowało na otyłość, a 390 mln miało nadwagę. Ponadto u 37 mln młodszych dzieci występowała nadmierna masa ciała [1]. Na przestrzeni ostatnich lat zaobserwowano wzrost rozpowszechnienia choroby otyłościowej również w Polsce. Według danych Światowej Federacji ds. Otyłości (WOF, *World Obesity Federation*) częstość występowania tej choroby u kobiet wynosiła 24,6% w 2022 roku. Stanowiło to 108 pozycję w globalnym zestawieniu krajów pod względem najwyższego odsetka otyłości. W przypadku mężczyzn Polska była na 35 miejscu (32,2%) [2]. Częstość występowania choroby otyłościowej wśród dzieci i młodzieży wynosiła 5,6% u dziewczynek (129 miejsce na świecie) oraz 8,7% – u chłopców (121 miejsce) [3]. Stwierdzono, że tempo wzrostu rozpowszechnienia nadwagi oraz otyłości wśród dzieci i młodzieży w Polsce jest najwyższe spośród wszystkich krajów europejskich. Globalne dane szacunkowe WOF wskazują, że liczba osób dorosłych chorujących na otyłość może zwiększyć się z 0,8 mld w 2020 roku do 1,5 mld w 2035 roku [4].

Otyłość jest wieloprzyczynową chorobą przewlekłą, którą zakodowano w Międzynarodowej Statystycznej Klasyfikacji Chorób i Problemów Zdrowotnych (*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*) ICD-10 pod numerem E66 [5], a w jej nowelizacji (ICD-11) – pod numerem 5B81 [6]. W przeszłości była postrzegana głównie jako defekt kosmetyczny, bez uwzględnienia jej implikacji zdrowotnych – nie tylko przez pacjentów, ale również w środowisku medycznym. Jednakże ta choroba może prowadzić do rozwoju ponad 200 powikłań, m.in. stłuszczeniowej choroby wątroby związanej z zaburzeniami metabolicznymi (MASLD, *metabolic dysfunction–associated steatotic liver disease*) [7]. Według najnowszych danych MASLD występuje u około 75,3% populacji osób ze wskaźnikiem masy ciała (BMI, *body mass index*) odpowiadającym otyłości (BMI ≥30 kg/m^2) [8], a patogeneza tej choroby jest złożona i wieloczynnikowa. U podstaw jej rozwoju znajdują się następujące czynniki: nieprawidłowa dystrybucja i aktywność tkanki tłuszczowej,

insulinooporność, stres oksydacyjny, lipotoksyczność związków lipidowych, dysbioza mikrobioty jelitowej, a także predyspozycje genetyczne i czynniki środowiskowe, tj. nieprawidłowy sposób żywienia czy niedostateczna aktywność fizyczna. Powyższe czynniki wzajemnie na siebie oddziałują, czego konsekwencją jest rozwój i progresja MASLD (tzw. hipoteza wielu trafień) [9, 10].

Z uwagi na to, że najczęstszą przyczyną wystąpienia stłuszczeniowej choroby wątroby są ogólnoustrojowe zaburzenia metaboliczne (poza przewlekłą podażą nadmiernych ilości alkoholu), światowi eksperci w 2020 roku zaproponowali zmianę dotychczasowego nazewnictwa – niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (NAFLD, *non-alcoholic fatty liver disease*) na stłuszczeniową chorobę wątroby związaną z zaburzeniami metabolicznymi (MAFLD, *metabolic dysfunction-associated fatty liver disease*). Nowa nomenklatura tej choroby uwzględniała możliwość współistnienia obu czynników etiologicznych – zespołu metabolicznego oraz nadużywania alkoholu [11]. W 2023 roku ponownie nastąpiła propozycja zmiany terminologii i akronimu poprzez zastąpienie w języku angielskim słowa „fatty" słowem „steatotic" (MASLD, *metabolic dysfunction–associated steatotic liver disease*), które nie jest wykluczające oraz stygmatyzujące i podkreśla możliwość rozwoju tej choroby u osób z różnym wskaźnikiem BMI [12]. Uważa się, że nawet osoby z prawidłową masą ciała mogą charakteryzować się zwiększoną zawartością wisceralnej tkanki tłuszczowej (VAT, *visceral adipose tissue*) i wyższym ryzykiem rozwoju zaburzeń metabolicznych, co określane jest mianem otyłości metabolicznej z prawidłową masą ciała (tzw. zespół MONW, *metabolically obese normal weight*) [13]. Wyniki badań epidemiologicznych wskazują, że rozpowszechnienie MASLD wśród osób z BMI w zakresie normy (18,5-24,9 kg/m^2) jest na poziomie 10,6% [14].

Dokładna ocena częstości występowania MASLD jest problematyczna, ponieważ przebieg tej choroby we wczesnym stadium jest bezobjawowy w większości przypadków klinicznych. Jedynie niewielka grupa pacjentów odczuwa niespecyficzne objawy, takie jak: zmęczenie, osłabienie czy dyskomfort w prawym podżebrzu [15]. Ze względu na to rozpoznanie MASLD w wielu przypadkach jest incydentalne (np. podczas diagnostyki innej choroby). Ponadto ta choroba często zostaje zdiagnozowana dopiero w późniejszych stadiach, tj. progresji do MASH (stłuszczeniowego zapalenia wątroby związanego z zaburzeniami metabolicznymi, *metabolic dysfunction-associated steatohepatitis*), rozwoju zwłóknienia bądź marskości wątroby. Obecnie dostępne metody diagnostyczne nie mogą zostać wykorzystane w ramach rutynowej diagnostyki. Złotym standardem w rozpoznawaniu MASLD jest biopsja, która umożliwia różnicowanie stłuszczenia wątroby i stłuszczeniowego zapalenia wątroby,

a także ocenę zwłóknienia i analizę stopnia jego nasilenia, ale jest to badanie inwazyjne. Ultrasonografia (USG, *ultrasonography*) wykazuje ograniczoną czułość w przypadku niewielkiego stłuszczenia wątroby, która jest jeszcze niższa przy zaawansowanej otyłości (BMI≥40 kg/m^2). Ze względu na to USG nie może być uznane za dobrą metodę diagnostyczną w ocenie wczesnego stadium stłuszczenia wątroby (pozwala na rozpoznanie stłuszczenia, jeśli procesem jest objętych min. 20-30% hepatocytów). Natomiast tomografia komputerowa (CT, *computed tomography*) oraz rezonans magnetyczny (MRI, *magnetic resonance imaging*) charakteryzują się dużą czułością, ale obie te metody generują wysokie koszty. Dodatkowo wadą CT jest ekspozycja na promieniowanie jonizujące. Natomiast metoda elastografii dynamicznej impulsowej (VCTE, *vibration-controlled transient elastography*) umożliwia diagnostykę stłuszczenia wątroby, analizę jego nasilenia, a także ocenę zwłóknienia wątroby. Badanie te jest nieinwazyjne i czułe, a sonda XL pozwala na dokładne pomiary u osób ze współistniejącą otyłością. Jednakże metoda ta nie jest jeszcze powszechnie dostępna [16, 17].

Z uwagi na to, iż MASLD jest skutkiem zmian metabolicznych, związanych z otyłością trzewną, to odpowiednia diagnostyka i leczenie otyłości są istotnymi aspektami zapobiegania rozwojowi lub progresji choroby stłuszczeniowej wątroby związanej z zaburzeniami metabolicznymi. Impedancja bioelektryczna (BIA, *bioelectrical impedance analysis*) jest dokładną i miarodajną metodą oceny składu ciała, a równocześnie coraz częściej dostępną. Natomiast bardziej zaawansowane metody, charakteryzujące się dużą dokładnością tzn. dwuwiązkowa absorpcjometria rentgenowska (DXA, *dual-energy X-ray absorptiometry*), rezonans magnetyczny i tomografia komputerowa, nie są dostępne dla pacjenta w ramach podstawowej opieki zdrowotnej. Pozostałe metody stosowane w rutynowej diagnostyce otyłości są niewystarczająco miarodajne. Powszechnie wykorzystywany wskaźnik BMI nie jest dobrym narzędziem oceny ryzyka kardio-metabolicznego, ponieważ nie ma odniesienia do zawartości i dystrybucji tkanki tłuszczowej i może powodować zarówno niedoszacowanie, jak również przeszacowanie otyłości. Z kolei wadą pomiaru obwodu talii i bioder oraz wyliczonego na ich podstawie wskaźnika WHR (*waist-hip ratio)* jest ograniczona dokładność interpretacji [18].

Odkrycie funkcji wydzielniczej tkanki tłuszczowej wyznacza istotny kierunek w diagnostyce otyłości metabolicznej, jakim jest ocena stężenia adipokin i cytokin, wydzielanych przez komórki białej tkanki tłuszczowej (WAT, *white adipose tissue*). Mogą one wykazywać działanie autokrynne, parakrynne i endokrynne, a więc wpływać zarówno na komórki tkanki tłuszczowej oraz funkcje innych tkanek, jak również na stan całego organizmu.

Adipokiny i cytokiny, wydzielane w tkance tłuszczowej osób chorych na otyłość, mają w większości charakter prozapalny i przyczyniają się do rozwoju szeregu powikłań metabolicznych [19].

Długotrwały, dodatni bilans energetyczny prowadzi do ekspansji białej tkanki tłuszczowej i jej dysfunkcji oraz aktywacji mechanizmów, prowadzących do rozwoju miejscowego stanu zapalnego w tej tkance, którego następstwem jest przewlekły, ogólnoustrojowy stan zapalny o niskim stopniu nasilenia. W nieprawidłowo funkcjonującej tkance tłuszczowej dochodzi do znacznego napływu makrofagów. Wyróżnia się dwie polaryzacje makrofagów, wykazujące przeciwstawne działanie: M1 (charakterystyczne dla tkanki tłuszczowej w przebiegu otyłości) i M2 (przeważają w tkance tłuszczowej osób zdrowych metabolicznie). Makrofagi typu M1 indukują rozwój stanu zapalnego oraz insulinooporności poprzez wydzielanie cytokin prozapalnych: czynnika martwicy nowotworu α (TNF-α, *tumor necrosis factor alpha*), a także interleukiny 6 (IL-6, *interleukin 6*), interleukiny 12 (IL-12, *interleukin 12*) i interleukiny 23 (IL-23, *interleukin 23*). Natomiast makrofagi typu M2 chronią przed rozwojem stanu zapalnego i insulinooporności oraz uczestniczą w procesach naprawczych uszkodzonych tkanek. Mechanizm ich działania polega na wydzielaniu przeciwzapalnej interleukiny 10 (IL-10, *Interleukin 10*) w znacznych ilościach, przy jednoczesnym zmniejszaniu syntezy IL-12 i IL-23 [20].

Adipokiny i cytokiny, wydzielane przez wisceralną tkankę tłuszczową, uczestniczą również w rozwoju MASLD i progresji do MASH. Zwiększona jest tam sekrecja leptyny, TNF-α oraz IL-6 (które wykazują działanie prozapalne) oraz zmniejszone jest wydzielanie przeciwzapalnej adiponektyny, co może inicjować procesy zapalne w wątrobie. Leptyna może promować rozwój stanu zapalnego aktywując komórki Kupffera – rezydentne makrofagi wątroby. Komórki Kupffera wydzielają cytokiny prozapalne, m.in. TNF-α, IL-6 i interleukinę 1β (IL-1β, *interleukin 1β*). Lipotoksyczność, stan zapalny i uszkodzenie hepatocytów powodują aktywację komórek gwiaździstych wątroby (pozostających w formie spoczynkowej w warunkach fizjologicznych) i ich transformację do komórek o typie miofibroblastów, syntetyzujących kolagen, którego gromadzenie jest przyczyną włóknienia wątroby [21, 22, 23].

Powszechnie stosowanym materiałem biologicznym do wykonywania oznaczeń różnych parametrów jest surowica krwi. Jednakże w diagnostyce laboratoryjnej zwiększa się zainteresowanie wykorzystaniem śliny, która jest materiałem pobieranym w sposób nieinwazyjny oraz przy wykorzystaniu niskich kosztów. Pobranie śliny nie wymaga również

specjalistycznego sprzętu oraz wyszkolonego personelu medycznego, a równocześnie daje duże możliwości diagnostyczne. Ślina jest wydzieliną większych i mniejszych gruczołów ślinowych, która zawiera 94–99% wody, a także liczne białka, węglowodany i lipidy, witaminy, cytokiny, immunoglobuliny, czynniki wzrostu i hormony. Niektóre związki przechodzą z krwi do śliny i odwrotnie na drodze dyfuzji biernej lub transportu aktywnego i dlatego występuje zależność pomiędzy ich stężeniem w ślinie a stężeniem w surowicy krwi. Idea wykorzystania śliny do oznaczania stężenia adipokin i cytokin stanowi nowatorskie podejście w diagnostyce MASLD [24, 25].

4. Cel pracy z uzasadnieniem podjętej tematyki badawczej

Wzrost częstości występowania stłuszczeniowej choroby wątroby związanej z zaburzeniami metabolicznymi, bezobjawowy przebieg we wczesnym stadium (w większości przypadków klinicznych), a także aktualny brak rutynowej diagnostyki wyznaczają istotny kierunek badań, jakim jest szukanie nowych metod rozpoznawania MASLD.

Wspólne mechanizmy patogenetyczne między otyłością i stłuszczeniową chorobą wątroby związaną z zaburzeniami metabolicznymi wskazują na możliwość wykorzystania w rozpoznawaniu zwiększonego ryzyka rozwoju MASLD powszechnie dostępnej metody oceny składu ciała – impedancji bioelektrycznej. Analiza składu ciała mogłaby stanowić element diagnostyki tej choroby, ponieważ istotnym czynnikiem predysponującym do jej wystąpienia jest nadmierna zawartość wisceralnej, a także całkowitej tkanki tłuszczowej. Jednakże niezbędne jest ustalenie wartości granicznych dla tych parametrów w celu dokładniejszej diagnostyki MASLD.

Wydzielanie przez aktywną metabolicznie wisceralną tkankę tłuszczową prozapalnych adipokin i cytokin, inicjujących procesy zapalno-zwłóknieniowe w wątrobie, wskazuje na możliwość zastosowania ich jako markerów diagnostycznych MASLD. Dotychczasowe badania na ten temat są niewystarczające, gdyż wciąż nie przebadano wielu potencjalnych markerów. Ponadto wyniki przeprowadzonych badań są niejednoznaczne. Przedmiotem niniejszych badań była analiza stężenia wybranych adipokin i cytokin w różnych materiałach biologicznych: surowicy i ślinie, aby odpowiedzieć na pytania: czy ocenę tych parametrów można uwzględnić jako element rutynowej diagnostyki MASLD i zastosować w badaniach przesiewowych u osób z grup zwiększonego ryzyka tej choroby (szczególnie u osób z chorobą otyłościową) oraz czy ślina może zostać wykorzystana jako materiał diagnostyczny.

Przyjęte w niniejszej pracy hipotezy badawcze zweryfikowano poprzez realizację niżej wymienionych celów:

1) Ocena związku między zawartością i rozmieszczeniem tkanki tłuszczowej a rozwojem stłuszczenia wątroby.
2) Analiza korelacji wybranych adipokin i cytokin w surowicy u osób ze stłuszczeniową chorobą wątroby związaną z zaburzeniami metabolicznymi (MASLD).
3) Analiza korelacji wybranych adipokin i cytokin w ślinie u osób z MASLD.

5. Materiał i metody

Badania zostały zrealizowane w Zakładzie Dietetyki i Żywienia Klinicznego na Wydziale Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku we współpracy z Zakładem Diagnostyki Biochemicznej oraz Zakładem Biotechnologii Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej. Protokoły projektów obserwacyjnych zostały zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku i uzyskano zgodę na ich przeprowadzenie (nr RI-002/647/2019, APK.002.468.2020 oraz APK.002.39.2021). Finansowanie na przeprowadzenie badań pozyskano z następujących projektów statutowych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku: SUB/3/DN/21/001/3316, SUB/3/DN/21/002/3316 oraz SUB/3/DN/22/002/3316.

5.1. Przegląd piśmiennictwa z zakresu tematyki pracy doktorskiej

Przygotowanie artykułu poglądowego (**P.1)** oraz prac badawczych (**P.2-P.3)** wymagało przeprowadzenia szczegółowego przeglądu literatury naukowej (związanej z tematyką publikacji), którego dokonano wykorzystując dostępne zasoby w bazach PubMed, Springer, Scopus, a także Google Schoolar.

5.2. Materiał badawczy

Do udziału w badaniu zakwalifikowano kobiety i mężczyzn w zakresie wiekowym 20–55 lat z otyłością pierwotną I i II stopnia (BMI=30,0–39,9 kg/m^2) oraz osoby z prawidłową masą ciała (BMI=18,5–24,9 kg/m^2). Kryteria wyłączenia z badania obejmowały: występowanie wirusowego zapalenia wątroby (wszystkich typów), cholestazy wątrobowej, dzienne spożycie alkoholu >30 g u mężczyzn i >20 g u kobiet, a także występowanie cukrzycy typu 1 i 2, zaostrzonej choroby wieńcowej, zaburzeń odżywiania, zaburzeń endokrynologicznych, stosowanie hormonalnej antykoncepcji lub hormonalnej terapii zastępczej, przebytą steroidoterapię i terapię antyretrowirusową, obecność rozrusznika serca oraz ciążę i laktację. W przypadku osób z chorobą otyłościową dodatkowymi kryteriami wykluczenia były: otyłość wtórna oraz farmakologiczne lub chirurgiczne leczenie otyłości **(P.2-P.3)**. Dodatkowo wszyscy uczestnicy badania musieli uzyskać zaświadczenie od lekarza stomatologa, potwierdzające brak chorób przyzębia i stanu zapalnego jamy ustnej **(P.2)**.

Uczestnicy zostali zaproszeni do udziału w badaniu za pośrednictwem środków masowego przekazu, takich jak: Radio Białystok, TVP Białystok oraz media społecznościowe Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Osobom zgłaszającym się przeprowadzono

wstępną kwalifikację w oparciu o wywiad, weryfikując czy spełniają one kryteria włączenia do badania oraz czy nie dotyczą ich kryteria wykluczenia z badania. Następnie wszystkim uczestnikom udzielono szczegółowych informacji o przebiegu i celu badań oraz poinformowano ich o możliwości rezygnacji z badań na każdym ich etapie. Od wszystkich zakwalifikowanych osób uzyskano pisemną zgodę na udział w badaniach przed ich rozpoczęciem.

5.3. Metody badawcze

5.3.1. Ocena stanu odżywienia

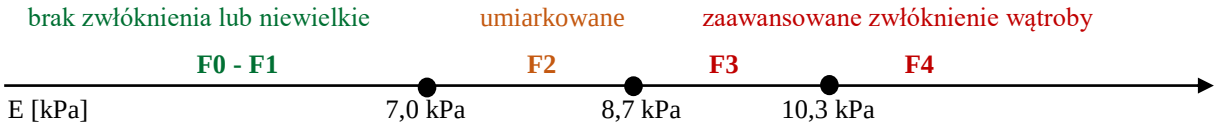
Wszystkim osobom, biorącym udział w badaniu, wykonano pomiary masy ciała (z dokładnością do 0,01 kg) i wysokości ciała (z dokładnością do 0,5 cm) przy użyciu wagi ze wzrostomierzem firmy RADWAG WPT 100/200 OW (Radom, Polska), a także pomiar obwodu talii przy pomocy taśmy antropometrycznej.

Następnie wśród uczestników przeprowadzono analizę składu ciała metodą BIA i oceniono pole tkanki tłuszczowej na wysokości pasa, wykorzystując urządzenie BioScan 920-2 (Essex, UK). Badanie to zostało przeprowadzone w godzinach porannych. Uczestnicy przystąpili do niego na czczo, powstrzymując się w poprzednim dniu od intensywnej aktywności fizycznej. Analiza składu ciała została wykonana w pozycji leżącej, a elektrody umieszczono na prawej kończynie górnej i dolnej. Na jej podstawie oceniono całkowitą zawartość tkanki tłuszczowej (kg, %). Analizę ilościową tkanki tłuszczowej brzusznej przeprowadzono w pozycji stojącej, umieszczając elektrody w linii poziomej na wysokości pasa i określono pole tkanki tłuszczowej: wisceralnej (cm^2) oraz podskórnej (cm^2) [26]. Ustalono również stosunek tkanki tłuszczowej wisceralnej do podskórnej (VAT/SAT, *visceral to subcutaneous fat ratio*). Wyniki zostały opracowane przy użyciu oprogramowania Maltron BioScan 920 v1.1 **(P.2-P.3)**.

5.3.2. Pomiar stłuszczenia i sztywności wątroby

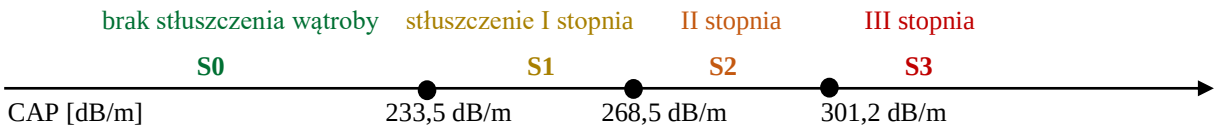
Kolejnym etapem było wykonanie badania elastograficznego wątroby z wykorzystaniem aparatu FibroScan 530 Compact firmy Echosens (Paryż, Francja). Urządzenie to wykorzystuje metodę elastografii dynamicznej impulsowej i pozwala na przeprowadzenie pomiaru sztywności wątroby. Dodatkowo funkcja oceny parametru kontrolowanego tłumienia (CAP, *controlled attenuation parameter*) umożliwia wykonanie pomiaru stłuszczenia wątroby [27].

Sztywność wątroby (E) jest skorelowana ze zwłóknieniem tego narządu. Wartość danego parametru obliczana jest na podstawie prędkości rozchodzenia się fali poprzecznej, rozprzestrzeniającej się na kilka centymetrów w głąb wątroby. Fala poprzeczna generowana jest z kontrolowaną częstotliwością (50 Hz) parametru charakterystycznego i specyficznego dla określania sztywności wątroby. Prędkość rozchodzenia się fali jest tym większa, im większe jest włóknienie w wątrobie. Przyjęto następujące zakresy dla parametru oceniającego sztywność wątroby (E):



[28].

Ilościowa ocena stłuszczenia wątroby jest przeprowadzana równocześnie z pomiarem sztywności wątroby. Parametr CAP jest oznaczany dzięki pomiarowi zjawiska tłumienia ultradźwięków i jest wyrażony w dB/m (decybel/metr). Opisuje zanikanie sygnału ultradźwięków w zależności od głębokości przenikania w badanej wątrobie. Stłuszczenie wątroby zdefiniowano w zależności od ilości stłuszczonych hepatocytów na podstawie poniższych wartości:



Brak stłuszczenia wątroby (S0) → 0–4/10%* stłuszczonych hepatocytów
Stłuszczenie wątroby I stopnia (S1) → 5/11*–33% stłuszczonych hepatocytów
Stłuszczenie wątroby II stopnia (S2) → 34–66% stłuszczonych hepatocytów
Stłuszczenie wątroby III stopnia (S3) → ≥67% stłuszczonych hepatocytów

*w zależności od badania

[29, 30, 31].

Każdemu uczestnikowi wykonano serię 10 prawidłowych pomiarów (w celu zapewnienia dokładności i powtarzalności wyników), wykorzystując głowice o rozmiarach M oraz XL. Badanie wykonano w pozycji leżącej z prawym ramieniem uniesionym i umieszczonym za głową. Zaaplikowano odpowiednią ilość żelu i umieszczono głowicę w okolicy międzyżebrowej prawej na poziomie najgrubszej warstwy miąższu wątroby,

unikając pomiaru w pobliżu dolnego lub górnego brzegu wątroby (ryzyko zawyżenia wyniku pomiaru w okolicy podtorebkowej). Uczestników poinformowano o konieczności wykonania pomiaru na czczo bądź min. 6 godzin po posiłku [27] **(P.2-P.3)**.

5.3.3. Ocena parametrów biochemicznych oraz stężenia adipokin i cytokin w surowicy

Uczestnicy otrzymali skierowanie do akredytowanego laboratorium Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Zostali oni poinformowani o konieczności przystąpienia do badania na czczo oraz unikania ciężkostrawnych, tłustych posiłków i alkoholu w dniu poprzedzającym badanie. Od każdego pacjenta w godzinach porannych (7:00-10:00) pobrano próbki krwi żylnej (15 ml) do probówki z aktywatorem skrzepu (S-Monovette, SARSTEDT, Numbrecht, Niemcy) i odwirowano w celu uzyskania próbek surowicy. Surowicę krwi wykorzystano do badań biochemicznych krwi, a pozostałą jej ilość zamrożono w temperaturze -80°C w celu oznaczenia stężenia adipokin i cytokin.

Oceniono w surowicy stężenie glukozy na czczo oraz po 1 i 2 godzinach doustnego testu tolerancji glukozy (OGTT, *oral glucose tolerance test),* insuliny na czczo, cholesterolu całkowitego, cholesterolu frakcji lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL, *high density lipoprotein cholesterol*) oraz lipoprotein o niskiej gęstości (LDL, *low density lipoprotein cholesterol*), triglicerydów (TG, *triglycerides),* aminotransferazy asparaginianowej (AST, *aspartate aminotransferase*), aminotransferazy alaninowej (ALT, *alanine aminotransferase*), gamma-glutamylotranspeptydazy (GGTP, *gamma-glutamyl transpeptidase*), fosfatazy alkalicznej (ALP, *alkaline phosphatase*), bilirubiny całkowitej (TBIL, *total bilirubin*) oraz białka C-reaktywnego (CRP, *C-reactive protein*) za pomocą ALINITY ci-series (Abbott, Wiesbaden, Niemcy). Szczegółowy opis metod zawarto w publikacjach **P.2** oraz **P.3**. Wartości wskaźnika insulinooporności (HOMA-IR, *Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance*) obliczono metodą Matthews: insulina na czczo [µIU/ml] x glukoza na czczo [mg/dl] / 22,5 [32]. Wskaźnik insulinowrażliwości (QUICKI, *Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*) wyznaczono za pomocą metody Katza: 1 / (log insuliny na czczo [µIU/ml] + log glukozy na czczo [mg/dl] [33] **(P.2-P.3)**.

Następnie oznaczono w surowicy stężenie adiponektyny całkowitej, rezystyny, TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-23 oraz całkowitej metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej 2 (MMP-2, *matrix metalloproteinase-2)* i metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej 9 (MMP-9, *matrix metalloproteinase-9)* za pomocą testu immunoenzymatycznego (ELISA, *Enzyme-*

Linked Immunosorbent Assay) zgodnie z instrukcjami producenta (R&D Systems, Abingdon, Wielka Brytania) **(P.3)**.

5.3.4. Ocena stężenia wybranych adipokin i cytokin w ślinie

Próbki śliny pobierano od uczestników badania standardową metodą w godzinach 9:00–11:00. Uprzednio poinstruowano ich, aby zachowali minimum 2-godzinny odstęp pomiędzy pobraniem materiału diagnostycznego a spożyciem pokarmów i podażą napojów (z wyjątkiem wody). Przed pobraniem śliny uczestnicy przepłukiwali jamę ustną wodą dejonizowaną. Niestymulowaną ślinę pozyskiwano przez 10 minut poprzez pasywne spływanie śliny bezpośrednio do plastikowych probówek. Uczestnicy w tym czasie siedzieli w wygodnej pozycji z głową lekko pochyloną do przodu [34].

Próbki śliny homogenizowano i klarowano przez wirowanie przy 1200 obr./min. przez 15 minut w temperaturze 4°C. Porcje sklarowanych supernatantów przechowywano w temperaturze -70°C do pomiarów ELISA. Do pomiaru stężenia białek w próbkach śliny uczestników badania wykorzystano wysoce czułe zestawy testowe (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA). Płytki do mikromiareczkowania dostarczone w zestawach zostały wstępnie pokryte przeciwciałem specyficznym dla analizowanego antygenu. Badania przeprowadzono zgodnie z protokołami producenta **(P.2)**.

5.3.5. Analiza statystyczna wyników badań

Analiza statystyczna otrzymanych wyników została przeprowadzona z wykorzystaniem oprogramowania „Statistica" (wersja 13.3 PL; TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA). Ze względu na małą liczebność grup nie oceniano normalności rozkładu zmiennych w obrębie grup i zastosowano metody nieparametryczne. Wszystkie dane zostały przedstawione w formie mediany (Me) oraz zakresu kwartylowego (Q_1-Q_3). Do oceny różnic pomiędzy zmiennymi ilościowymi wykorzystano test ANOVA Kruskala–Wallisa **(P.2** i **P.3)** z analizą post hoc **(P.3)**. Natomiast różnice między zmiennymi jakościowymi oceniono za pomocą testu niezależności chi-kwadrat **(P.3)**. Do wykazania zależności pomiędzy badanymi parametrami wykorzystano współczynnik korelacji rang Spearmana **(P.2)**. Oceniono również związek między zmiennymi za pomocą regresji wielorakiej. Dodatkowo przeprowadzono analizę krzywej ROC (*receiver operating characteristic*) w celu oceny wartości diagnostycznej wybranych parametrów. Do obliczenia punktów odcięcia wykorzystano metodę stycznej. Oceniono pole pod krzywą ROC (AUC, *area under curve*) z 95% przedziałem ufności i wartością p **(P.3)**. Jako poziom istotności przyjęto wartość $p<0,05$.

6. Omówienie cyklu publikacji

6.1. Salivary adipokine and cytokine levels as potential markers for the development of obesity and metabolic disorders (Stężenie adipokin i cytokin w ślinie jako potencjalny marker rozwoju otyłości i zaburzeń metabolicznych) (P.1)

W skład rozprawy doktorskiej jako pierwsza została włączona publikacja przeglądowa, której celem było ustalenie czy ślina może być przydatna w diagnostyce choroby otyłościowej oraz jej wczesnych powikłań metabolicznych. Ponadto praca miała na celu ocenę potencjału diagnostycznego adipokin i cytokin oznaczanych w ślinie na podstawie dotychczasowych wyników badań.

Na wstępie pracy przeglądowej wyjaśniono powód podjęcia tematyki potencjalnych markerów choroby otyłościowej oraz współistniejących zaburzeń i chorób. W oparciu o najnowsze dane epidemiologiczne pokazano, że choroba otyłościowa stała się problemem o zasięgu globalnym, która dotyczy coraz młodszych grup wiekowych, a liczba osób chorych w Polsce i na świecie stale wzrasta. Podkreślono również, że niewystarczająca jest obecnie dostępna dla pacjenta diagnostyka otyłości (w ramach podstawowej opieki zdrowotnej), ukierunkowana na wczesną ocenę ryzyka kardio-metabolicznego. Następnie omówiono patogenezę choroby otyłościowej, zwracając szczególną uwagę na rolę białej tkanki tłuszczowej (głównie wisceralnej) w rozwoju stanu zapalnego oraz wyjaśniono mechanizmy prowadzące do wydzielania prozapalnych adipokin oraz cytokin. Celem tej części niniejszej pracy było pokazanie, że analiza wartości diagnostycznej adipokin i cytokin może stać się przełomem w rozpoznawaniu choroby otyłościowej oraz współistniejących zaburzeń i chorób metabolicznych. Wykorzystanie śliny jako materiału biologicznego do oznaczania tych markerów wykazuje potencjał do zastosowania go w rutynowej diagnostyce z uwagi na szybkość i nieskomplikowaną procedurę pobierania, nieinwazyjność oraz niewielkie koszty.

Analiza dotychczasowych badań wykazała istotną statystycznie, dodatnią zależność między stężeniem niektórych adipokin w surowicy krwi a ich stężeniem w ślinie, takich jak: rezystyna [35] i adiponektyna [36]. Wyniki te wskazały, że ocena omawianych markerów w ślinie może stać się nie tylko dodatkową metodą diagnostyczną, ale także metodą alternatywną do oceny ich stężenia w surowicy krwi. Powyższe ustalenia stanowiły punkt wyjścia do dalszych badań i były podstawą do postawienia hipotezy, że również inne adipokiny i cytokiny, oceniane w danych materiałach diagnostycznych mogą wykazywać wzajemną zależność. Aby jednak wyniki były miarodajne, należy u pacjentów wykluczyć choroby

przyzębia, próchnicę i inne choroby jamy ustnej, które mogą wpływać na stężenie tych parametrów w ślinie.

Następnie podsumowano istniejącą wiedzę na temat roli poszczególnych adipokin i cytokin w patogenezie choroby otyłościowej i jej powikłań metabolicznych oraz wyniki dotychczas przeprowadzonych badań, oceniających potencjał diagnostyczny adipokin i cytokin z wykorzystaniem śliny jako materiału biologicznego. Przeanalizowano pod tym kątem: adiponektynę, leptynę, rezystynę, waspinę, IL-1β, IL-6, interleukinę 8 (IL-8, *Interleukin 8*), IL-10, TNF- α, białko chemotaktyczne monocytów (MCP-1, *monocyte chemoattractant protein-1*), układ receptor CD40 – ligand CD40 (CD40/CD40L, *CD40/CD40L system*), a także MMP-2, inhibitor aktywatora plazminogenu (PAI-1, *plasminogen activator inhibitor-1*), rozpuszczalną cząsteczkę adhezji międzykomórkowej 1 (sICAM, *soluble intercellular adhesion molecule-1*) oraz Pentraksynę 3 (PTX3, *pentraxin 3*). Omawiane w głównej części pracy adipokiny i cytokiny zestawiono następnie w tabelach zbiorczych, podsumowujących wpływ ich podwyższonego/zmniejszonego stężenia w ślinie na parametry składu ciała oraz na wybrane parametry biochemiczne. Porównano również stężenia adipokin/cytokin w różnych grupach dorosłych pacjentów i dzieci: z otyłością, prawidłową masą ciała oraz wybranymi chorobami i zaburzeniami metabolicznymi.

Analiza przeprowadzonych badań wykazała, że ocena stężenia TNF-α w ślinie może znaleźć zastosowanie w diagnostyce otyłości, gdyż odnotowano podwyższone stężenia omawianej cytokiny w przebiegu tej choroby. Dotychczasowe wyniki badań odnośnie pozostałych cytokin oraz adipokin są niejednoznaczne, ale równocześnie obiecujące. W części z tych badań u osób chorych na otyłość zaobserwowano zmniejszone stężenia adiponektyny i interleukiny 10 oraz podwyższone stężenia leptyny, rezystyny, interleukiny 6 i MCP-1. Przeprowadzono też pojedyncze badania dla waspiny, interleukiny 8, MMP-2, PAI-1, sICAM oraz PTX3, gdzie zaobserwowano zwiększone ich stężenia u osób z otyłością oraz dla układu CD40/CD40L, którego stężenie było zmniejszone w przypadku choroby otyłościowej.

Na podstawie przeglądu dotychczasowych badań zaobserwowano, że na przestrzeni ostatnich lat nie oceniono jeszcze potencjału diagnostycznego adipokin i cytokin w ślinie w kontekście MASLD. Ponadto przeprowadzono niewiele badań, wykorzystujących surowicę jako materiał diagnostyczny. W związku z tym w pracach badawczych przeanalizowano stężenia adipokin i cytokin w ślinie oraz surowicy u pacjentów z MASLD i oceniono możliwość wykorzystania ich jako potencjalnych markerów tej choroby.

6.2. Pro-inflammatory adipokine and cytokine profiles in the saliva of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) – pilot study (Profil prozapalnych adipokin i cytokin w ślinie u pacjentów z otyłością i niealkoholową stłuszczeniową chorobą wątroby (NAFLD) — badanie pilotażowe) (P.2)

Drugą publikację z cyklu stanowi praca badawcza, której celem była ocena stężenia wybranych adipokin i cytokin prozapalnych w ślinie niestymulowanej u pacjentów z chorobą otyłościową i współistniejącym stłuszczeniem wątroby, bez zwłóknienia lub z niewielkim zwłóknieniem tego narządu. Kolejnym celem badań była analiza tych parametrów prozapalnych pod kątem możliwości ich wykorzystania jako wczesnych markerów NAFLD.

6.2.1. Grupa badana

Wstępnie przyjęto 120 osób (81 kobiet i 39 mężczyzn) do udziału w badaniach, w tym 79 osób do grupy badanej (z chorobą otyłościową) oraz 41 osób do grupy kontrolnej (z prawidłową masą ciała). Następnie z grupy badanej wykluczono 12 osób z powodu ich rezygnacji na różnych etapach badań, a w konsekwencji brak materiału (śliny do oznaczania stężenia adipokin i cytokin) i kompletnych danych (wyniku badania elastograficznego). Ponadto wyeliminowano 2 uczestników z zaawansowanym zwłóknieniem wątroby (F3-F4) ze względu na specyfikę badania, tj. poszukiwanie wczesnych markerów NAFLD. Natomiast z grupy kontrolnej wykluczono 10 osób z nieprawidłowym stanem klinicznym wątroby (stłuszczeniem lub zwłóknieniem tego narządu).

Ostatecznie zakwalifikowano 96 osób (67 kobiet i 29 mężczyzn) – 65 uczestników do grupy badanej i 31 uczestników do grupy kontrolnej. Ponadto osoby z grupy badanej podzielono na 4 grupy na podstawie kryterium występowania stłuszczenia wątroby oraz stopnia jego zaawansowania. Docelowa struktura grup była następująca: grupa S0 – 11 osób z otyłością i bez stłuszczenia wątroby; grupa S1 – 10 osób z otyłością i stłuszczeniem I stopnia, grupa S2 – 24 osoby z otyłością i stłuszczeniem II stopnia, grupa S3 – 20 osób z otyłością i stłuszczeniem III stopnia oraz grupa kontrolna – 31 osób bez otyłości i bez stłuszczenia wątroby.

6.2.2. Podsumowanie wyników badań i dyskusja

Grupy porównano pod względem stężenia parametrów laboratoryjnych, związanych ze stanem i funkcją wątroby: ALT, AST, GGTP oraz ALP. Stężenia ALP nie różniły się istotnie statystycznie pomiędzy grupami (Me $_{CONTROL}$: 52,0 U/L vs. $_{S0}$: 52,0 U/L vs. $_{S1}$: 68,5 U/L vs. $_{S2}$: 58,0 U/L vs. $_{S3}$: 60,5 U/L; p=0,053), więc nie można uznać tego parametru biochemicznym

wskaźnikiem rozwoju NAFLD/MASLD. Natomiast odnotowano istotne statystycznie różnice w przypadku ALT. Najniższą medianę stężeń zaobserwowano w grupie z prawidłową masą ciała i bez współistniejącego stłuszczenia wątroby w porównaniu do grup z otyłością, w których dodatkowo mediana stężeń wykazywała wyższe wartości w grupach ze wzrastającym stopniem stłuszczenia wątroby (Me $_{CONTROL}$: 14 U/L vs. $_{S0}$: 23 U/L vs. $_{S1}$: 24 U/L vs. $_{S2}$: 24,50 U/L vs. $_{S3}$: 30,50 U/L; p=0,002). Stwierdzono również istotne statystycznie różnice w medianach stężeń AST pomiędzy grupami (Me $_{CONTROL}$: 17 U/L vs. $_{S0}$: 20 U/L vs. $_{S1}$: 21,50 U/L vs. $_{S2}$: 18,50 U/L vs. $_{S3}$: 21,50 U/L; p=0,018), ale w tym przypadku grupy z coraz bardziej zaawansowanym stłuszczeniem nie charakteryzowały się proporcjonalnie wyższymi wartościami tego parametru. Odnotowano także istotne statystycznie różnice w medianach stężeń GGTP, gdzie mediana stężeń była niższa u osób bez stłuszczenia wątroby (zarówno w grupie z prawidłową masą ciała, jak również w grupie z otyłością) w porównaniu do grup ze stłuszczeniem (Me $_{CONTROL}$: 15 U/L vs. $_{S0}$: 18 U/L vs. $_{S1}$: 31 U/L vs. $_{S2}$: 24,5 U/L vs. $_{S3}$: 32 U/L; p<0,001).

Analiza porównawcza median stężeń ALT, AST i GGTP pomiędzy grupami wskazała na ich potencjalną przydatność w diagnostyce NAFLD/MASLD. Jednakże dodatkowo wartości tych parametrów u wszystkich uczestników badania odniesiono do wartości referencyjnych (norm laboratoryjnych). Odsetek osób z prawidłowym stężeniem ALT w każdej grupie (nawet z zaawansowanym stłuszczeniem wątroby) wynosił min. 75% ($_{CONTROL}$: 100% vs. $_{S0}$: 100% vs. $_{S1}$: 90% vs. $_{S2}$: 96% vs. $_{S3}$: 75%). Stężenie AST również u większości uczestników badania nie przekraczało zakresu referencyjnego ($_{CONTROL}$: 94% vs. $_{S0}$: 100% vs. $_{S1}$: 80% vs. $_{S2}$: 92% vs. $_{S3}$: 95%). Stężenie GGTP u ponad 70% badanych w każdej grupie pozostawało w granicach normy laboratoryjnej ($_{CONTROL}$: 97% vs. $_{S0}$: 82% vs. $_{S1}$: 80% vs. $_{S2}$: 71% vs. $_{S3}$: 90%). W związku z tym te parametry nie są miarodajnym narzędziem diagnostycznym NAFLD/MASLD przy obecnie przyjętych normach laboratoryjnych, co potwierdzają również wyniki badań innych autorów [37, 38, 39, 40]. Otrzymane wyniki świadczą o potrzebie ustalenia nowych zakresów referencyjnych, przeznaczonych do rozpoznawania NAFLD/MASLD i monitorowania tej choroby, aby oceniane parametry mogły zostać wykorzystane w rutynowej diagnostyce i badaniach przesiewowych.

Następnie oceniono stężenia wybranych adipokin (rezystyny, wisfatyny), cytokin prozapalnych (TNF-α, IL-6, IL-1β) oraz żelatynaz (MMP-2, MMP-9) w ślinie i porównano ich mediany pomiędzy badanymi grupami. Wartości stężeń TNF-α i wisfatyny były poniżej wartości minimalnej rozpoznawanej przez sprzęt badawczy, co uniemożliwiło analizę. Natomiast stwierdzono, że stężenia IL-6 nie różniły się istotnie statystycznie pomiędzy grupami

(Me $_{CONTROL}$: 8,25 pg/mL vs. $_{S0}$: 7,15 pg/mL vs. $_{S1}$: 8,24 pg/mL vs. $_{S2}$: 11,48 pg/mL vs. $_{S3}$: 9,13 pg/mL; p=0.6). Dodatkowo przeprowadzono analizę korelacji wśród wszystkich uczestników badania (n=96) pomiędzy parametrami oceniającymi stan kliniczny wątroby (CAP [dB/m], AST [U/L], ALT [U/L], GGPT [U/L], ALP [IU/L]) a stężeniem ocenianych adipokin, cytokin i żelatynaz w ślinie. W przypadku IL-6 nie odnotowano występowania istotnych statystycznie zależności. W związku z tym ślina prawdopodobnie nie jest odpowiednim materiałem biologicznym do oceny stężenia IL-6 u osób z NAFLD/MASLD. Jednakże badania innych autorów wskazują, że oznaczanie tej cytokiny w surowicy lub osoczu krwi może być przydatne w diagnostyce NAFLD/MASLD [41], a także w ocenie progresji tej choroby do niealkoholowego stłuszczeniowego zapalenia wątroby (NASH, *nonalcoholic steatohepatitis*)/MASH [42] oraz w rozpoznawaniu włóknienia wątroby [43].

W niniejszej pracy stwierdzono wyższe mediany stężeń IL-1β w grupach ze współistniejącym stłuszczeniem wątroby w porównaniu do grup bez stłuszczenia, a różnice pomiędzy grupami były istotne statystycznie (Me $_{CONTROL}$: 266,43 pg/mL vs. $_{S0}$: 275,48 pg/mL vs. $_{S1}$: 512,27 pg/mL vs. $_{S2}$: 411,30 pg/mL vs. $_{S3}$: 628,59 pg/mL; p=0,022). Ponadto wykazano istotną dodatnią zależność pomiędzy parametrem CAP a stężeniem tej cytokiny w ślinie (r=0,42; p<0,001), tzn. stężenie IL-1β w ślinie zwiększało się wraz z rozwojem stłuszczenia wątroby. Na podstawie analizy wyników można przypuszczać, że oznaczanie IL-1β w danym materiale biologicznym może znaleźć zastosowanie w rozpoznawaniu NAFLD/MASLD. Jednakże jest to pierwsze badanie oceniające potencjał diagnostyczny IL-1β w ślinie w kontekście tej jednostki chorobowej i niezbędne są dalsze badania, potwierdzające występowanie zależności pomiędzy stężeniem tej cytokiny w ślinie a rozwojem NAFLD/MASLD. Interleukina 1β odgrywa istotną rolę we wszystkich stadiach tej choroby. Cytokina ta promuje rozwój stłuszczenia wątroby przyczyniając się do akumulacji triglicerydów i cholesterolu w hepatocytach [44]. Ponadto uczestniczy w progresji do NASH/MASH poprzez wpływ na apoptozę hepatocytów, chemotaksję neutrofili, aktywację komórek gwiaździstych i wytwarzanie ciałek Mallory'ego [45]. W niniejszym badaniu nie różnicowano NAFLD i NASH, ale badania innych autorów (wykorzystujące surowicę lub osocze krwi jako materiał diagnostyczny) wykazały, że wzrost stężenia IL-1β był istotnie skorelowany z rozwojem zarówno stłuszczenia wątroby, stłuszczeniowego zapalenia, jak również włóknienia tego narządu [41]. Ponadto w innych badaniach stwierdzono istotnie wyższe stężenia tej cytokiny w przypadku NASH niż mniej zaawansowanego stadium NAFLD [42].

Statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami zaobserwowano również w wartościach median rezystyny (Me $_{CONTROL}$: 1,71 ng/mL vs. $_{S0}$: 3,35 ng/mL vs. $_{S1}$: 2,69 ng/mL vs. $_{S2}$: 2,65 ng/mL vs. $_{S3}$: 4,69 ng/mL; p=0,022). Stwierdzono również istotne statystycznie, dodatnie korelacje pomiędzy parametrem CAP a stężeniem rezystyny w ślinie (r=0,27; p=0,008), co oznacza wzrost tej adipokiny wraz ze zwiększaniem się stopnia stłuszczenia wątroby. Ponadto stężenie rezystyny w ślinie było istotnie dodatnio skorelowane ze stężeniami ALT (r=0,22; p=0,032) i GGTP (r=0,30; p=0,003) w surowicy. Wyniki te wskazują na możliwy potencjał diagnostyczny rezystyny. Jednakże w dotychczasowych badaniach nie analizowano związku między stężeniem rezystyny w ślinie oraz surowicy a NAFLD/MASLD, dlatego niezbędne są dalsze badania w tym kierunku. Uważa się, że wątroba jest miejscem docelowym działania rezystyny. Adipokina ta może uczestniczyć w rozwoju stanów zapalnych i insulinooporności wątrobowej, które odgrywają kluczową rolę w patogenezie MASLD [46].

Analiza wyników wykazała występowanie istotnych statystycznie różnic w stężeniach MMP-9 (Me $_{CONTROL}$: 265,80 ng/mL vs. $_{S0}$: 573 ng/mL vs. $_{S1}$: 522,90 ng/mL vs. $_{S2}$: 391,60 ng/mL vs. $_{S3}$: 369 ng/mL; p=0,022), gdzie w grupie kontrolnej zaobserwowano znacznie niższą medianę stężeń tej metaloproteinazy w porównaniu do grup badanych. Jednakże w grupach badanych najwyższą medianę stężeń MMP-9 odnotowano u osób z otyłością i bez stłuszczenia wątroby. Dodatkowo zauważono, że mediana stężeń MMP-9 wykazywała niższe wartości w grupach ze wzrastającym stopniem stłuszczenia wątroby. Nie odnotowano także występowania korelacji pomiędzy stężeniem tej żelatynazy a rozwojem stłuszczenia wątroby. Otrzymane wyniki świadczą, że MMP-9 może być charakterystyczna dla choroby otyłościowej, ale nie jest wskaźnikiem stłuszczenia wątroby. Według dostępnej literatury zmiany w ekspresji żelatynaz wpływają na proces fibrogenezy poprzez udział w degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej [47]. W związku z tym MMP-9 może być późnym markerem NAFLD/MASLD, tzn. identyfikować zwłóknienie wątroby, na co wskazują wyniki badań innych autorów (oceniające stężenie MMP-9 w surowicy krwi) [43, 48].

W niniejszej pracy odnotowano wyższe stężenia MMP-2 u osób ze stłuszczeniem wątroby w stosunku do pacjentów z prawidłowym stanem klinicznym wątroby (zarówno z prawidłową masą ciała jak również z otyłością), ale różnice te nie były istotne statystycznie (Me $_{CONTROL}$: 0,67 ng/mL vs. $_{S0}$: 0,80 ng/mL vs. $_{S1}$: 1,06 ng/mL vs. $_{S2}$: 1,02 ng/mL vs. $_{S3}$: 1,23 ng/mL; p=0,072). Jednakże stwierdzono, że wraz ze wzrostem stopnia stłuszczenia wątroby (ocenianym na podstawie parametru CAP) zwiększało się istotnie stężenie MMP-2 w ślinie. Korelacja ta była istotna statystycznie (r=0,37; p<0,001). Otrzymane wyniki świadczą

o możliwej przydatności diagnostycznej tej żelatynazy, oznaczanej w ślinie, w rozpoznawaniu NAFLD/MASLD we wcześniejszych stadiach (przed rozwojem włóknienia). W badaniach Yilmaz i wsp. (oceniających stężenie MMP-2 w surowicy) wykazano występowanie istotnych różnic w stężeniach MMP-2 pomiędzy grupami osób z NAFLD i bez NAFLD [49].

6.3. Evaluation of the diagnostic utility of selected serum adipokines and cytokines in subjects with MASLD – a pilot study (Ocena przydatności diagnostycznej wybranych adipokin i cytokin w surowicy u osób z MASLD – badanie pilotażowe) (P.3)

Celem kolejnej pracy badawczej z cyklu publikacji była ocena i porównanie stężeń wybranych adipokin i cytokin w surowicy krwi u osób z prawidłową masą ciała i otyłością, zróżnicowanych pod względem występowania MASLD, a także zbadanie potencjalnej przydatności adipokin i cytokin w diagnostyce tej choroby. Ponadto badania miały na celu określenie wartości granicznej dla zawartości tkanki tłuszczowej, przy której może rozwijać się stłuszczenie wątroby.

6.3.1. Grupa badana

Grupa wstępnie zakwalifikowanych do badania uczestników liczyła 120 osób (81 kobiet i 39 mężczyzn) – 79 osób stanowiło grupę badaną (z chorobą otyłościową), a 41 osób przyjęto do grupy kontrolnej (z prawidłową masą ciała). Jednakże liczebność grupy została zmniejszona do 107 osób (73 kobiet i 34 mężczyzn) z powodu rezygnacji pacjentów na kolejnych etapach badań i w konsekwencji brak materiału (surowicy krwi do oznaczania stężenia adipokin i cytokin) oraz kompletnych danych (wyniku badania elastograficznego). Grupa badana obejmowała 69 osób, a w skład grupy kontrolnej wchodziło 38 osób.

Następnie dokonano bardziej szczegółowego podziału na grupy na podstawie kryterium występowania MASLD w oparciu o najnowsze kryteria diagnostyczne [50]:

- Rozpoznanie stłuszczenia wątroby za pomocą badań obrazowych (w przypadku niniejszej pracy wykorzystano badanie elastograficzne wątroby) i co najmniej 1 z 5 kryteriów:

✓ BMI ≥25 kg/m² lub obwód talii >94 cm (mężczyźni) i >80 cm (kobiety);

✓ Stężenie glukozy w surowicy krwi na czczo ≥5,6 mmol/L [100 mg/dL] lub stężenie glukozy 2 godziny po OGTT ≥7,8 mmol/L [≥140 mg/dL];

✓ Ciśnienie tętnicze krwi ≥130/85 mmHg lub leczenie nadciśnienia tętniczego;

✓ Stężenie TG w osoczu ≥1,70 mmol/L (150 mg/dL) lub leczenie hipolipemizujące;

✓ Stężenie frakcji HDL cholesterolu w osoczu ≤1,0 mmol/l (40 mg/dl) (mężczyźni) i ≤1,3 mmol/l (50 mg/dl) (kobiety) lub leczenie hipolipemizujące.

Z grupy kontrolnej (którą miały stanowić osoby z prawidłowym stanem klinicznym wątroby) wyeliminowano 8 osób, spełniających kryteria MASLD. Ostateczna liczba uczestników wynosiła 99 osób (70 kobiet i 29 mężczyzn). Struktura grup była następująca: grupa G1 – osoby

z prawidłową masą ciała bez MASLD (n=30); grupa G2 – osoby z otyłością bez MASLD (n=11); grupa G3 – osoby z otyłością i MASLD (z niewielkim zwłóknieniem wątroby lub bez) (n=58).

6.3.2. Podsumowanie wyników badań i dyskusja

Grupy porównano pod względem stężenia w surowicy wybranych adipokin (adiponektyny, rezystyny), cytokin prozapalnych (TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-23), a także żelatynaz (MMP-2, MMP-9). Stwierdzono istotne statystycznie różnice w stężeniach interleukiny-6 pomiędzy obiema grupami bez MASLD – z prawidłową masą ciała i otyłością (Me $_{G1}$: 0,70 pg/mL vs. $_{G2}$: 1,53 ng/mL; p=0,025), a także pomiędzy grupą z prawidłową masą ciała bez MASLD a grupą z otyłością i MASLD (Me $_{G1}$: 0,70 pg/mL vs. $_{G2}$: 2,00 ng/mL; p<0,001). Natomiast nie odnotowano istotnych statystycznie różnic w stężeniu tej cytokiny pomiędzy obiema grupami z otyłością, zróżnicowanymi pod względem występowania MASLD (Me $_{G2}$:1,53 pg/mL vs. $_{G3}$:2,00 pg/mL p=0,953). Jednakże na wyniki przeprowadzonej analizy mogła wpłynąć ograniczona reprezentatywność danych, spowodowana nierówną liczebnością grup i małą próbą w grupie G2. Wyniki badań innych autorów są niejednoznaczne, ale w większości z nich wykazano związek podwyższonego stężenia interleukiny 6 w surowicy z występowaniem NAFLD albo bardziej zaawansowanego stadium tej choroby – NASH [41, 42, 51]. Wyniki niniejszego badania porównano do analiz, w których doboru uczestników i podziału na grupy dokonano na podstawie kryteriów rozpoznania NAFLD, ponieważ dotychczas nie przeprowadzono takich badań w aspekcie MAFLD. Natomiast 99% pacjentów z NAFLD spełnia kryteria MASLD [52]. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniach pozostałych ocenianych adipokin, cytokin i żelatynaz pomiędzy ocenianymi grupami.

Z uwagi na istotną rolę w patogenezie MASLD nieprawidłowej dystrybucji i nadmiernej zawartości tkanki tłuszczowej, insulinooporności oraz przewlekłego stanu zapalnego, przeprowadzono analizę wielowymiarową, która pozwoliła na ocenę korelacji ze stłuszczeniem wątroby jednocześnie wszystkich tych czynników. Wykonano 12 modeli regresji wielokrotnej (nasyconych oraz innych, uzyskanych metodą regresji krokowej wstecznej) dla zmiennej zależnej CAP [dB/m], oceniającej stłuszczenie wątroby (oddzielne modele dla kobiet i mężczyzn), gdzie zmiennymi niezależnymi były: całkowita zawartość tkanki tłuszczowej [%], VAT [cm^2], wskaźnik VAT/SAT, wskaźnik HOMA-IR oraz oceniane w tym badaniu adipokiny, cytokiny i żelatynazy. W modelach pełnych zaobserwowano, że wyższy stopień

stłuszczenia wątroby u kobiet był istotnie związany ze zwiększoną procentową zawartością tkanki tłuszczowej (β=3,779; p<0,001), wyższym wskaźnikiem HOMA-IR (β=6,371; p=0,010) oraz wyższym stężeniem IL-1β (β=17,783; p=0,007). Stwierdzono również, że wyższy stopień stłuszczenia wątroby korelował istotnie ze zwiększonym polem VAT (β=0,296; p<0,001) i wskaźnikiem HOMA-IR (β=5,563; p=0,030), a także podwyższonym stężeniem IL-6 (β=12,374; p<0,001) i IL-1β (β=17,861; p=0,009). Odnotowano również, że wyższy stopień stłuszczenia wątroby był istotnie skorelowany ze zwiększonym wskaźnikiem VAT/SAT (β=23,494; p<0,001) i wskaźnikiem HOMA-IR (β=7,172; p=0,007) oraz podwyższonym stężeniem IL-6 (β=16,354; p<0,001) i IL-1β (β=16,165; p=0,022), a także z obniżonym stężeniem MMP-2 (β= -0,093; p=0,039). Modele 3-czynnikowe potwierdziły istnienie takich zależności. Natomiast w grupie mężczyzn na podstawie modeli nasyconych stwierdzono istotny związek pomiędzy wyższym stopniem stłuszczenia wątroby a zwiększoną procentową zawartością tkanki tłuszczowej (β=3,160; p=0,008). Odnotowano też, że wyższy stopień stłuszczenia wątroby korelował ze zwiększonym polem VAT (0,303; p=0,016). Z kolei na podstawie modeli 3-czynnikowych zaobserwowano, że wyższy stopień stłuszczenia wątroby u mężczyzn był istotnie związany ze zwiększoną procentową zawartością tkanki tłuszczowej (β=3,496; p=0,001) i wyższym stężeniem IL-6 (β=19,275; p=0,017). Ponadto wyższy stopień stłuszczenia wątroby był istotnie skorelowany ze zwiększonym polem VAT (β=0,317; p<0,001) i wyższym stężeniem interleukiny 6 (β=22,752; p=0,006).

Występowanie zależności pomiędzy zwiększoną zawartością tkanki tłuszczowej i jej nieprawidłowym rozmieszczeniem, wyższymi wartościami wskaźnika insulinooporności oraz wyższymi stężeniami IL-6 i IL-1β a rozwojem stłuszczenia wątroby wskazało na możliwą przydatność diagnostyczną tych parametrów prozapalnych – IL-6 u kobiet i mężczyzn, a IL-1β – jedynie w przypadku kobiet. Cytokiny te są ważnymi mediatorami stanu zapalnego. Uczestniczą one w różnych szlakach zapalnych, które zakłócają sygnalizację insuliny m.in. poprzez aktywację kinaz wewnątrzkomórkowych, a także stymulują produkcję białka CRP w wątrobie (białka ostrej fazy, wytwarzanego w odpowiedzi na stany zapalne w organizmie) [41], a w konsekwencji prowadzą do rozwoju insulinooporności i nasilenia stanu zapalnego, a następnie do rozwoju MASLD i progresji do MASH. Inni autorzy w swoich badaniach uzyskali podobne wyniki, jednakże nie różnicowali grupy badanej ze względu na płeć. Analiza wieloczynnikowa w badaniach Jarrar i wsp. wykazała, że w grupie osób z NAFLD stężenie IL-6 w surowicy korelowało z wartościami wskaźnika HOMA-IR [53]. Z kolei wyniki badań Więckowskiej i wsp. wskazały, że wątrobowa ekspresja tej cytokiny była dodatnio skorelowana

z jej stężeniem w osoczu krwi, a także z rozwojem ogólnoustrojowej insulinooporności u osób z NAFLD [54]. Na podstawie przeglądu badań, przeprowadzonego przez Duana i wsp., zaobserwowano występowanie istotnego związku pomiędzy stężeniem IL-6 w surowicy i osoczu krwi a rozwojem NAFLD. W oparciu o wyniki przeglądu stwierdzono też istotną zależność pomiędzy stężeniem IL-1β w osoczu krwi a rozwojem NAFLD, NASH oraz włóknienia wątroby [41]. W niniejszym badaniu zaobserwowano u kobiet w jednym z modeli pełnych istotny związek pomiędzy stopniem stłuszczenia wątroby a wartościami wskaźników VAT/SAT i HOMA-IR oraz stężeniem MMP-2 w surowicy, jednakże nie odnotowano istotnej zależności dla tej żelatynazy w pozostałych modelach nasyconych oraz w modelach zredukowanych. Możliwe, że MMP-2 oznaczana w tym materiale diagnostycznym, wykazuje przydatność diagnostyczną dopiero w bardziej zaawansowanym stadium MASLD, tzn. na etapie włóknienia wątroby, co potwierdzają wyniki badań innych autorów [55, 56].

Przeprowadzono również analizę ROC w celu ustalenia punktów odcięcia dla parametrów tkanki tłuszczowej, związanych ze zwiększonym ryzykiem rozwoju stłuszczenia wątroby (ocenianego na podstawie parametru CAP). Analiza ta wykazała możliwą przydatność diagnostyczną u kobiet w przypadku całkowitej zawartości tkanki tłuszczowej (punkt odcięcia: 40,21%; AUC: 0,94; $p<0,001$), a u mężczyzn otrzymane wyniki nie były istotne statystycznie (punkt odcięcia: 26,85%; AUC: 0,77; $p=0,063$). Ariya i wsp. przeprowadzili podobne badanie, w którym grupą badaną byli Irańczycy, używając do oceny stopnia stłuszczenia wątroby również metodę VCTE, natomiast do oceny składu ciała wykorzystując metodę DXA. Punkt odcięcia dla całkowitej zawartości tkanki tłuszczowej wynosił 32,23% u kobiet i 26,73% - u mężczyzn [57]. Niniejsze badanie wykazało potencjalną wartość diagnostyczną w przypadku pola tkanki tłuszczowej wisceralnej, zarówno u kobiet (punkt odcięcia: 156 cm^2; AUC: 0,87, $p<0,001$), jak również u mężczyzn (punkt odcięcia: 155 cm^2; AUC: 0,80; $p=0,005$). Yu i wsp. oraz Le i wsp. również analizowali potencjał diagnostyczny tego parametru w kontekście diagnostyki stłuszczenia wątroby wykorzystując metodę CT zarówno do oceny stopnia stłuszczenia jak również pola wisceralnej tkanki tłuszczowej [58, 59]. Otrzymane punkty odcięcia różnią się znacznie w porównaniu do wyników badania własnego, ale jest to spowodowane m.in. różnicami w rozmieszczeniu tkanki tłuszczowej pomiędzy grupami etnicznymi. U Azjatów dochodzi do rozwoju zaburzeń metabolicznych przy mniejszej zawartości tkanki tłuszczowej niż w przypadku Europejczyków. W niniejszej pracy punkt odcięcia oceniono również dla wskaźnika VAT/SAT, dla którego u kobiet wykazano możliwy potencjał diagnostyczny (punkt odcięcia:

2,05; AUC: 0,75; p<0,001), a u mężczyzn otrzymane wyniki nie były istotne statystycznie (punkt odcięcia: 2,04; AUC: 0,58; p=0,591). Dotychczas nie przeprowadzono innych badań oceniających przydatność kliniczną tego wskaźnika w diagnostyce MASLD.

Ponadto analizę ROC przeprowadzono w celu wyznaczenia wartości wskaźnika HOMA-IR, które mogą wskazywać na rozwój stłuszczenia wątroby. Analiza wykazała możliwą przydatność diagnostyczną tego parametru zarówno u kobiet (punkt odcięcia: 1,81; AUC: 0,79; p<0,001), jak również u mężczyzn (punkt odcięcia: 1,91; AUC: 0,76; p=0,005). Motamed i wsp., przeprowadzając badanie w Iranie z wykorzystaniem metody USG do oceny stłuszczenia wątroby, ustalili 1,95 jako punkt odcięcia dla wskaźnika HOMA-IR u kobiet oraz 1,79 – u mężczyzn [60]. Natomiast Isokuortti i wsp. na podstawie badań populacyjnych przeprowadzonych w Finlandii określili 1,9 jako optymalny punkt odcięcia dla tego wskaźnika (niezależnie od płci). W badaniach wykorzystano do oceny stłuszczenia wątroby metodę protonowej spektroskopii rezonansu magnetycznego (HMRS, 1H magnetic resonance spectroscopy) [61]. Niezbędne są dalsze badania w tym kierunku, ponieważ dotychczas przeprowadzono niewiele takich analiz.

Konieczna jest weryfikacja otrzymanych punków odcięcia dla podanych parametrów na większej populacji z uwzględnieniem płci badanych. Ponadto zarówno w przypadku parametrów, dotyczących tkanki tłuszczowej, jak również dla wskaźnika HOMA-IR powinny być one ustalane indywidualnie dla każdej grupy etnicznej z uwagi na różnice w składzie ciała oraz różnice środowiskowe (styl życia i sposób żywienia, poziom aktywności fizycznej). Porównywanie ich bez uwzględnienia różnic etnicznych może prowadzić do błędnej interpretacji wyników i nieprawidłowej diagnozy MASLD. Jeżeli skuteczność otrzymanych punktów odcięcia zostanie potwierdzona kolejnymi badaniami to te pomiary mogą w przyszłości uzupełnić obecne metody rozpoznania MASLD, a nawet stać się elementem diagnostyki wstępnej, sygnalizując konieczność zastosowania bardziej zaawansowanej, ale mniej dostępnej w praktyce klinicznej diagnostyki. Jednoznaczne ustalenie miarodajnych punktów odcięcia może pomóc w identyfikacji pacjentów, wymagających interwencji terapeutycznej, jeszcze przed wystąpieniem zaawansowanych zmian w wątrobie. Ponadto otrzymane wyniki wskazują na konieczność uwzględnienia analizy składu ciała wraz z oceną stężenia glukozy oraz insuliny na czczo jako integralnego elementu systematycznych badań przesiewowych.

7. Ograniczenia badania

1. Ze względów finansowych w badaniu uwzględniono stosunkowo małą liczebność próby, czego konsekwencją była również mała liczebność grup. Z tego powodu w ogólnej charakterystyce nie dokonano podziału badanej populacji ze względu na płeć, który wydaje się być uzasadniony z uwagi na różnice w dystrybucji tkanki tłuszczowej oraz różnice hormonalne (hormony płciowe wpływają na regulację tkanki tłuszczowej, insulinowrażliwość oraz odpowiedź zapalną organizmu). Dopiero w analizie wieloczynnikowej oraz analizie krzywej ROC uwzględniono podział na płeć.

2. Badania przeprowadzono jedynie na grupie osób z MASLD w stosunkowo wczesnym stadium (ze stłuszczeniem wątroby, ale bez zwłóknienia tego narządu lub z niewielkim zwłóknieniem), co pozwoliło na zidentyfikowanie potencjalnych markerów rozwoju MASLD, ale nie progresji tej choroby.

3. Zastosowana metoda elastografii dynamicznej impulsowej umożliwia rozpoznanie stłuszczenia i zwłóknienia wątroby o różnym stopniu zaawansowania, ale nie pozwala na bezpośrednie wykrycie stanu zapalnego (może jedynie sugerować jego rozwój rozpoznając zaawansowane włóknienie). Jedyną metodą, która może jednoznacznie rozpoznać aktywny stan zapalny w wątrobie jest biopsja. Zróżnicowanie grupy badanej na osoby ze stłuszczeniem wątroby oraz osoby z MASH byłoby istotne, ponieważ stłuszczeniowe zapalenie wątroby jest związane z nasileniem stanu zapalnego oraz dysfunkcji metabolicznych i może wpływać na profil adipokin i cytokin, będących przedmiotem tego badania.

4. W niniejszym badaniu do wykonania analizy składu ciała wykorzystano wyłącznie metodę BIA. Zasadne wydaje się przeprowadzenie oceny zawartości tkanki tłuszczowej całkowitej, wisceralnej oraz podskórnej z użyciem metody DXA, CT czy MRI, ponieważ ocena pola tkanki tłuszczowej wisceralnej i podskórnej na wysokości pasa nie jest w pełni miarodajna przy szacowaniu wpływu tych tkanek na badane parametry.

8. Wnioski

1. Analiza wieloczynnikowa wykazała istotny związek pomiędzy rozwojem stłuszczenia wątroby a całkowitą zawartością tkanki tłuszczowej w ustroju oraz polem wisceralnej tkanki tłuszczowej (mierzonej metodą BIA).
2. Wykazano wartość diagnostyczną pomiaru pola wisceralnej tkanki tłuszczowej (punkty odcięcia) w rozpoznawaniu ryzyka rozwoju MASLD u obu płci.
3. Stwierdzono, że wśród badanych adipokin i cytokin w surowicy krwi, interleukina 6 była najsilniejszym predyktorem rozwoju MASLD u kobiet i mężczyzn, a interleukina 1β – wyłącznie u kobiet.
4. Analiza wyników wykazała, że wśród adipokin i cytokin ocenianych w ślinie, jedynie IL-1β, MMP-2 oraz rezystyna korelowały istotnie z występowaniem MASLD; wymaga to jednak potwierdzenia na większej grupie badanej.
5. Uzyskane wyniki wskazują na potrzebę kontynuacji badań na większej populacji z zastosowaniem podziału ze względu na płeć, a także z uwzględnieniem MASLD w różnych stadiach (stłuszczeniem wątroby, MASH oraz zwłóknieniem tego narządu), aby zidentyfikować adipokiny i cytokiny charakterystyczne dla poszczególnych etapów tej choroby.

9. Piśmiennictwo

1. World Health Organization. Obesity and overweight 2024; https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight (dostęp: 20.06.2024).
2. World Obesity Federation. Global Obesity Observatory: Ranking (% obesity by country), adults; https://data.worldobesity.org/tables/ranking-obesity-by-country-adults-1.pdf (dostęp: 20.06.2024).
3. World Obesity Federation. Global Obesity Observatory: Ranking (% obesity by country), children; https://data.worldobesity.org/tables/ranking-obesity-by-country-children-4.pdf (dostęp: 20.06.2024).
4. World Obesity Federation. World Obesity Atlas 2024; https://data.worldobesity.org/publications/WOF-Obesity-Atlas-v7.pdf (dostęp: 20.06.2024).
5. World Health Organization. International Classification of Diseases 10th Revision, Geneva 1992; https://icd.who.int/browse10/2019/en#/E66 (dostęp: 20.06.2024).
6. World Health Organization. International Classification of Diseases 11th Revision (ICD-11), Geneva 2019; https://icd.who.int/browse/2024-01/mms/en#149403041 (dostęp: 20.06.2024).
7. Jastreboff AM, Kotz CM, Kahan S, Kelly AS, Heymsfield SB. Obesity as a Disease: The Obesity Society 2018 Position Statement. Obesity (Silver Spring). 2019; 27(1): 7-9. doi:10.1002/oby.22378.
8. Quek J, Chan KE, Wong ZY, Tan C, Tan B, Lim WH i wsp. Global prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in the overweight and obese population: a systematic review and meta-analysis. Lancet Gastroenterol Hepatol. 2023; 8(1): 20-30. doi: 10.1016/S2468-1253(22)00317-X.
9. Wang H, Mehal W, Nagy LE, Rotman Y. Immunological mechanisms and therapeutic targets of fatty liver diseases. Cell Mol Immunol. 2021; 18(1): 73-91. doi: 10.1038/s41423-020-00579-3.
10. Zyśk B, Ostrowska L. Stłuszczeniowa choroba wątroby a otyłość. W: Gorczyca-Głowacka I, Tomasiewicz K, Wełnicki M (red.) Stłuszczeniowa choroba wątroby związana z zaburzeniami metabolicznymi w praktyce klinicznej. Medical Tribune, Warszawa 2024: 19-32.
11. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, Anstee QM, Targher G, Romero-Gomez M i wsp. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international

expert consensus statement. J Hepatol. 2020; 73(1): 202-209. doi:10.1016/j.jhep.2020.03.039.

12. Rinella ME, Lazarus JV, Ratziu V, Francque SM, Sanyal AJ, Kanwal F i wsp. NAFLD Nomenclature consensus group. A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. Hepatology. 2023; 78(6): 1966-1986. doi:10.1097/HEP.0000000000000520.
13. Pluta W, Dudzińska W, Lubkowska A. Metabolic Obesity in People with Normal Body Weight (MONW) - Review of Diagnostic Criteria. Int J Environ Res Public Health. 2022; 19(2): 624. doi: 10.3390/ijerph19020624.
14. Ye Q, Zou B, Yeo YH, Li J, Huang DQ, Wu Y i wsp. Global prevalence, incidence, and outcomes of non-obese or lean non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. Lancet Gastroenterol Hepatol. 2020; 5(8): 739-752. doi: 10.1016/S2468-1253(20)30077-7.
15. Mach T, Szczepanek M. Stłuszczeniowa choroba wątroby. W: Gajewski P (red.) Interna Szczeklika 2024. Medycyna Praktyczna, Kraków 2024: 1263-1268.
16. Makri E, Goulas A, Polyzos SA. Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis and Emerging Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Arch Med Res. 2021; 52(1): 25-37. doi:10.1016/j.arcmed.2020.11.010.
17. Nassir F. NAFLD: Mechanisms, Treatments, and Biomarkers. Biomolecules. 2022; 12(6): 824. doi: 10.3390/biom12060824.
18. Bąk-Sosnowska M, Białkowska M, Bogdański P, Chomiuk T, Dobrowolski P, Gałązka-Sobotka M i wsp. Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na otyłość 2024 – stanowisko Polskiego Towarzystwa Leczenia Otyłości. Med Prakt. wyd. specj. 2024: 1–116.
19. Harvey I, Boudreau A, Stephens JM. Adipose tissue in health and disease. Open Biol. 2020; 10(12): 200291. doi: 10.1098/rsob.200291.
20. Artemniak-Wojtowicz D, Kucharska AM, Pyrżak B. Obesity and chronic inflammation crosslinking. Cent Eur J Immunol. 2020; 45(4): 461-468. doi: 10.5114/ceji.2020.103418.
21. Wang H, Mehal W, Nagy LE, Rotman Y. Immunological mechanisms and therapeutic targets of fatty liver diseases. Cell Mol Immunol. 2021; 18(1): 73–91. doi: 10.1038/s41423-020-00579-3.
22. Nassir F. NAFLD: Mechanisms, Treatments, and Biomarkers. Biomolecules. 2022; 12(6): 824. doi: 10.3390/biom12060824.

23. Czechowska G., Celiński K, Wójcicka G. Mechanizm włóknienia wątroby – rola komórek gwiaździstych, stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego. Postepy Hig Med Dosw. 2019; 73: 421-439. doi: 10.5604/01.3001.0013.1974.
24. Dongiovanni P, Meroni M, Casati S, Goldoni R, Thomaz DV, Kehr NS i wsp. Salivary biomarkers: novel noninvasive tools to diagnose chronic inflammation. Int J Oral Sci. 2023; 15(1): 27. doi: 10.1038/s41368-023-00231-6.
25. Maciejczyk M, Mil KM, Gerreth P, Hojan K, Zalewska A, Gerreth K. Salivary cytokine profile in patients with ischemic stroke. Sci Rep. 2021; 11(1): 17185. doi: 10.1038/s41598-021-96739-0.
26. Maltron International Ltd. BioScan 920 User Guide. Essex, UK, 2014.
27. Janczewska E, Pisula A, Simon K. Recommendations for elastography-based imaging of liver. Prz Epidemiol. 2015; 69: 317–321.
28. Wong VW, Vergniol J, Wong GL, Foucher J, Chan HL, Le Bail B i wsp. Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology. 2010; 51(2): 454-62. doi: 10.1002/hep.23312.
29. Karlas T, Petroff D, Garnov N, Böhm S, Tenckhoff H, Wittekind C i wsp. Non-invasive assessment of hepatic steatosis in patients with NAFLD using controlled attenuation parameter and 1H-MR spectroscopy. PLoS One. 2014; 9(3): e91987. doi: 10.1371/journal.pone.0091987.
30. Karlas T, Petroff D, Sasso M, Fan JG, Mi YQ, de Lédinghen V i wsp. Individual patient data meta-analysis of controlled attenuation parameter (CAP) technology for assessing steatosis. J Hepatol. 2017; 66(5) :1022-1030. doi: 10.1016/j.jhep.2016.12.022.
31. de Lédinghen V, Vergniol J, Foucher J, Merrouche W, Le Bail B. Non-invasive diagnosis of liver steatosis using controlled attenuation parameter (CAP) and transient elastography. Liver Int. 2012; 32(6): 911-8. doi: 10.1111/j.1478-3231.2012.02820.x.
32. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia. 1985; 28(7): 412-419. doi: 10.1007/BF00280883.
33. Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G i wsp. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. J Clin Endocrinol Metab. 2000; 85(7): 2402-2410. doi: 10.1210/jcem.85.7.6661.
34. Navazesh M. Methods for collecting saliva. Ann N Y Acad Sci. 1993; 694: 72-77. doi: 10.1111/j.1749-6632.1993.tb18343.x.

35. Mamali I, Roupas ND, Armeni AK, Theodoropoulou A, Markou KB, Georgopoulos NA. Measurement of salivary resistin, visfatin and adiponectin levels. Peptides 2012; 33(1): 120–124. doi: 10.1016/j.peptides.2011.11.007.
36. Thanakun S, Watanabe H, Thaweboon S, Izumi Y. Comparison of salivary and plasma adiponectin and leptin in patients with metabolic syndrome. Diabetol Metab Syndr. 2014; 6(1): 19. doi: 10.1186/1758-5996-6-19.
37. Hannah WN Jr, Harrison SA. Noninvasive imaging methods to determine severity of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology. 2016; 64(6): 2234-2243. doi: 10.1002/hep.28699.
38. Fracanzani AL, Valenti L, Bugianesi E, Andreoletti M, Colli A, Vanni E i wsp. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. Hepatology. 2008; 48(3): 792-8. doi: 10.1002/hep.22429.
39. Skelly MM, James PD, Ryder SD. Findings on liver biopsy to investigate abnormal liver function tests in the absence of diagnostic serology. J Hepatol. 2001; 35(2): 195-9. doi: 10.1016/s0168-8278(01)00094-0.
40. Mofrad P, Contos MJ, Haque M, Sargeant C, Fisher RA, Luketic VA i wsp. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. Hepatology. 2003; 37(6): 1286-92. doi: 10.1053/jhep.2003.50229.
41. Duan Y, Pan X, Luo J, Xiao X, Li J, Bestman PL i wsp. Association of Inflammatory Cytokines With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Front Immunol. 2022; 13: 880298. doi: 10.3389/fimmu.2022.880298.
42. Hadinia A, Doustimotlagh AH, Goodarzi HR, Arya A, Jafarinia M. Circulating Levels of Pro-inflammatory Cytokines in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Non-Alcoholic Steatohepatitis. Iran J Immunol. 2019; 16(4): 327-333. doi: 10.22034/IJI.2019.80284.
43. Goyale A, Jain A, Smith C, Papatheodoridi M, Misas MG, Roccarina D i wsp. Assessment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) severity with novel serum-based markers: A pilot study. PLoS One. 2021; 16(11): e0260313. doi: 10.1371/journal.pone.0260313.
44. Mirea AM, Tack CJ, Chavakis T, Joosten LAB, Toonen EJM. IL-1 Family Cytokine Pathways Underlying NAFLD: Towards New Treatment Strategies. Trends Mol Med. 2018; 24(5): 458-471. doi: 10.1016/j.molmed.2018.03.005.

45. Maciejewska D, Stachowska E. Niealkoholowe stłuszczenie wątroby (NAFLD) – epidemia XXI wieku. Postępy Hig Med Dosw. 2018; 72: 659-670; file:///C:/Users/UMB/Downloads/0000034171_wcag-2.pdf (dostęp: 30.09.2024).
46. Bekaert M, Verhelst X, Geerts A, Lapauw B, Calders P. Association of recently described adipokines with liver histology in biopsy-proven non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review. Obes Rev. 2016; 17(1): 68-80. doi: 10.1111/obr.12333.
47. Barchuk M, Schreier L, Berg G, Miksztowicz V. Metalloproteinases in non-alcoholic fatty liver disease and their behavior in liver fibrosis. Horm Mol Biol Clin Investig. 2018; 41(1): /j/hmbci.2020.41.issue-1/hmbci-2018-0037/hmbci-2018-0037.xml. doi: 10.1515/hmbci-2018-0037.
48. Livzan MA, Akhmedov VA, Krolevets TS, Gaus OV, Cherkaschenko NA. Informativnost' neinvazivnykh markerov fibroza pecheni u patsientov s nealkogol'noi zhirovoi bolezn'yu pecheni (The informative value of non-invasive liver fibrosis markers in patients with nonalcoholic fatty liver disease). Ter Arkh. 2016; 88: 62–68.
49. Yilmaz Y, Eren F. Serum biomarkers of fibrosis and extracellular matrix remodeling in patients with nonalcoholic fatty liver disease: association with liver histology. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2019; 31(1): 43-46. doi: 10.1097/MEG.0000000000001240.
50. Rinella ME, Lazarus J, Ratziu V, Francque SM, Sanyal AJ, Kanwal F i wsp. A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. Hepatology 2023; 78(6): 1966–1986. doi: 10.1097/HEP.0000000000000520.
51. Fontes-Cal TCM, Mattos RT, Medeiros NI, Pinto BF, Belchior-Bezerra M, Roque-Souza B i wsp. Crosstalk Between Plasma Cytokines, Inflammation, and Liver Damage as a New Strategy to Monitoring NAFLD Progression. Front Immunol. 2021; 12: 708959. doi: 10.3389/fimmu.2021.708959.
52. Hagström H, Vessby J, Ekstedt M, Shang Y. 99% of patients with NAFLD meet MASLD criteria and natural history is therefore identical. J Hepatol. 2024; 80(2): e76-e77. doi: 10.1016/j.jhep.2023.08.026.
53. Jarrar MH, Baranova A, Collantes R, Ranard B, Stepanova M, Bennett C i wsp. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. Aliment Pharmacol Ther. 2008; 27(5): 412-21. doi: 10.1111/j.1365-2036.2007.03586.x.
54. Wieckowska A, Papouchado BG, Li Z, Lopez R, Zein NN, Feldstein AE. Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. Am J Gastroenterol. 2008; 103(6): 1372-1379. doi: 10.1111/j.1572-0241.2007.01774.x.

55. Ando W, Yokomori H, Tsutsui N, Yamanouchi E, Suzuki Y, Oda M i wsp. Serum matrix metalloproteinase-1 level represents disease activity as opposed to fibrosis in patients with histologically proven nonalcoholic steatohepatitis. Clin Mol Hepatol. 2018; 24(1): 61-76. doi: 10.3350/cmh.2017.0030.
56. Munsterman ID, Kendall TJ, Khelil N, Popa M, Lomme R, Drenth JPH i wsp. Extracellular matrix components indicate remodelling activity in different fibrosis stages of human non-alcoholic fatty liver disease. Histopathology. 2018; 73(4): 612-621. doi: 10.1111/his.13665.
57. Ariya M, Koohpayeh F, Ghaemi A, Osati S, Davoodi SH, Razzaz JM i wsp. Assessment of the association between body composition and risk of non-alcoholic fatty liver. PLoS One. 2021; 16(4): e0249223. doi: 10.1371/journal.pone.0249223.
58. Yu P, Yang H, Qi X, Bai R, Zhang S, Gong J i wsp. Gender differences in the ideal cutoffs of visceral fat area for predicting MAFLD in China. Lipids Health Dis. 2022; 21(1): 148. doi: 10.1186/s12944-022-01763-2.
59. Lee S, Kim KW, Lee J. Sex-specific Cutoff Values of Visceral Fat Area for Lean vs. Overweight/Obese Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Asians. J Clin Transl Hepatol. 2022; 10(4): 595-599. doi: 10.14218/JCTH.2021.00379.
60. Motamed N, Miresmail SJ, Rabiee B, Keyvani H, Farahani B, Maadi M i wsp. Optimal cutoff points for HOMA-IR and QUICKI in the diagnosis of metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease: A population based study. J Diabetes Complications. 2016; 30(2): 269-74. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2015.11.019.
61. Isokuortti E, Zhou Y, Peltonen M, Bugianesi E, Clement K, Bonnefont-Rousselot D i wsp. Use of HOMA-IR to diagnose non-alcoholic fatty liver disease: a population-based and inter-laboratory study. Diabetologia. 2017; 60(10): 1873-1882. doi: 10.1007/s00125-017-4340-1.

10. Streszczenie w języku polskim

Stłuszczeniowa choroba wątroby związana z zaburzeniami metabolicznymi (MASLD) jest jednym z najczęstszych powikłań choroby otyłościowej. Rozpoznanie MASLD jest problematyczne z uwagi na często bezobjawowy przebieg tej choroby we wczesnym stadium. Uznane metody diagnostyczne, tj. biopsja wątroby, ultrasonografia, elastografia dynamiczna impulsowa, tomografia komputerowa czy rezonans magnetyczny, nie są dostępne w ramach rutynowej diagnostyki. Z uwagi na istotną rolę tkanki tłuszczowej wisceralnej (VAT) i całkowitej w patogenezie MASLD można rozważyć wykorzystanie pomiaru zawartości i pola tkanki tłuszczowej za pomocą metody impedancji bioelektrycznej (BIA) do rozpoznania zwiększonego ryzyka rozwoju tej choroby. Ponadto ocena stanu zapalnego w ustroju oraz stężenia adipokin/cytokin może zostać zastosowana w diagnostyce zaburzeń metabolicznych w otyłości i MASLD.

Rozprawa doktorska składa się z trzech publikacji. Pierwsza z nich jest pracą przeglądową, w której przedstawiono aktualny stan wiedzy w zakresie roli wybranych adipokin i cytokin w patogenezie choroby otyłościowej. Analiza dostępnej literatury naukowej i dotychczas przeprowadzonych badań wykazała możliwy potencjał diagnostyczny niektórych adipokin i cytokin w rozpoznawaniu otyłości oraz wskazała na możliwość wykorzystania śliny jako materiału biologicznego do oznaczania tych markerów. Dodatkowo przegląd ten ujawnił niedostatecznie zbadany obszar, jakim jest ocena przydatności diagnostycznej adipokin oraz cytokin w surowicy i ślinie w kontekście MASLD. Te ustalenia stanowiły podstawę do przeprowadzenia badań własnych, których celem była ocena związku między zawartością i rozmieszczeniem tkanki tłuszczowej a rozwojem stłuszczenia wątroby, a także analiza korelacji wybranych adipokin i cytokin w surowicy oraz ślinie u osób z MASLD.

Uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej UMB na przeprowadzenie badań. Do udziału w nich zakwalifikowano kobiety i mężczyzn w zakresie wiekowym 20–55 lat z otyłością pierwotną I i II stopnia oraz osoby z prawidłową masą ciała. Uczestnikom wykonano podstawowe pomiary antropometryczne oraz analizę składu ciała metodą BIA i oceniono pole tkanki tłuszczowej na wysokości pasa. Przeprowadzono również pomiar sztywności i stłuszczenia wątroby, wykorzystując metodę elastografii dynamicznej impulsowej (VCTE). Od każdej osoby pobrano próbki krwi żylnej, a surowicę użyto do przeprowadzenia badań biochemicznych krwi oraz do oznaczenia stężenia adiponektyny, rezystyny, czynnika martwicy nowotworu α (TNF-α), interleukiny 6 (IL-6), interleukiny 1β (IL-1β), interleukiny 23 (IL-23)

oraz metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej 2 (MMP-2) i metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej 9 (MMP-9). Następnie od uczestników pobrano próbki śliny i oznaczono stężenie rezystyny, wisfatyny, TNF-α, IL-6, IL-1β, MMP-2 i MMP-9. Wyniki opracowano w programie Statistica 13.3.

Druga praca z cyklu publikacji jest pracą badawczą, której celem była ocena stężenia wybranych prozapalnych adipokin i cytokin w niestymulowanej ślinie u pacjentów z otyłością i stłuszczeniem wątroby w różnych stadiach (bez włóknienia lub z niewielkim włóknieniem) oraz analiza tych parametrów pod kątem możliwości ich zastosowania jako wczesnych markerów NAFLD/MASLD. Uczestników podzielono na 5 grup na podstawie kryterium wskaźnika masy ciała (BMI) oraz występowania stłuszczenia wątroby i stopnia jego zaawansowania. Stwierdzono istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi grupami w medianach stężeń IL-1β oraz rezystyny w ślinie. Ponadto wykazano, że wraz z rozwojem stłuszczenia wątroby (ocenianym za pomocą parametru CAP) zwiększało się istotnie stężenie IL-1β, rezystyny oraz MMP-2 w ślinie.

Celem kolejnej pracy badawczej była ocena i porównanie stężenia adipokin i cytokin w surowicy u osób z prawidłową masą ciała i osób z otyłością, zróżnicowanych pod względem występowania MASLD, analizując potencjalną przydatność tych parametrów w diagnostyce. Ponadto badanie miało na celu ustalenie wartości granicznej dla zawartości tkanki tłuszczowej w organizmie, związanej ze zwiększonym ryzykiem rozwoju stłuszczenia wątroby. Dokonano podziału uczestników na 3 grupy pod względem kryterium BMI i występowania MASLD. Na podstawie 12 modeli regresji wielorakiej zaobserwowano łącznie, że wyższy stopień stłuszczenia wątroby u kobiet był istotnie związany ze zwiększoną procentową zawartością tkanki tłuszczowej, zwiększonym polem VAT oraz wyższymi wskaźnikami VAT/SAT i HOMA-IR, a także podwyższonym stężeniem IL-6 i IL-1β. W grupie mężczyzn stwierdzono istotny związek pomiędzy wyższym stopniem stłuszczenia wątroby a zwiększoną procentową zawartością tkanki tłuszczowej oraz polem VAT i wyższym stężeniem IL-6. Określono również punkty odcięcia dla parametrów tkanki tłuszczowej, wskazujące na zwiększone prawdopodobieństwo rozwoju stłuszczenia wątroby.

Analiza wieloczynnikowa wykazała istotny związek pomiędzy rozwojem stłuszczenia wątroby a całkowitą zawartością tkanki tłuszczowej w ustroju oraz polem wisceralnej tkanki tłuszczowej (mierzonej metodą BIA). Wykazano wartość diagnostyczną pomiaru pola wisceralnej tkanki tłuszczowej (punkty odcięcia) w rozpoznawaniu ryzyka rozwoju MASLD

u obu płci. Stwierdzono, że wśród badanych adipokin i cytokin w surowicy krwi, interleukina 6 była najsilniejszym predyktorem rozwoju MASLD u kobiet i mężczyzn, a interleukina 1β – wyłącznie u kobiet. Analiza wyników wykazała, że wśród adipokin i cytokin ocenianych w ślinie, jedynie IL-1β, MMP-2 oraz rezystyna korelowały istotnie z występowaniem MASLD; wymaga to jednak potwierdzenia na większej grupie badanej. Uzyskane wyniki wskazują na potrzebę kontynuacji badań na większej populacji z zastosowaniem podziału ze względu na płeć, a także z uwzględnieniem MASLD w różnych stadiach (stłuszczeniem wątroby, MASH oraz zwłóknieniem tego narządu), aby zidentyfikować adipokiny i cytokiny charakterystyczne dla poszczególnych etapów tej choroby.

11. Streszczenie w języku angielskim

Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) is one of the most common complications of obesity. Its early stages are frequently asymptomatic, making diagnosis challenging. Established diagnostic techniques—such as liver biopsy, ultrasonography, dynamic pulse elastography, computed tomography, and magnetic resonance imaging – are not typically available for routine screening. Considering the significant role of both visceral (VAT) and total adipose tissue in the development of MASLD, quantifying adipose tissue content and distribution using bioelectrical impedance analysis (BIA) could serve as a useful tool for identifying individuals at elevated risk. Additionally, evaluating systemic inflammation and the levels of specific adipokines and cytokines may aid in diagnosing metabolic disorders associated with obesity and MASLD.

This doctoral dissertation comprises three publications. The first is a review article that summarizes the current state of knowledge regarding the role of selected adipokines and cytokines in the pathogenesis of obesity. A comprehensive analysis of the scientific literature and existing studies suggested that certain adipokines and cytokines might hold diagnostic potential for obesity, and it highlighted the possibility of using saliva as a biological matrix for assessing these markers. Moreover, the review identified a relatively unexplored area – assessing the diagnostic utility of these markers in both serum and saliva in the context of MASLD. These findings provided the research foundation, which aimed to evaluate the relationship between adipose tissue content/distribution and hepatic steatosis development, as well as to examine correlations between selected adipokines and cytokines in serum and saliva among individuals with MASLD.

The study received ethical approval from the MUB Bioethics Committee. Participants included men and women aged 20–55 years with primary obesity (first and second degree) as well as individuals with normal weight. Subjects underwent standard anthropometric measurements and body composition analysis via BIA, with waist fat area assessed accordingly. Liver stiffness and steatosis were measured using dynamic pulse elastography (VCTE). Venous blood samples were collected from all participants. The serum was used for biochemical parameters concentration analysis. Furthermore, it has been used to determine concentrations of adiponectin, resistin, tumor necrosis factor α (TNF-α), interleukin 6 (IL-6), interleukin 1β (IL-1β), interleukin 23 (IL-23), extracellular matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9.

Saliva samples were also collected to determine the levels of resistin, visfatin, TNF-α, IL-6, IL-1β, MMP-2, and MMP-9. Data were analyzed using Statistica 13.3 software.

The second research study in this series of publications evaluated selected pro-inflammatory adipokines and cytokines in unstimulated saliva from patients with obesity and hepatic steatosis at varying stages (with minimal or no fibrosis), assessing these parameters for their potential as early markers of NAFLD/MASLD. Participants were divided into five groups based on body mass index (BMI) and the presence and severity of hepatic steatosis. Statistically significant differences emerged between the groups regarding the median salivary concentrations of IL-1β and resistin. Moreover, salivary levels of IL-1β, resistin, and MMP-2 were found to increase significantly with the progression of hepatic steatosis, as evaluated by the CAP parameter.

The subsequent study aimed to evaluate and compare serum adipokine and cytokine concentrations in normal-weight and obese subjects differentiated by MASLD, while also assessing the potential diagnostic utility of these parameters. In addition, the study sought to establish a cutoff value for body fat content associated with an increased risk of developing hepatic steatosis. Participants were categorized into three groups according to BMI and the presence of MASLD. Using a combination of 12 multiple regression models, it was observed that in women, a higher degree of hepatic steatosis was significantly associated with increased percent body fat, a larger VAT area, elevated VAT/SAT and HOMA-IR ratios, as well as higher levels of IL-6 and IL-1β. In men, a significant association was found between more severe liver steatosis and increased percent body fat, a larger VAT area, and higher IL-6 concentrations. Cutoff points for adipose tissue parameters determined to indicate an increased likelihood of developing liver steatosis were also established.

Multivariate analysis demonstrated a significant association between the development of hepatic steatosis and both total body fat and the visceral adipose tissue area (measured by BIA). The diagnostic value of assessing the visceral adipose tissue area (using defined cutoff points) for evaluating the risk of developing MASLD in both sexes was confirmed. Among the adipokines and serum cytokines examined, interleukin 6 emerged as the strongest predictor of MASLD in both men and women, while interleukin 1β was predictive only in women. Analysis of the results further indicated that among the adipokines and cytokines assessed in saliva, only IL-1β, MMP-2, and resistin correlated significantly with the presence of MASLD; however, these findings require confirmation in a larger cohort. Overall, the results emphasize

the need for further studies involving larger populations with gender-specific analyses and including the full spectrum of MASLD stages (from fatty liver disease to MASH and hepatic fibrosis) to identify adipokines and cytokines specific to each stage of the disease.

12. Publikacje stanowiące rozprawę doktorską

12.1. Publikacja przeglądowa (P.1)

International Journal of *Molecular Sciences*

MDPI

Review

Salivary Adipokine and Cytokine Levels as Potential Markers for the Development of Obesity and Metabolic Disorders

Beata Zyśk *, Lucyna Ostrowska and Joanna Smarkusz-Zarzecka

Department of Dietetics and Clinical Nutrition, Medical University of Białystok, Ul. Mieszka I 4B, 15-054 Białystok, Poland; lucyna.ostrowska@umb.edu.pl (L.O.); joanna.smarkusz-zarzecka@umb.edu.pl (J.S.-Z.)
* Correspondence: beata.zysk@umb.edu.pl

Abstract: Currently, the number of people suffering from obesity is increasing worldwide. In addition, the disease is affecting younger individuals. Therefore, it is essential to search for new diagnostic methods and markers for early assessment of the risk of obesity, metabolic disorders, and other comorbidities. The discovery of the secretory function of adipose tissue and coexistence of low-grade chronic inflammation with obesity set a new direction in this disease diagnosis using the assessment of the concentration of inflammatory markers secreted by adipose tissue. The aim of this review was to determine, based on previous findings, whether saliva can be useful in the diagnosis of obesity and its early metabolic complications and whether it can be an alternative diagnostic material to serum.

Keywords: obesity markers; obesity diagnostics; adipokines; cytokines; saliva

check for updates

Citation: Zyśk, B.; Ostrowska, L.; Smarkusz-Zarzecka, J. Salivary Adipokine and Cytokine Levels as Potential Markers for the Development of Obesity and Metabolic Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11703. https://doi.org/10.3390/ijms222111703

Academic Editors: Marianna Lauricella and Antonella D'Anneo

Received: 10 September 2021
Accepted: 24 October 2021
Published: 28 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Obesity has become a global problem of the 21st century. The World Health Organization (WHO) defines obesity as "the excessive accumulation of body fat in the body that can lead to impaired health" [1]. The latest WHO estimates showed that in 2016, more than 1.9 billion adults worldwide had excessive body weight (representing about 39% of the population), and 650 million of them were obese (13%). Between 1975 and 2016, the prevalence of obesity nearly tripled worldwide. In addition, obesity affects younger individuals. According to the WHO, in 2016, more than 350 million children and adolescents between 5 and 19 years old were found to be overweight, of which more than 124 million were obese, and in 2019 38.2 million children under 5 had excessive body weight [2].

Previous studies have shown that normal BMI values may be accompanied by an abnormal metabolic profile (metabolically obese normal weight—MONW) and, conversely, a high BMI is not always associated with the presence of metabolic disorders (metabolically healthy obese—MHO). Metabolic obesity is therefore difficult to diagnose and often recognized only when late complications occur [3–5]. It is of utmost importance to search for new diagnostic methods and new markers for early assessment of the risk of obesity and associated metabolic disorders so that preventive and therapeutic measures can bring the best results. A patient's saliva analysis may prove to be a valuable innovation in the assessment of metabolic parameters due to the speed of collection, non-invasiveness, and lower cost of the test.

The aim of this review was to determine, based on previous findings, whether saliva can be useful in the diagnosis of obesity and its early metabolic complications, and to evaluate the potential markers (adipokines and/or cytokines) present in saliva.

2. The Role of Adipose Tissue in the Development of Obesity

The following types of adipose tissue can be distinguished in the human body: white (WAT, white adipose tissue), brown (BAT—brown adipose tissue), beige (BRITE—brown-in-white), and pink (PAT—pink adipose tissue). Each type shows a morphological and functional specificity. WAT plays an important role in the induction of inflammation and

the development of metabolic disorders. Based on its anatomical location, it can be divided into visceral (VAT) and subcutaneous (SAT) adipose tissue [5,6].

The analysis of WAT deposits in terms of adipocyte growth and metabolism, angiogenesis capacity, insulin response, and adipokine and cytokine profile shows that VAT is more prone to elicit a proinflammatory response compared to SAT. VAT correlates with a higher risk of developing metabolic disorders, regardless of the BMI [4,7]. The effect of SAT on cardiometabolic risk depends on its location. Subcutaneous adipose tissue in the lower parts of the body, i.e., the gluteal subcutaneous adipose tissue (gSAT) have a protective effect and reduce these risks [4,8]. However, the results of studies on the function of abdominal subcutaneous adipose tissue (aSAT) are inconclusive [9–12]. The reason for this may be that the researchers considered only total aSAT and did not divide it into superficial and deep layers. These compartments differ in obesity at the morphological and molecular levels. Therefore, they may play a different role in the development of complications of obesity [4,13].

The development of inflammation in obesity is a result of several components, including cellular stress, excess free fatty acids and reactive oxygen species, increased lipolysis, and inadequate blood flow and hypoxia of adipocytes or their increased apoptosis, as well as increased plasma levels of lipopolysaccharide endotoxin (LPS). LPS is formed in excess in intestinal dysbiosis, which occurs in most obese patients [4,14].

During excessive energy supply, compensatory mechanisms are triggered, including the release of inflammatory mediators to stimulate adipose tissue to store more triglycerides and prevent ectopic lipid deposition. In the initial stages, it is a physiological response. However, with prolonged positive energy balance and developing obesity, the pathological proliferation of adipocytes occurs in WAT, followed by adipocyte dysfunction and activation of mechanisms leading to inflammation. Chronic low-grade inflammation develops [4]. Previous studies confirm that larger waist circumference and higher values of the BMI and WHR indices are associated with elevated serum C-reactive protein (CRP, a marker of inflammation) levels regardless of age, gender, or ethnicity [15]. A statistically significant positive relationship between BMI and salivary CRP levels was observed [16].

Not only adipocytes, but also preadipocytes, macrophages, eosinophils, mast cells, suppressor cells of myeloid origin, T lymphocytes, B lymphocytes, and fibroblasts are involved in the induction of inflammation [5]. Obesity is characterized by a significant influx of macrophages into adipose tissue. There are two extreme polarities of macrophages, i.e., M1 (classical) and M2 (alternative). Type M1 macrophages are characteristic of the adipose tissue of obese patients. This type of macrophages induces inflammation and insulin resistance by secreting the proinflammatory cytokines, including tumor necrosis factor α (TNF-α), and the interleukins IL-6, IL-12, and IL-23. In contrast, type M2 predominates in the adipose tissue of metabolically healthy, normal-weight individuals. M2-type macrophages have an opposite role to M1, namely, they protect against the development of inflammation and insulin resistance and participate in repair processes of damaged tissues. Their mechanism of action involves the secretion of IL-10, an anti-inflammatory adipokine, in significant amounts, while reducing the synthesis of pro-inflammatory interleukins, such as IL-12 and IL-23 [14,17].

Activation of M1 occurs in response to pro-inflammatory stimuli, which are the pro-inflammatory cytokines, including TNF-α and interferon γ (IFNγ), secreted by type 1 helper (Th1) lymphocytes. On the other hand, type 2 helper lymphocytes (Th2), which are characterized by high expression of anti-inflammatory interleukins i.e., IL-4, IL-13 are involved in the activation of M2 [14,17]. In addition, some adipose tissue cells (eosinophils, T-regulatory cells), adipose tissue influx cells (myeloid-derived suppressor cells—MDSCs), and other factors (peroxisome proliferator-activated receptors—PPARs) can influence macrophage polarization toward M2 and inhibit the development of inflammation and insulin resistance in adipose tissue. Other adipose tissue cells including B lymphocytes and $CD8^+$ T lymphocytes influence the differentiation of macrophages into M1 type, so they promote the development of inflammation. $CD4^+$ T lymphocytes can be divided into

lymphocytes that promote inflammation (Th1 and Th17) and those that inhibit inflammatory responses (Th2). Mast cells, on the other hand, secrete IL-6 and IFNγ, so they have a pro-inflammatory effect [17].

Adipokines and cytokines, secreted by the WAT cells of obese patients, are mostly proinflammatory in nature. They can exhibit not only paracrine and autocrine effects, but also endocrine effects, and thus consequently affect the state and function of other tissues and the body as a whole. Proinflammatory adipokines and cytokines are a contributing factor to the development of a number of metabolic complications, including atherogenic dyslipidemia, hypertension, insulin resistance, type 2 diabetes, atherosclerosis, and non-alcoholic fatty liver disease. In contrast, adipokines with anti-inflammatory properties reduce cardiovascular risk [4,14,17].

The increased amount of adipose tissue in obese people, as well as its dysfunction, causes growth the release of free fatty acids. The increase in the concentration of free fatty acids (FFA) in the plasma contributes to the development of insulin resistance as well as the activation of the pro-inflammatory NF-κB pathway and the secretion of pro-inflammatory cytokines. The low-grade inflammation that develops in this way leads to the development of obesity-related metabolic disorders, such as non-alcoholic fatty liver disease or the formation of atherosclerotic lesions [18].

3. Saliva as a Potential Material in the Diagnosis of Obesity and Its Associated Disorders

The discovery of the secretory function of adipose tissue and the coexistence of low-grade chronic inflammation with obesity set a new direction in its diagnosis. It shows the possibility of evaluation of the concentration of inflammatory markers and inflammatory cytokines secreted by adipose tissue in the diagnostic process. Currently, the most common method is the determination of inflammatory markers in serum. However, blood biomarkers in saliva have been identified in obese subjects, so it is possible that saliva could be used as an alternative diagnostic material to serum. Saliva consists of water, electrolytes, different proteins, enzymes, and antibacterial substances [19]. Studies have shown a correlation between the concentration of inflammatory markers in serum and saliva. An earlier study by Tvarijonaviciute et al. showed a statistically significant strong positive correlation ($r = 0.770$, $p < 0.001$) between serum and salivary CRP levels [16], while another study confirmed a statistically significant moderate positive correlation ($r = 0.441$, $p = 0.003$) between serum and salivary resistin levels [20]. In the study of Thanakun et al., a statistically significant weak positive correlation was shown ($r = 0.211$, $p = 0.018$) between adiponectin levels in the given diagnostic materials but has not been shown for leptin [21]. Biomarkers enter saliva through passive diffusion, synthesis, and secretion through the salivary gland or ultrafiltration from the blood. As a result, the changes in their salivary concentration in relation to the serum may be delayed. Therefore, sometimes the biomarkers in saliva are not significantly correlated with those in serum [19].

In recent years, the relationship between salivary concentrations of selected adipokines and cytokines and obesity has been analyzed. The conducted research has shown that assessment of the salivary concentration of the following adipokines and cytokines may be considered for use in the diagnosis of obesity: adiponectin, leptin, resistin, waspin, interleukin 1β (IL-1β), IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α, monocyte chemotactic factor, CD40/CD40L, as well as other inflammatoey markers such as matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), plasminogen activator inhibitor (PAI-1), soluble intercellular adhesion molecule 1 (sICAM-1), and pentraxin 3 (PTX3).

Adiponectin is a multimeric protein with a molecular size of 30 kDa that is mainly secreted by adipocytes of WAT. When properly secreted, adiponectin increases insulin sensitivity and protects against the development of insulin resistance and type 2 diabetes. Its beneficial effects on glucose metabolism and insulin action are associated with activation of AMP-activated kinase (AMPK) in the liver and muscle. In addition, it prevents vascular endothelial apoptosis through a pathway involving AMPK and exhibits anti-atherosclerotic effects. Furthermore, it is suspected that adiponectin participates in the control of inflam-

matory processes by modulating macrophage function. The lower concentration of this anti-inflammatory adipokine in adipose tissue and blood in obese compared to healthy subjects is due to inhibition of its production by released proinflammatory cytokines, as well as hypoxic conditions and oxidative stress [17,22]. Therefore, in the light of recent knowledge, salivary adiponectin concentrations may be lower in obese compared to normal-weight individuals. The results of Attlee et al. showed a statistically significant weak negative correlation ($r = -0.28$, $p < 0.05$) between salivary adiponectin levels and BMI among adult women. A statistically significant weak negative correlation ($r = -0.28$, $p < 0.05$) was also observed between salivary adiponectin levels and salivary TNF-α. In contrast, a statistically significant weak positive correlation ($r = 0.37$, $p < 0.001$) was shown between higher BMI and higher salivary TNF-α levels. The above results indicate that in the context of chronic inflammation associated with obesity, salivary concentrations of adiponectin and TNF-α should be analyzed simultaneously [23]. However, some of the studies conducted did not show statistically significant differences between salivary adiponectin levels in normal-weight and obese individuals [24]. Thankun et al. analyzed the correlation between salivary adiponectin levels and the components of metabolic syndrome in adults. No correlations were found [21]. In the studies of Kalyani et al., a decrease in the concentration of adiponectin in saliva was observed in the group of adults with newly diagnosed type 2 diabetes as compared to healthy people without diagnosed diabetes. These differences were statistically significant. In addition, the authors of the study found a statistically significant moderate negative correlation in patients with newly diagnosed type 2 diabetes between salivary adiponectin levels and postprandial blood glucose levels ($r = -0.422$, $p = 0.02$). However, no correlation was found between the concentration of this adipokine in saliva and glycosylated hemoglobin (HbA1C) and high-sensitivity CRP (hs-CRP) [25]. Moreover, Goodson et al. showed statistically significant decreased salivary adiponectin levels among children whose centile grids indicated the presence of obesity and who did not have elevated CRP levels (relative to normal-weight children) [26].

Another marker that may have applications in the diagnosis of obesity is waspin (serpin A12). It belongs to the serpin family, serine protease inhibitors. It was first identified in 2000 in the VAT of rats with obesity and type 2 diabetes. In humans, it is produced in the liver, adipose tissue, skeletal muscle, pancreas, and skin. Waspin has been shown to decrease food intake and contribute to the reduction of proinflammatory adipokines by inhibiting inflammatory processes, which may improve insulin sensitivity. Obese individuals had higher serum waspin levels compared to healthy ones. In contrast, weight reduction resulted in decreased serum waspin levels. The increase in waspin levels may have a compensatory function in obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes [27]. In a study by Lehmann-Kalata et al., obese individuals without comorbidities had significantly higher salivary serpin A12 levels compared to overweight and normal-weight individuals. Salivary waspin levels monitoring may be helpful in the diagnosis of insulin resistance and other metabolic disorders. In addition, a high diagnostic power of the composite parameter [TNFR1] × [serpin A12] was observed, which can help in the diagnosis of metabolic obesity (it consists of multiplied tumor necrosis factor receptor 1 and serpin A12) [28]. The number of studies on waspin and its relation to obesity is small, hence the need for further research to evaluate the potential use of this anti-inflammatory marker for the diagnosis of obesity and its comorbidities.

IL-10 is a key anti-inflammatory mediator. The results show a correlation between the presence of obesity and comorbid metabolic disorders and reduced levels of this cytokine. Studies show that it can either promote M2-type macrophage activity in adipose tissue or act directly on adipocytes and consequently reduce their inflammatory response. However, the functions of this cytokine in the context of adipose tissue regulation and its therapeutic value in obesity require further research [29]. Attlee et al. observed a weak negative, non-statistically significant correlation ($r = -0.20$, $p > 0.05$) between salivary IL-10 levels and waist circumference and very weak negative, non-statistically significant correlation ($r = -0.17$, $p > 0.05$) between salivary levels of this cytokine and BMI in the

adult population [23]. Moreover, other studies have shown a reduction (not statistically significant) in the mean salivary levels of this cytokine in patients diagnosed with metabolic syndrome compared to controls. There was also a statistically significant weak negative correlation ($r = -0.331$, $p < 0.05$) between salivary IL-10 levels and serum triglyceride levels [30]. In addition, Goodson et al. have found statistically significant decreased salivary IL-10 levels among children with obesity and without elevated CRP levels compared to normal-weight children [24,26]. The results of Selvaraju et al. showed that the concentration of this cytokine was 7.6-fold lower in overweight or obese children compared to normal weight children, but these differences were not statistically significant [31]. In the above studies, a trend was observed in which decreased levels of IL-10 in saliva correlate with excess body weight, increased waist circumference, elevated serum triglycerides, and the occurrence of metabolic syndrome. In contrast, due to the fact that the relationships demonstrated in the above studies are not statistically significant, the decreased levels of IL-10 in saliva cannot be unequivocally defined as a marker of metabolic obesity. The data results indicate the need for further research in this direction.

The CD40/CD40L complex is a cytokine that is involved in inflammatory processes in some autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis and systemic lupus. In addition, it has been shown that this marker may have applications in the diagnosis of Sjogren's syndrome. In contrast, Lehmann et al. conducted a study looking at the relationship between salivary levels of this cytokine and obesity. They observed that lower sCD40L concentrations were associated with a higher risk of developing obesity and established a cut-off point (a potential prognostic marker for this disease could be a salivary sCD40L concentration < 3.28 pg/mL) [32]. However, further research in this direction is needed.

Leptin is a peptide hormone, secreted mainly by adipose tissue cells, which is involved in weight control by regulating food intake and energy expenditure. Leptin exhibits the ability to move across the blood-brain barrier, thereby exerting anorexigenic effects on the hypothalamic centers of satiety and hunger via the arcuate nucleus. High concentrations of leptin trigger a feeling of satiety (anorexic effect), while low concentrations stimulate appetite (orexigenic effect). It also modulates sympathetic activity-dependent vasoconstriction and endothelial release of nitric oxide and angiotensin II-dependent vasoconstriction, thereby controlling blood pressure in healthy individuals. Obesity induces organ-specific leptin resistance. It is most likely due to impaired passage of leptin across the blood-brain barrier or from inhibition of the intracellular leptin signaling pathway. Therefore, despite the high concentration of leptin in the body, its effect on vascular function is impaired. Leptin resistance and obesity-induced hyperleptinemia may be factors in the development of atherosclerosis. However, in the clinical setting, the importance of hyperleptinemia as a mediator of cardiovascular risk appears to be low. Martin et al. conducted a study regarding the effect of high leptin levels on the increased risk of cardiovascular disease, but they did not report an association. In addition, leptin resistance can affect reproductive function and cause hypogonadism [17,33,34]. Jayachandran et al., conducting a study among normal-weight and overweight adolescent and adult women, found higher salivary leptin concentrations in overweight subjects [35]. Thankun et al. reported no correlation between salivary leptin levels and components of metabolic syndrome in adults [21]. In contrast, the results of Goodson et al. showed significantly elevated salivary leptin levels in obese children with coexisting elevated serum CRP levels compared to normal weight children without elevated CRP [26]. Pirsean et al. observed 3-fold higher leptin levels in overweight or obese children compared to normal-weight children. In addition, the authors analyzed the occurrence of correlation between salivary leptin and IL-6 concentrations. However, salivary concentrations of the inflammatory mediators in question were not correlated [19]. Not all studies to date have shown significant differences between salivary leptin levels in normal-weight and obese subjects, which requires further research [24].

Another adipokine whose determination in saliva may be helpful in the diagnosis of obesity and comorbid disorders is resistin. In humans, it is mainly secreted by macrophages. According to available scientific data, this adipokine is involved in the pathogenesis

of inflammation. Excessively high levels of resistin lead to the development of insulin resistance and type 2 diabetes. It also affects vascular endothelial dysfunction, smooth muscle cell proliferation in blood vessels, arterial inflammation, and foam cell formation, and consequently also predisposes to atherosclerosis. In addition, it may be associated with hypertension and atherogenic dyslipidemia [36]. In the study by Lehmann-Kalata et al., subjects with BMI > 30 kg/m^2 had higher salivary resistin levels compared to subjects with BMI < 30 kg/m^2 [28]. Al-Rawi et al. observed a statistically significant correlation (p = 0.007) between salivary resistin levels and BMI. Salivary resistin levels were higher in obese patients (both in the diabetic and non-diabetic groups) compared to those without diabetes and with BMI < 30 kg/m^2. In contrast, there was no statistically significant correlation (p = 0.051) between salivary levels of this adipokine and fasting blood glucose levels [37]. Dogusal et al. observed no significant differences between salivary resistin levels in obese and normal-weight children. In contrast, they found a statistically significant moderate positive correlation (r = 0.567, $p \leq 0.01$) between resistin and TNF-α levels in the saliva [38]. In a study by Selvaraju et al., conducted in a pediatric population, significantly 2.4-fold higher salivary levels of this adipokine were found in overweight and obese children compared to normal-weight children [31].

One of the most important proinflammatory mediators is TNF-α, which is secreted by adipocytes and/or peripheral tissues. TNF-α induces the development of inflammation by participating in the generation of reactive oxygen species and activation of various transcriptional pathways. Elevated levels of this cytokine interfere with insulin signaling through serine phosphorylation, leading to the development of insulin resistance in adipocytes and peripheral tissues and type 2 diabetes [39]. The results of Attlee et al. indicate that there are statistically significant weak positive correlations between salivary TNF-α levels and waist circumference (r = 0.31, $p < 0.001$) and BMI (r = 0.37, $p < 0.001$) in adults [23]. In the study by Lehmann-Kalata et al., subjects with BMI > 30 kg/m^2 had higher salivary TNF-α and TNF-α-R1 (TNF-α receptor 1) levels compared to subjects with BMI < 30 kg/m^2, indicating that TNF-α levels are increased in obesity [28]. The results of a subsequent study by this author et al. showed a significant difference in median TNF-α-R1 and TNF-α-R2 concentrations between subjects with BMI > 30 kg/m^2 and controls (with BMI < 25 kg/m^2), where TNF-α receptors concentrations were significantly higher in obese subjects [32]. Ostrowska et al. reported statistically significant strong positive correlations (r = 0.645, p = 0.005) between salivary TNF-α levels and BMI and statistically significant moderate positive correlations (r = 0.499, p = 0.041) between salivary levels of this cytokine and waist circumference. In addition, they also found statistically significant moderate positive correlations between salivary levels of this cytokine and amount of body fat [kg] (r = 0.556, p = 0.021) and VAT [cm^3] (r = 0.557, p = 0.020) and also statistically significant strong positive correlations (r = 0.624, p = 0.007) between salivary TNF-α levels and VAT/SAT ratio [40]. Moreover, Chauhan et al. showed that the mean salivary TNF-α levels were significantly higher in patients with metabolic syndrome than in controls. In addition, they observed that salivary levels of this cytokine correlated significantly moderate positively with fasting plasma glucose levels (r = 0.433, $p < 0.05$), significantly moderate positively with triglyceride levels (r = 0.494, $p < 0.01$), and significantly moderate negatively with HDL cholesterol fraction levels (r= −0.490, $p < 0.01$). They also found a significant increase in TNF-α levels with an increase in the number of components of the metabolic syndrome [30]. In addition, a study by Selvaraju et al. in children showed significantly 1.5-fold higher salivary TNF-α levels in overweight and obese children compared to normal-weight children [31]. However, Doğusal et al. not have shown an association between salivary TNF-α levels and obesity [38]. Nevertheless, the strong evidence on the relationship between the concentration of TNF-a in saliva and obesity presented in the above studies and the relatively large number of these studies indicate that the concentration of TNF-a measured in saliva is a good marker of the development of obesity and its associated metabolic disorders.

IL-6 is a cytokine that is characterized by multidirectional effects that depend on various factors. The source of expression of this cytokine determines the nature of the inflammatory response. IL-6 secreted by muscle tissue in response to exercise inhibits adipose tissue macrophage (ATM) accumulation. In contrast, this cytokine secreted by adipocytes in response to the development of obesity increases macrophage accumulation in adipose tissue [41]. A study by Pirsean et al. found that salivary IL-6 levels were 4.5-fold higher in overweight or obese children compared to normal weight children. In addition, the child with the highest degree of obesity (>99th percentile) had the highest salivary IL-6 concentrations (98 ng/mL) in the entire study group [19]. Furthermore, in a study by Selvaraju et al., conducted in a pediatric population, salivary levels of this cytokine were found to be 3.4-fold higher in overweight and obese children compared to normal weight children [31]. However, Goodson et al. did not show significant differences between salivary IL-6 levels in normal weight and obese children [26].

The next interleukin that has been shown to be associated with obesity is IL-8. This cytokine is secreted predominantly by visceral adipocytes but also by macrophages. It is involved in modulating the inflammatory response. IL-8 is an interleukin involved in neutrophil chemotaxis, and its secretion is increased in obesity. Neutrophils in adipose tissue secrete chemokines and cytokines, which facilitate macrophage infiltration and may ultimately contribute to insulin resistance [42]. In a study by Ostrowska et al., salivary IL-8 levels were significantly higher among obese women compared to normal-weight women. In addition, the researchers found a statistically significant moderate positive correlation between salivary IL-8 concentration and BMI ($r = 0.494$, $p = 0.044$), amount of body fat [kg] ($r = 0.535$, $p = 0.027$) and percentage body fat [%] ($r = 0.512$, $p = 0.036$) [40].

IL-1β is involved in the development of insulin resistance, coexisting with obesity. This cytokine is mainly secreted by macrophages. Causes decreased insulin sensitivity of adipose tissue by inhibiting insulin signal transduction. The adverse effects of IL1β on insulin signaling in adipocytes may be related to an increase in the inflammatory response, particularly increased cytokine/chemokine production [43]. The results of Tvarijonaviciute et al. showed that salivary IL-1β levels were 2.6-fold higher in overweight/obese children compared to normal-weight children [16].

Monocyte chemotactic protein (MCP-1/CCL2) is likely involved in both the early and late phases of atherosclerosis. Moreover, MCP-1 may be a predictor of atherosclerosis-related cardiovascular events. This chemokine promotes the development of inflammatory processes at the cellular, plasma, and tissue levels and is secreted mainly by macrophages, as well as endothelial cells, but in smaller amounts also by adipocytes. MCP-1, through binding to the CCR2 receptor, initiates a number of signaling pathways that are responsible for regulating chemotactic activation and migration of target cells [44]. The results of Lehmann-Kalata et al. showed that obese adults without comorbidities had significantly higher salivary concentrations of this proinflammatory cytokine compared to overweight and normal-weight subjects [28]. Another study by this author showed such an association compared to normal-weight only subjects as well [32]. In a study in which children were the study group, significantly 4.4-fold higher salivary MCP-1 levels were found in overweight and obese children compared to normal weight children [31]. However, there are studies, conducted on a relatively large group of children, where no such correlation was found [24,26].

MMP-2 belongs to a group of proteolytic enzymes called metalloproteinases and is synthesized by various cell types, including endothelial cells, vascular smooth muscle cells, monocytes, or macrophages. It plays an important role in vascular remodeling. Therefore, it may be a potential marker for the development of atherosclerosis and cardiovascular disease [45]. In a study by Ostrowska et al., salivary MMP-2 levels were significantly higher among obese women compared to normal weight women. Moreover, statistically significant very strong positive correlations were observed between salivary MMP-2 levels and BMI ($r = 0.806$, $p = 0.000$) and amount of body fat [kg] ($r = 0.804$, $p = 0.000$). In addition, the researchers found statistically significant strong positive correlations between salivary

levels of this metalloproteinase and waist circumference ($r = 0.796$, $p = 0.000$), percent body fat [%] ($r = 0.794$, $p = 0.000$) VAT [cm^3] ($r = 0.646$, $p = 0.005$) and VAT/SAT ratio ($r = 0.701$, $p = 0.002$) [40].

According to available data, PAI-1 can influence the physiopathological mechanisms of many metabolic disorders and diseases. It is produced by adipocytes, macrophages, monocytes, platelets, hepatocytes, fibroblasts, and vascular smooth muscle cells. In obesity, elevated levels of PAI-1 are observed, which further contributes to the development of adipose tissue. In addition, it may affect the development of cerebral vascular thrombotic diseases [46]. In a study by Lehmann-Kalata et al., adults with a BMI > 30 kg/m^2 and no comorbidities had significantly higher PAI-1 levels compared with those with BMI < 30 kg/m^2 [28]. The authors also included other inflammatory markers in their study that may play an important role in obesity. They observed that there were higher levels of sICAM in the saliva of obese subjects compared to overweight and normal-weight subjects, which may reflect an increased risk of leukocyte (especially monocyte) adhesion to the vascular endothelium in these subjects, resulting in the formation of foam cells in atherosclerotic plaques. They also found significantly higher salivary PTX3 levels in obese subjects compared to controls (overweight and normal-weight subjects). PTX3 is a marker used to assess cardiovascular complications and the development of atherosclerosis [28]. Other studies showed a significant increase in the concentration of sICAM and PTX3 in the saliva of obese people compared to people with normal body weight [32]. Undoubtedly, these inflammatory markers require further study in terms of their potential use in the diagnosis of obesity.

In the above-cited studies, in which the study group consisted of children, 2–3 mL of saliva was collected. For adults, 5 mL of saliva was collected. In addition, in some studies, saliva was collected for a specified period of time (5 to 20 min) and the amount excreted was calculated in milliliters per minute. The saliva was collected from the morning hours to 1 p.m. In some studies, patients had to fast at the time of saliva collection, and in some studies, they had to maintain an adequate interval between food intake and collecting saliva (from 30 min to 2 h). In some studies, patients were asked to rinse their mouths before collecting saliva. During the study, the patients sat upright with the torso tilted forward. The most common type was the collection of unstimulated saliva. However, oral inflammation has not been ruled out in all studies, which may affect the levels of adipokines and cytokines in saliva.

Due to the important role of free fatty acids in the development of inflammation in obesity and its accompanying metabolic disorders, it is possible that the concentration of FFA in saliva may be a potential marker of metabolic obesity. So far, studies have been conducted in which FFA was measured in saliva, but not in the aspect of obesity [47]. Therefore, carrying out studies consisting in the determination of FFA in the saliva of obese people in the future could lead to interesting results and help in the diagnosis of obesity.

A summary of the studies cited in the review are presented in Table 1, Table 2 and Figure 1.

Table 1. Summary of the studies cited in the review, which showed a correlation between the levels of selected adipokines and cytokines in saliva and the diagnostic parameters of obesity and its accompanying metabolic disorders.

Diagnostic Parameters of Obesity and Metabolic Disorders	The Levels of Adipokine/Cytokine in Saliva							
	Adiponectin	IL-10	Resistin	TNF-α	IL-8	MMP-2	Study Cited	Age Group
↑ BMI [kg/m^2]	↓ * ▪▪	↓ ▪		↑ * ▪▪			Attlee et al. [23]	A
			↑ * (no data)				Al-Rawi et al. [37]	A
				↑ * ▪▪▪▪	↑ * ▪▪▪	↑ * ▪▪▪▪▪	Ostrowska et al. [40]	A
↑ WC [cm]		↓ ▪▪		↑ * ▪▪			Attlee et al. [23]	A
				↑ * ▪▪▪		↑ * ▪▪▪▪	Ostrowska et al. [40]	A
↑ BFM [kg]				↑ * ▪▪▪	↑ * ▪▪▪	↑ * ▪▪▪▪▪	Ostrowska et al. [40]	A
↑ PBF [%]					↑ * ▪▪▪	↑ * ▪▪▪▪	Ostrowska et al. [40]	A
↑ VAT [cm^3]				↑ * ▪▪▪		↑ * ▪▪▪▪	Ostrowska et al. [40]	A
↑ VAT/SAT ratio				↑ * ▪▪▪▪		↑ * ▪▪▪▪	Ostrowska et al. [40]	A
↑ FPG [mg/dl]				↑ * ▪▪▪			Chauhan et al. [30]	A
↑ PPBS [mg/dl]	↓ * ▪▪▪						Kalyani et al. [25]	A
↑ TG [mg/dl]		↓ * ▪▪		↑ * ▪▪▪			Chauhan et al. [30]	A
↓ HDL [mg/dl]				↓ * ▪▪▪			Chauhan et al. [30]	A
Salivary TNF-α levels	↓ * ▪▪						Attlee et al. [23]	A
			↑ * ▪▪▪				Dogusal et al. [38]	Ch

Age group: A—adult, Ch—children; BMI—body mass index; WC—waist circumference; BFM—body fat mass; PBF—percent body fat; VAT—visceral adipose tissue; SAT—subcutaneous adipose tissue; FPG—fasting plasma glucose; PPBS—postprandial blood sugar; TG—triglycerides; HDL-high-density lipoprotein cholesterol; *—statistically significant correlation ($p < 0.05$); The strength of correlation: ▪▪▪▪▪ very strong (r = 0.80–1.00); ▪▪▪▪ strong (r = 0.60–0.79); ▪▪▪ moderate (r = 0.40–0.59); ▪▪ weak (r = 0.20–0.39); ▪ very weak ($r \leq 19$).

Table 2. Summary of the studies cited in the review, which showed a differences in the levels of adipokines/cytokines in saliva in the study and control groups.

The Levels of Adipokine/Cytokine in Saliva	Study Cited	Age Group	Differences between the Study Group and the Control Group	*p*-Value
Adipone-ctin	Kaluani et al. [25]	A	decreased adiponectin levels in the group with newly diagnosed type 2 diabetes as compared to group without diabetes;	0.04 *
	Goodson et al. [26]	Ch	decreased adiponectin levels among obese group without elevated CRP levels (relative to normal-weight group);	<0.0004 *
Waspin (serpin A12)	Lehmann-Kalata et al. [28]	A	higher waspin levels among obese group without comorbidities compared to overweight and normal weight people;	0.000004 *
IL-10	Chauhan et al. [30]	A	decreased IL-10 levels in patients diagnosed with metabolic syndrome compared to controls;	>0.05
	Goodson et al. [26]	Ch	decreased IL-10 levels among obese group without elevated CRP levels (relative to normal-weight group);	<0.0004 *
	Selvaraju et al. [31]	Ch	7.6-fold lower IL-10 concentration in overweight or obese group compared to normal weight group;	>0.05
CD40/CD40L	Lehmann et al. [32]	A	lower sCD40L concentrations in obese adults compared to normal weight subjects;	<0.001 *
Leptin	Jayachan-dran et al. [35]	A	higher leptin concentrations in overweight group;	<0.01 *
	Goodson et al. [26]	Ch	elevated leptin levels in obese group with coexisting elevated serum CRP levels compared to normal weight group without elevated CRP;	<0.0004 *
	Pirsean et al. [19]	Ch	3-fold higher leptin levels in overweight or obese group compared to normal weight group;	<0.01 *
Resistin	Al-Rawi et al. [37]	A	higher resistin levels in obese patients (both in the diabetic and non-diabetic groups) compared to those without diabetes and obesity;	0.01 *
	Selvaraju et al. [31]	Ch	2.4-fold higher resistin levels in overweight and obese subjects compared to normal weight subjects;	<0.0001 *
	Lehmann-Kalata et al. [28]	A	higher resistin levels in subjects with BMI > 30 kg/m^2 compared to subjects with BMI < 30 kg/m^2;	0.013 *
TNF-a	Lehmann-Kalata et al. [28]	A	higher TNF-α levels and higher TNF-a-R1 levels in subjects with BMI > 30 kg/m^2 compared to subjects with BMI < 30 kg/m^2;	0.002 * 0.0003 *
	Lehmann et al. [32]	A	higher TNF-a receptors concentrations in obese subjects compared to normal weight subjects;	<0.001 * TNF-α-R1 0.02 * TNF-α-R2

Table 2. *Cont.*

The Levels of Adipokine/Cytokine in Saliva	Study Cited	Age Group	Differences between the Study Group and the Control Group	*p*-Value
TNF-α	Chauhan et al. [30]	A	higher TNF-α levels in patients with metabolic syndrome than in controls; increase in TNF-α levels with an increase in the number of components of the metabolic syndrome;	<0.05 *
	Selvaraju et al. [31]	Ch	1.5-fold higher TNF-α levels in overweight and obese children compared to normal weight children;	<0.001 *
IL-6	Pirsean et al. [19]	Ch	4.5-fold higher IL-6 levels in overweight or obese children compared to normal weight children; the highest IL-6 concentrations (98 ng/mL) in the entire study group in the child with the highest degree of obesity (>99th percentile);	<0.01 *
	Selvaraju et al. [31]	Ch	3.4-fold higher IL-6 levels in overweight and obese children compared to normal weight children;	<0.001 *
IL-8	Ostrowska et al. [40]	A	higher IL-8 levels among obese women compared to normal weight women;	0.042 *
IL-1β	Tvarijona-viciute et al. [16]	Ch	2.6-fold higher IL-1β levels in overweight/obese children compared to normal weight children;	0.028 *
MCP-1/CCL2	Lehmann-Kalata et al. [28]	A	higher MCP-1 concentrations in obese adults without comorbidities compared to overweight and normal weight subjects;	0.032 *
	Lehmann et al. [32]	A	higher MCP-1 concentrations in obese adults without comorbidities compared to normal weight subjects;	<0.001 *
	Selvaraju et al. [31]	Ch	4.4-fold higher MCP-1 levels in overweight and obese subjects compared to normal weight subjects;	<0.0001 *
MMP-2	Ostrowska et al. [40]	A	higher MMP-2 levels among obese women compared to normal weight women;	0.005 *
PAI-1	Lehmann-Kalata et al. [28]	A	higher PAI-1 levels in people with a BMI > 30 kg/m^2 and no comorbidities compared with those with BMI < 30 kg/m^2;	0.007 *
sICAM	Lehmann-Kalata et al. [28]	A	higher sICAM levels of obese subjects compared to overweight and normal weight subjects;	0.007 *
	Lehmannet al. [32]	A	higher sICAM levels of obese subjects compared to normal weight subjects;	<0.001
PTX3	Lehmann-Kalata et al. [28]	A	higher PTX3 levels in obese subjects compared to overweight and normal weight subjects;	0.021 *
	Lehmannet al. [32]	A	higher PTX3 levels in obese subjects compared to normal weight subjects;	0.006 *

Age group: A—adult; Ch—children; *—statistically significant correlation ($p < 0.05$).

Figure 1. Potential markers of obesity and its accompanying metabolic disorders.

4. Conclusions

With the increasing prevalence of abnormal metabolic profiles and comorbidities of obesity in younger age groups, as in adults, it is very important to look for new diagnostic methods of obesity. The results of the cited studies, which showed a reciprocal correlation between serum concentrations of adipokines and cytokines and their salivary concentrations, demonstrate that the assessment of these markers in saliva can be not only an additional diagnostic method but also an alternative method to their assessment in serum, which can be applied to adults as well as children and adolescents. A major advantage of saliva as a diagnostic material is that it is non-invasive, which is important especially in children because of their common fear of blood sampling. However, for the results to be reliable, periodontal diseases, caries, and other oral diseases that may affect the levels of adipokines and cytokines in saliva should be ruled out.

Previous studies have identified adipokines and pro- and anti-inflammatory cytokines associated with the development of obesity as well as some metabolic disorders. The results of the presented research indicate that it may be reasonable to use the assessment of salivary concentrations of TNF-α in the diagnosis of obesity and its associated disorders and diseases. Moreover, the studies have shown that a decreased concentration of adiponectin and interleukin 10 and an increased concentration of leptin, resistin, interleukin 6, and MCP-1 could be a potential marker of obesity and its accompanying disorders. However, due to inconclusive results, more research is required in this direction. Disparate data may result from, among other things, selecting a small study group or analyzing the concentration of single markers. In addition, single studies were conducted for waspin, CD40/CD40L complex, interleukin 8, MMP-2, PAI-1, sICAM, and PTX3. However, due to the fact that results are promising, further research in this direction seems advisable. Undoubtedly, establishing reference values for specific adipokines and cytokines in saliva would enable better diagnosis of obesity and monitoring of the health status of overweight or obese individuals. In addition, further research should be pursued to evaluate the intercorrelations of adipokines and cytokines in saliva.

Author Contributions: Conceptualization, B.Z. and L.O.; writing—original draft preparation, B.Z.; writing—review and editing, B.Z., L.O. and J.S.-Z.; visualization, B.Z., L.O. and J.S.-Z.; supervision, L.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. World Health Organization. *Preventing and Managing the Global Epidemic*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1998.
2. World Health Organization. Obesity and Overweight. 2020. Available online: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight (accessed on 4 March 2021).
3. Wang, B.; Zhuang, R.; Luo, X.; Yin, L.; Pang, C.; Feng, T.; You, H.; Zhai, Y.; Ren, Y.; Zhang, L.; et al. Prevalence of Metabolically Healthy Obese and Metabolically Obese but Normal Weight in Adults Worldwide: A Meta-Analysis. *Horm. Metab. Res.* **2015**, *47*, 839–845. [CrossRef] [PubMed]
4. Hill, H.; Solt, C.; Foster, M.T. Obesity associated disease risk: The role of inherent differences and location of adipose depots. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **2018**, *33*. [CrossRef]
5. Murawska-Ciałowicz, E. Tkanka tłuszczowa-charakterystyka morfologiczna i biochemiczna różnych depozytów. *Postęp. Hig. Med. Dosw.* **2017**, *71*, 466–484.
6. European Commission CORDIS. Terapeutyczna Brunatna Tkanka Tłuszczowa w Walce z Otyłością. Available online: https://cordis.europa.eu/article/id/92120-therapeutic-brown-fat-to-tackle-obesity/pl (accessed on 19 September 2021).
7. Bilir, B.E.; Güldiken, S.; Tunçbilek, N.; Demir, A.M.; Polat, A.; Bilir, B. The effects of fat distribution and some adipokines on insulin resistance in subjects with prediabetes. *Endokrynol. Pol.* **2016**, *67*, 277–282. [PubMed]
8. Karpe, F.; Pinnick, K.E. Biology of upper-body and lower-body adipose tissue—Link to whole-body phenotypes. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2015**, *11*, 90–100. [CrossRef]
9. Rønn, P.F.; Andersen, G.S.; Lauritzen, T.; Christensen, D.L.; Aadahl, M.; Carstensen, B.; Grarup, N.; Jørgensen, M.E. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue and associations with cardiometabolic risk in Inuit, Africans and Europeans: A cross-sectional study. *BMJ Open* **2020**, *10*, e038071. [CrossRef] [PubMed]
10. Matsha, T.E.; Ismail, S.; Speelman, A.; Hon, G.M.; Davids, S.; Erasmus, R.T.; Kengne, A.P. Visceral and subcutaneous adipose tissue association with metabolic syndrome and its components in a South African population. *Clin. Nutr. ESPEN* **2019**, *32*, 76–81. [CrossRef]
11. Lee, J.J.; Pedley, A.; Therkelsen, K.E.; Hoffmann, U.; Massaro, J.M.; Levy, D.; Long, M.T. Upper Body Subcutaneous Fat Is Associated with Cardiometabolic Risk Factors. *Am. J. Med.* **2017**, *130*, 958–966. [CrossRef]
12. Kwon, H.; Kim, D.; Kim, J.S. Body Fat Distribution and the Risk of Incident Metabolic Syndrome: A Longitudinal Cohort Study. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 10955. [CrossRef]
13. Cancello, R.; Zulian, A.; Gentilini, D.; Maestrini, S.; Barba, A.D.; Invitti, C.; Corà, D.; Caselle, M.; Liuzzi, A.; Di Blasio, A.M. Molecular and morphologic characterization of superficial-and deep-subcutaneous adipose tissue subdivisions in human obesity. *Obesity* **2013**, *21*, 2562–2570. [CrossRef]
14. Neeland, I.J.; Ayers, C.R.; Rohatgi, A.K.; Turer, A.T.; Berry, J.D.; Das, S.R.; Vega, G.L.; Khera, A.; McGuire, D.K.; Grundy, S.M.; et al. Associations of visceral and abdominal subcutaneous adipose tissue with markers of cardiac and metabolic risk in obese adults. *Obesity* **2013**, *21*, E439–E447. [CrossRef] [PubMed]
15. Choi, J.; Joseph, L.; Pilote, L. Obesity and C-reactive protein in various populations: A systematic review and meta-analysis. *Obes. Rev.* **2013**, *14*, 232–244. [CrossRef]
16. Tvarijonaviciute, A.; Martinez-Lozano, N.; Rios, R.; Marcilla de Teruel, M.C.; Garaulet, M.; Cerón, J.J. Saliva as a non-invasive tool for assessment of metabolic and inflammatory biomarkers in children. *Clin. Nutr.* **2020**, *39*, 2471–2478. [CrossRef]
17. Góralska, M.; Majewska-Szczepanik, M.; Szczepanik, M. Mechanizmy immunologiczne towarzyszące otyłości i ich rola w zaburzeniach metabolizmu. *Postep. Hig. Med. Dosw.* **2015**, *69*, 1384–1404.
18. Boden, G. Obesity, Insulin Resistance and Free Fatty Acids. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **2011**, *18*, 139–143. [CrossRef]
19. Pîrsean, C.; Negut, C.; Stefan-van Staden, R.I.; Dinu-Pîrvu, C.E.; Armean, P.; Udeanu, D.I. The salivary levels of leptin and interleukin-6 as potential inflammatory markers in children obesity. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0210288. [CrossRef] [PubMed]
20. Mamali, I.; Roupas, N.D.; Armeni, A.K.; Theodoropoulou, A.; Markou, K.B.; Georgopoulos, N.A. Measurement of salivary resistin, visfatin and adiponectin levels. *Peptides* **2012**, *33*, 120–124. [CrossRef]
21. Thanakun, S.; Watanabe, H.; Thaweboon, S.; Izumi, Y. Comparison of salivary and plasma adiponectin and leptin in patients with metabolic syndrome. *Diabetol. Metab. Syndr.* **2014**, *6*, 19. [CrossRef]
22. Achari, E.; Jain, S.K. Molecular Sciences Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1321. [CrossRef] [PubMed]
23. Attlee, A.; Hasan, H.; AlQattan, A.; Sarban, N.; Alshammari, R.; Ali, S.; Nabil, M.; Alattrash, A.; Raigangar, V.; Madkour, M.; et al. Relationship of salivary adipocytokines, diet quality, physical activity, and nutrition status in adult Emirati females in United Arab Emirates. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* **2019**, *13*, 40–46. [CrossRef]
24. Duffles, L.F.; Hermont, A.P.; Abreu, L.G.; Pordeus, I.A.; Silva, T.A. Association between obesity and adipokines levels in saliva and gingival crevicular fluid: A systematic review and meta-analysis. *J. Evid.-Based Med.* **2019**, *12*, 313–324. [CrossRef] [PubMed]
25. Kalyani, R.S.; Raghunath, V. Assessment of serum and salivary adiponectin levels in newly diagnosed Type II diabetes mellitus patients. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* **2020**, *24*, 245–250. [PubMed]
26. Goodson, J.M.; Kantarci, A.; Hartman, M.; Denis, G.V.; Stephens, D.; Hasturk, H.; Yaskell, T.; Vargas, J.; Wang, X.; Cugini, M.; et al. Metabolic disease risk in children by salivary biomarker analysis. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e98799. [CrossRef] [PubMed]

27. Escoté, X.; Gómez-Zorita, S.; López-Yoldi, M.; Milton-Laskibar, I.; Fernández-Quintela, A.; Martínez, J.A.; Moreno-Aliaga, M.J.; Portillo, M.P. Role of Omentin, Vaspin, Cardiotrophin-1, TWEAK and NOV/CCN3 in Obesity and Diabetes Development. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *18*, 1770. [CrossRef]
28. Lehmann-Kalata, A.; Miechowicz, I.; Korybalska, K.; Swora-Cwynar, E.; Czepulis, N.; Luczak, J.; Orzechowska, Z.; Grzymisławski, M.; Surdacka, A.; Witowski, J. Salivary fingerprint of simple obesity. *Cytokine* **2018**, *110*, 174–180. [CrossRef] [PubMed]
29. Saraiva, M.; Vieira, P.; O'garra, A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J. Exp. Med.* **2020**, *217*, e20190418. [CrossRef]
30. Chauhan, A.; Yadav, S.S.; Dwivedi, P.; Lal, N.; Usman, K.; Khattri, S. Correlation of Serum and Salivary Cytokines Level With Clinical Parameters in Metabolic Syndrome With Periodontitis. *J. Clin. Lab. Anal.* **2016**, *30*, 649–655. [CrossRef]
31. Selvaraju, V.; Babu, J.R.; Geetha, T. Association of salivary C-reactive protein with the obesity measures and markers in children. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* **2019**, *12*, 1239–1247. [CrossRef]
32. Lehmann, A.P.; Nijakowski, K.; Swora-Cwynar, E.; Łuczak, J.; Czepulis, N.; Surdacka, A. Characteristics of salivary inflammation in obesity. *Polish Arch. Intern. Med.* **2020**, *130*, 297–303.
33. Landecho, M.F.; Tuero, C.; Valenti, V.; Bilbao, I.; De La Higuera, M.; Frühbeck, G. Relevance of Leptin and Other Adipokines in Obesity-Associated Cardiovascular Risk. *Nutrients* **2019**, *11*, 2664. [CrossRef]
34. Martin, S.; Blaha, M.; Muse, E.D.; Qasim, A.N.; Reilly, M.P.; Blumenthal, R.S.; Nasir, K.; Criqui, M.H.; McClelland, R.L.; Hughes-Austin, J.M.; et al. Leptin and incident cardiovascular disease: The Multi-ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis* **2015**, *239*, 67–72. [CrossRef]
35. Jayachandran, T.; Srinivasan, B.; Padmanabhan, S. Salivary leptin levels in normal weight and overweight individuals and their correlation with orthodontic tooth movement. *Angle Orthod.* **2017**, *87*, 739–744. [CrossRef]
36. Park, H.K.; Kwak, M.K.; Kim, H.J.; Ahima, R.S. Linking resistin, inflammation, and cardiometabolic diseases. *Korean J. Intern. Med.* **2017**, *32*, 239–247. [CrossRef]
37. Al-Rawi, N.; Al-Marzooq, F. The Relation between Periodontopathogenic Bacterial Levels and Resistin in the Saliva of Obese Type 2 Diabetic Patients. *J. Diabetes Res.* **2017**, *2017*, 2643079. [CrossRef]
38. Doğusal, G.; Afacan, B.; Bozkurt, E.; Sönmez, I. Gingival crevicular fluid and salivary resistin and tumor necrosis factor-alpha levels in Obese children with gingivitis. *J. Periodontol.* **2018**, *89*, 973–982. [CrossRef] [PubMed]
39. Akash, M.S.H.; Rehman, K.; Liaqat, A. Tumor Necrosis Factor-Alpha: Role in Development of Insulin Resistance and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *J. Cell. Biochem.* **2018**, *119*, 105–110. [CrossRef] [PubMed]
40. Ostrowska, L.; Gomowicz, A.; Pietraszewska, B.; Bielawski, K.; Bielawska, A. Which salivary components can differentiate metabolic obesity? *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0235358. [CrossRef]
41. Han, M.S.; White, A.; Perry, R.; Camporez, J.P.; Hidalgo, J.; Shulman, G.I.; Davis, R.J. Regulation of adipose tissue inflammation by interleukin 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 2751–2760. [CrossRef]
42. Makki, K.; Froguel, P.; Wolowczuk, I. Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines. 2013. Available online: https://downloads.hindawi.com/archive/2013/139239.pdf (accessed on 9 July 2021).
43. Bing, C. Is interleukin-1b a culprit in macrophage-adipocyte crosstalk in obesity? *Adipocyte* **2015**, *4*, 149–152. [CrossRef]
44. Bianconi, V.; Sahebkar, A.; Atkin, S.L.; Pirro, M. The regulation and importance of monocyte chemoattractant protein-1. *Curr. Opin. Hematol.* **2018**, *25*, 44–51. [CrossRef] [PubMed]
45. Miksztowicz, V.; Machulsky, N.F.; Lucero, D.; Fassio, E.; Schreier, L.; Berg, G. Adiponectin predicts MMP-2 activity independently of obesity. *Eur. J. Clin. Invest.* **2014**, *44*, 951–957. [CrossRef] [PubMed]
46. Chen, R.; Yan, J.; Liu, P.; Wang, Z.; Wang, C. Plasminogen activator inhibitor links obesity and thrombotic cerebrovascular diseases: The roles of PAI-1 and obesity on stroke. *Metab. Brain Dis.* **2017**, *32*, 667–673. [CrossRef] [PubMed]
47. Neyraud, E.; Cabanet, S.; Brignot, H.; Chabanet, C.; Labouré, H.; Guichard, E.; Berdeaux, O. The basal free fatty acid concentration in human saliva is related to salivary lipolytic activity. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 5969. [CrossRef] [PubMed]

12.2. Publikacja oryginalna nr 1. (P.2)

International Journal of *Molecular Sciences*

MDPI

Article

Pro-Inflammatory Adipokine and Cytokine Profiles in the Saliva of Obese Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)—A Pilot Study

Beata Zyśk [1], Lucyna Ostrowska [1,*], Joanna Smarkusz-Zarzecka [1], Katarzyna Witczak-Sawczuk [1], Agnieszka Gornowicz [2] and Anna Bielawska [2]

[1] Department of Dietetics and Clinical Nutrition, Medical University of Białystok, Mieszka I Street 4B, 15-054 Białystok, Poland
[2] Department of Biotechnology, Medical University of Białystok, Jana Kilinskiego Street 1, 15-089 Białystok, Poland
* Correspondence: lucyna.ostrowska@umb.edu.pl; Tel.: +48-85-686-53-13

Abstract: Undiagnosed and untreated non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) can lead to the development of many complications, such as cirrhosis, hepatocellular carcinoma, or cardiovascular diseases. Obese people are at increased risk of developing NAFLD. Due to the current lack of routine diagnostics, it is extremely important to look for new diagnostic methods and markers for this disease. The aim of this study was to assess the concentration of selected pro-inflammatory adipokines and cytokines in the unstimulated saliva of obese people with fatty liver disease in various stages (with or without slight fibrosis) and to analyze them for possible use as early markers of NAFLD diagnosis. The study involved 96 people who were divided into 5 groups based on the criterion of body mass index (BMI) and the degree of fatty liver (liver elastography). There were statistically significant differences between the groups in the concentrations of MMP-9 (matrix metalloproteinase 9), resistin, and IL-1β (interleukin 1β) in saliva. Statistically significant, positive correlations between hepatic steatosis and the concentration of MMP-2 (matrix metalloproteinase 2), resistin, and IL-1β in saliva were also found. Statistically significant positive correlations were also found between the concentration of resistin in saliva and the concentration of ALT (alanine aminotransferase) and GGTP (gamma-glutamyl transpeptidase) in serum. MMP-2, IL-1β, and resistin may be potential markers of NAFLD development, assessed in saliva. However, further research is needed because this is the first study to evaluate the concentrations of the selected pro-inflammatory parameters in the saliva of patients with NAFLD.

Keywords: non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD); NAFLD diagnosis; obesity; saliva; NAFLD biomarkers; pro-inflammatory cytokines; resistin; matrix metalloproteinase 9 (MMP-9); matrix metalloproteinase 2 (MMP-2); interleukin 1 β (IL-1β)

check for updates

Citation: Zyśk, B.; Ostrowska, L.; Smarkusz-Zarzecka, J.; Witczak-Sawczuk, K.; Gornowicz, A.; Bielawska, A. Pro-Inflammatory Adipokine and Cytokine Profiles in the Saliva of Obese Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)—A Pilot Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 2891. https://doi.org/10.3390/ijms24032891

Academic Editors: Alessandro Mantovani and Andrea Dalbeni

Received: 11 January 2023
Revised: 28 January 2023
Accepted: 30 January 2023
Published: 2 February 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a complex disease that can be subcategorized into two conditions: non-alcoholic fatty liver (NAFL) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH). NAFL involves simple steatosis in the absence of inflammation or mild inflammation and a low risk of developing cirrhosis. NASH is a more advanced stage of NAFLD, characterized by fatty liver with chronic, progressive hepatitis with or without fibrosis and a risk of progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma (in the absence of appropriate treatment). Currently, the percentage of people with NAFLD in the world is approximately 25%, of which 1.6–6.5% suffer from NASH in the general population. In addition, there is an association between a higher body mass index (BMI) and the development of NAFLD. Namely, this disease affects more than 90% of people with morbid obesity

(BMI $\geq$ 40 kg/m^2), and 37% of them have NASH. Moreover, there are data indicating the development of NAFLD in 7–10% of children worldwide [1–3].

NAFLD is diagnosed when $\geq$5% of hepatocytes are steatotic, assessed based on histological examination of a liver section, which is considered the gold standard of diagnosis. Liver biopsy enables the differentiation of fatty liver and steatohepatitis, as well as the diagnosis of fibrosis and the analysis of its severity. However, it is an invasive and expensive test, which makes it impossible to use in the routine diagnosis of NAFLD. Ultrasonography (USG) is inexpensive and non-invasive but cannot be considered a good diagnostic alternative for the assessment of hepatic steatosis due to its low sensitivity (the diagnosis of NAFLD with USG is possible only when steatosis exceeds 20% of hepatocytes). In addition, the sensitivity of this method is even lower in obese people. Computed tomography (CT) is more sensitive than ultrasound but is not recommended for routine use due to ionizing radiation. Magnetic resonance imaging (MRI) is a safe and more sensitive method than USG (the diagnosis of NAFLD with MRI is possible with 5–10% hepatocyte steatosis). Additionally, the superiority of this method over USG and CT is based on its ability to quantify fat content. However, it generates high costs. Similarly, a new magnetic resonance imaging technique using the measurement of proton density of the fat fraction (MRI-PDFF) allows for the detection of early-stage fatty liver, but it is not widely available [3,4].

A diagnostic tool that may become an alternative to liver biopsy in the future is FibroScan [5,6], which uses the method of vibration-controlled transient elastography (VCTE). This method allows for both the diagnosis of fatty liver and the analysis of its severity by assessing the controlled attenuation parameter (CAP), as well as the quantitative assessment of liver fibrosis. It is completely safe for patients and non-invasive, as well as sensitive and precise. In addition, the XL probe allows for accurate measurements in people with obesity [7]. The diagnosis of liver fibrosis is also possible with magnetic resonance elastography (MRE), which has very high accuracy but also very low availability. Aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), assessed based on laboratory tests, can only be used as additional diagnostics but not as basic ones. Due to the chronic inflammation accompanying NAFLD, the assessment of the concentration of pro-inflammatory substances produced in this process can also be used in its diagnosis [3,4].

A promising direction of scientific research is the evaluation of various pro-inflammatory cytokines and adipokines in terms of their use as potential markers of many diseases [3]. Currently, only a few studies have covered the topic of NAFLD. In addition, the results of the research conducted so far on the use of selected pro-inflammatory substances as markers of NAFLD are not sufficient. Serum is a commonly used material for the determination of pro-inflammatory substances. However, increasingly often in laboratory diagnostics, biological materials are used that are collected in a non-invasive way and do not generate high costs [8]. A good alternative for the determination of pro-inflammatory markers in the blood may be saliva because its composition is very similar to blood plasma [9,10].

Based on the review of the available literature, the following pro-inflammatory adipokines were selected for the analyses in this study: resistin, visfatin, and cytokines, namely tumor necrosis factor α (TNF-α), interleukin 6 (IL-6), interleukin 1β (IL-1β), and matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. Resistin participates in the development of inflammation and insulin resistance, which play a key role in the pathogenesis of NAFLD [11]. Visfatin induces oxidative stress in cells and apoptosis. In addition, it has a pro-inflammatory effect and affects lipid and glucose metabolism, as well as the development of insulin resistance [12]. Pro-inflammatory cytokines i.e., TNF-α, IL-6 and IL-1β participate in the progression of simple steatosis to NASH by influencing hepatocyte apoptosis and necrosis, neutrophil chemotaxis, stellate cell activation, and Mallory body production [13]. Therefore, the discussed adipokines and cytokines can be considered in terms of their use as early markers of the development of NAFLD. Changes in the expression of matrix metalloproteinases affect the process of fibrogenesis by participating in the degradation of the extracellular matrix. Liver fibrosis is caused by damage to its connective tissue, i.e., an increase in the amount of fibrous extracellular matrix, with MMP-2 and

MMP-9 being particularly important in this process [14]. In our study, we assessed whether matrix metalloproteinases can also be markers of NAFLD in the earlier stages of the disease.

The aim of this study was to assess the concentration of selected pro-inflammatory adipokines and cytokines in unstimulated saliva in patients with obesity and fatty livers in various stages (without fibrosis or with slight fibrosis). Another aim of the study was to analyze pro-inflammatory parameters in terms of their possible use as early markers for the diagnosis of NAFLD.

2. Results

The concentrations of selected pro-inflammatory adipokines and cytokines were assessed in a group of 96 patients (67 women and 29 men). Participants were divided into 5 groups: 4 study groups (people with obesity and various grades of fatty liver) and a control group (people with normal body weight and no fatty liver). Detailed information on individual groups is presented in Figure 1.

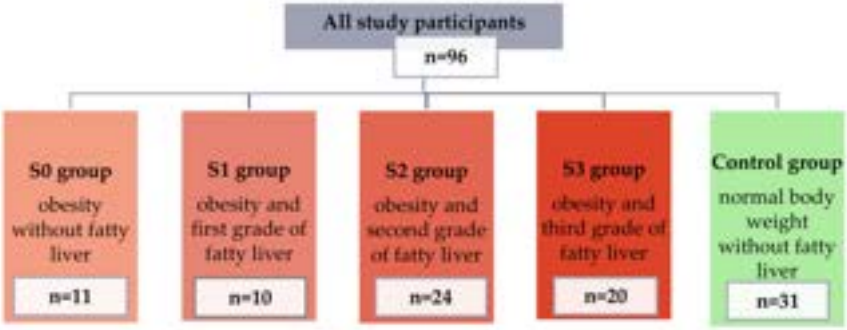


Figure 1. Characteristics of patients qualified for the study, divided into groups.

Then, the anthropometric and body composition parameters of all participants were characterized. The groups differed significantly in age ($p = 0.006$). The median of this parameter was 39 years in the S0 group, 44 years in the S1 group, 45.5 years in the S2 group, 45.5 years in the S3 group, and 35 years in the control group. There were also statistically significant differences between the groups for body weight, height, BMI, percentage of total body fat, visceral adipose tissue (VAT) area in the cross-section of the abdomen, and VAT/subcutaneous adipose tissue (SAT) ratio. The results are presented in Table 1.

Table 1. Characteristics of anthropometric parameters and body composition of all groups.

Parameter	S0 Group		S1 Group		S2 Group		S3 Group		Control Group		*p*
	Median	Q1–Q3	Median	Q1–Q3	Median	Q1–Q3	Median	Q1–Q3	Median	Q1–Q3	
Body weight (kg)	95.00	86.00–99.70	100.20	91.50–106.00	97.50	92.00–110.55	103.00	95.00–113.00	64.00	58.00–70.00	<0.001*
Height (cm)	166.50	157.00–177.50	170.50	167.00–174.00	166.50	163.00–177.00	171.75	167.50–182.50	163.00	160.00–172.00	0.070 *
BMI (kg/m^2)	32.00	31.10–34.70	33.95	32.90–35.00	35.00	32.70–36.70	33.80	31.66–36.80	23.10	22.19–24.60	<0.001*
Total body fat (%)	39.22	33.52–46.21	41.44	33.66–45.82	44.48	33.64–46.47	39.54	33.68–46.93	27.34	22.19–30.39	<0.001*
VAT (cm^2)	220.00	148.00–261.00	209.50	156.00–315.00	345.50	213.50–350.50	279.00	209.50–350.00	88.00	65.00–132.00	<0.001 *
VAT/SAT	1.90	1.42–2.51	1.76	1.41–2.49	2.19	1.87–3.17	2.40	1.53–3.18	1.36	0.94–1.62	<0.001 *

Q1–Q3—1st–3rd lower and upper quartiles; *p* *—statistically significant differences between the groups ($p < 0.005$); BMI—body mass index; VAT—visceral adipose tissue; VAT/SAT—visceral to subcutaneous fat ratio.

All participants underwent liver elastography examinations. The median and quartile values for the CAP—controlled attenuation parameter (dB/m) and E—liver stiffness (kPa) are presented in Table 2.

Table 2. Characteristics of the parameters of the elastography examination (FibroScan) of all groups.

Parameter	S0 Group		S1 Group		S2 Group		S3 Group		Control Group		*p*
	Median	Q1–Q3	Median	Q1–Q3	Median	Q1–Q3	Median	Q1–Q3	Median	Q1–Q3	
CAP (dB/m)	213.00	197.00–219.00	262.00	249.00–264.00	286.50	279.00–293.00	321.00	308.50–341.00	193.00	178.00–214.00	<0.001 *
E (kPa)	4.10	2.80–6.20	4.95	4.00–6.00	5.15	3.85–6.00	5.75	5.10–6.40	3.80	3.30–5.00	<0.001 *

Q1–Q3—1st–3rd lower and upper quartiles; *p* *—statistically significant differences between the groups ($p < 0.005$); CAP—controlled attenuation parameter; E—liver stiffness.

Then, an analysis of the correlation between the CAP, BMI index, and parameters evaluating adipose tissue was performed in all study participants (n = 96). There were statistically significant, high positive correlations between the CAP and the BMI index ($p < 0.001$ $r = 0.67$), the percentage of total body fat ($p < 0.001$; $r = 0.53$), and the VAT area in cross-section transverse abdomen ($p < 0.001$; $r = 0.63$). There was also a statistically significant, medium positive correlation between the CAP and the VAT/SAT ratio ($p < 0.001$; $r = 0.48$). These relationships are presented in Table 3 and Figure 2.

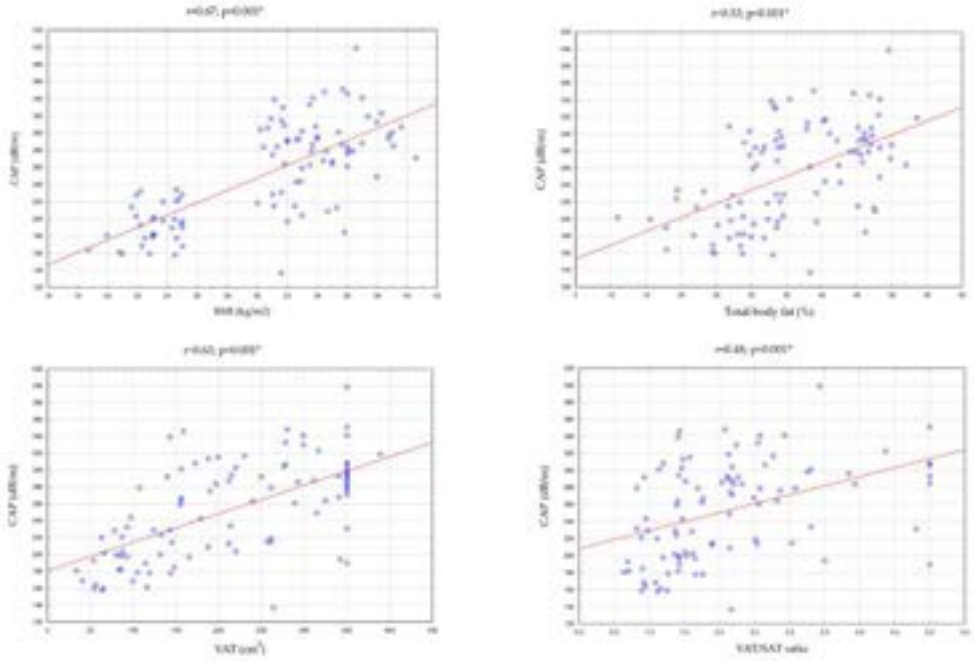
Participants from the four study groups and the control group were compared in terms of serum concentrations of liver enzymes (Table 4). Statistically significant differences between the groups were noted for aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and gamma-glutamyl transpeptidase (GGTP). The median ALT concentration was the lowest in the group with normal body weight and without hepatic steatosis. However, in the groups with obesity, the median showed higher values with increasing grades of fatty liver. The median concentration of GGTP was lower in the groups without steatosis, both in the study and control groups, in relation to the groups with steatosis. Alkaline phosphatase (ALP) concentrations were not significantly different between the groups. Figure 3 shows the percentages of people whose parameters met the ranges of the accepted standards. Analysis of these data showed that the AST, ALT, GGTP, and ALT concentrations were normal in the majority of patients in all groups. In addition, serum total bilirubin (TBIL) and C-reactive protein (CRP) concentrations were normal in the majority of patients and did not differ depending on the severity of fatty liver disease.

Table 3. Correlations between the CAP and the parameters evaluating adipose tissue.

Parameter	BMI (kg/m^2)	Total Body Fat (%)	VAT (cm^2)	VAT/SAT
CAP (dB/m)	$r = 0.67$	$r = 0.53$	$r = 0.63$	$r = 0.48$
	$p < 0.001$ *	$p < 0.001$ *	$p < 0.001$ *	$p < 0.001$ *

p *—statistically significant correlations ($p < 0.005$); BMI—body mass index; VAT—visceral adipose tissue; VAT/SAT—visceral to subcutaneous fat ratio; CAP—controlled attenuation parameter.

Then, the concentrations of selected pro-inflammatory adipokines and cytokines in saliva were compared among the study groups. The results are presented in Table 5. Statistically significant differences were found for the concentrations of matrix metalloproteinase 9, resistin, and interleukin 1β. However, the concentrations of matrix metalloproteinase 2 and interleukin 6 did not differ significantly between the groups. In addition to the pro-inflammatory parameters presented in Table 5, the concentrations of tumor necrosis factor α and visfatin were also assessed. However, the concentrations of these parameters (in all patients for TNF-α and a large part of the group for visfatin) were below the minimum value recognized by the testing equipment, which prevented analysis.



*—statistically significant correlations;
points on the scatterplot—data of study participants; line on the scatterplot—univariate linear regression (positive—slope up), negative (slope down); BMI—body mass index; VAT—visceral adipose tissue; VAT/SAT—visceral to subcutaneous fat ratio; CAP—controlled attenuation parameter.

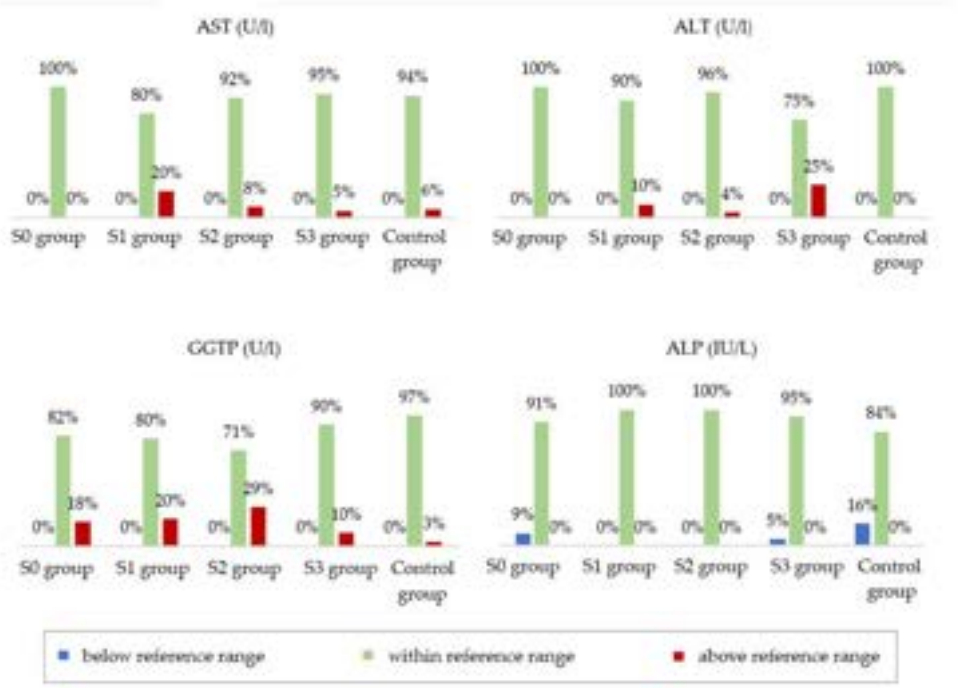
Figure 2. Correlations between the CAP* and BMI, total body fat, VAT area in the transverse section of the abdomen, and the VAT/SAT ratio.

Table 4. Characteristics of the hepatic laboratory parameters of all groups.

Parameter	S0 Group		S1 Group		S2 Group		S3 Group		Control Group		*P*
	Median	Q1–Q3	Median	Q1–Q3	Median	Q1–Q3	Median	Q1–Q3	Median	Q1–Q3	
AST (U/L)	20.00	18.00–26.00	21.50	16.00–27.00	18.50	15.00–26.00	21.50	17.00–27.00	17.00	16.00–19.00	0.038 *
ALT (U/L)	23.00	15.00–26.00	24.00	17.00–29.00	24.50	18.00–31.00	30.50	21.00–53.00	14.00	12.00–19.00	0.002 *
GGTP (U/L)	18.00	14.00–28.00	31.00	20.00–36.00	24.50	18.50–44.50	32.00	21.00–41.00	15.00	11.00–17.00	<0.001 *
ALP (U/L)	52.00	48.00–59.00	68.50	61.00–80.00	58.00	51.50–67.00	60.50	43.50–69.00	52.00	44.00–63.00	0.053

Q1–Q3—1st–3rd lower and upper quartiles; *p* *—statistically significant differences between the groups ($p < 0.005$); AST—aspartate aminotransferase; ALT—alanine aminotransferase; GGTP—gamma-glutamyl transpeptidase; ALP—alkaline phosphatase.

Then, an analysis of the correlation between the parameters evaluating the clinical condition of the liver and the concentration of adipokines/cytokines in the saliva of all study participants (n = 96) was performed. There were statistically significant, positive correlations between the CAP and the concentration of MMP-2 ($p < 0.001$; r = 0.37), IL-1β ($p < 0.001$; r = 0.42), and resistin ($p = 0.008$; r = 0.27) in saliva. In addition, the concentration of resistin in saliva was statistically significantly correlated with the concentrations of ALT ($p = 0.032$; r = 0.22) and GGTP ($p = 0.003$; r = 0.30) in the serum. The above results are presented in Table 6 and Figure 4.



AST—aspartate aminotransferase; ALT—alanine aminotransferase; GGTP—gamma-glutamyl transpeptidase; ALP—alkaline phosphatase.

Figure 3. Percentage of people in individual groups who meet the norm for a given laboratory parameter.

Table 5. Characteristics of the concentration of selected adipokines and pro-inflammatory cytokines in the unstimulated saliva of the study groups and the control group.

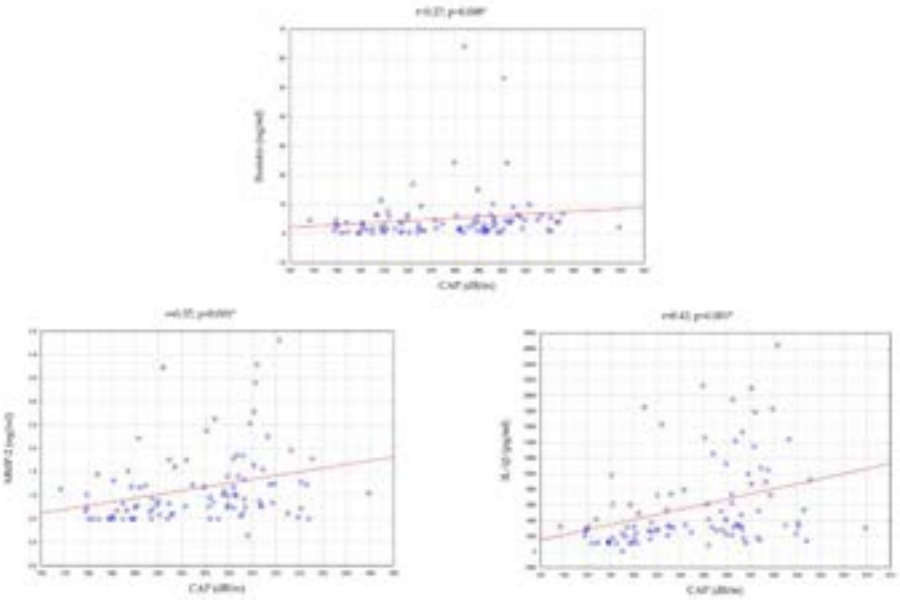
Parameter	S0 Group		S1 Group		S2 Group		S3 Group		Control Group		*p*
	Median	Q1–Q3	Median	Q1–Q3	Median	Q1–Q3	Median	Q1–Q3	Median	Q1–Q3	
MMP-9 (ng/mL)	573.00	445.70–690.60	522.90	431.80–1335.80	391.60	239.45–714.05	369.00	315.50–614.45	265.80	124.50–475.00	0.016 *
MMP-2 (ng/mL)	0.80	0.64–1.13	1.06	0.76–1.76	1.02	0.75–1.52	1.23	0.77–1.87	0.67	0.50–1.18	0.072
Resistin (ng/mL)	3.35	1.71–5.04	2.69	1.36–6.25	2.65	1.21–4.98	4.69	3.87–6.37	1.71	0.56–3.83	0.022 *
IL-6 (pg/mL)	7.15	3.13–12.74	8.24	6.78–22.24	11.48	5.93–15.06	9.13	4.34–15.92	8.25	3.13–33.72	0.600
IL-1β (pg/mL)	275.48	213.34–373.12	512.27	316.00–1253.01	411.30	281.31–932.24	628.59	319.00–1212.30	266.43	135.35–413.18	0.001 *

Q1–Q3—1st–3rd lower and upper quartiles; *p* *—statistically significant differences between the groups ($p < 0.005$); MMP-9—matrix metalloproteinase 9; IL-6—interleukin 6; MMP-2—matrix metalloproteinase 2; IL-1β—interleukin 1β.

Table 6. Correlations between parameters evaluating liver condition and adipokines and cytokines in unstimulated saliva of all persons qualified for the study.

Parameter	MMP-9 (ng/mL)	MMP-2 (ng/mL)	Resistin (ng/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-1β (pg/mL)
CAP (dB/m)	r = 0.11	r = 0.37	r = 0.27	r = 0.10	r = 0.42
	p = 0.266	p < 0.001 *	p = 0.008 *	p = 0.333	p < 0.001 *
AST (U/L)	r = 0.01	r = 0.11	r = 0.01	r = −0.10	r = −0.04
	p = 0.920	p = 0.285	p = 0.889	p = 0.335	p = 0.733
ALT (U/L)	r = 0.11	r = 0.20	r = 0.22	r = −0.06	r = 0.12
	p = 0.302	p = 0.053	p = 0.032 *	p = 0.547	p = 0.228
GGTP (U/L)	r = 0.10	r = 0.10	r = 0.30	r = 0.05	r = 0.15
	p = 0.35	p = 0.311	p = 0.003 *	p = 0.645	p = 0.146
ALP (IU/L)	r = −0.14	r = 0.14	r = −0.07	r = 0.08	r = 0.08
	p = 0.169	p = 0.171	p = 0.474	p = 0.441	p = 0.425

p *—statistically significant correlations (p < 0.005); MMP-9—matrix metalloproteinase 9; IL-6—interleukin 6; MMP-2—matrix metalloproteinase 2; IL-1β—interleukin 1β; CAP—controlled attenuation parameter AST—aspartate aminotransferase; ALT—alanine aminotransferase; GGTP—gamma-glutamyl transpeptidase; ALP—alkaline phosphatase.



*—statistically significant correlations;
points on the scatterplot—data of study participants; line on the scatterplot—univariate linear regression (positive—slope up), negative (slope down); MMP-2—matrix metalloproteinase 2; IL-1β—interleukin 1β; CAP—controlled attenuation parameter.

Figure 4. Statistically significant correlations between CAP and the concentration of adipokines and cytokines in saliva.

3. Discussion

The high prevalence of NAFLD worldwide and the lack of clinical symptoms before the onset of its late complications (which makes its diagnosis often incidental), as well as the current lack of routine diagnostic tests, mean that the overriding goal should be

to look for new diagnostic methods [3]. NAFLD, if not diagnosed and treated early enough, may lead to the development of complications, such as advanced liver fibrosis, cirrhosis, or hepatocellular carcinoma, as well as extrahepatic complications, such as cardiovascular diseases. Studies show that NAFLD may contribute to the development of hypertension, cardiomyopathy, arrhythmias, and ischemic heart disease, and increase the risk of cardiovascular mortality [15].

Due to the fact that obese people are a group predisposed to the development of NAFLD, it would be reasonable to systematically monitor the condition of the liver in terms of the development of steatosis. Currently, the only form of assessment of the clinical condition of the liver is the examination of the serum concentration of liver enzymes, AST, and ALT, as part of routine diagnostics. In our research, the concentrations of AST, ALT, GGTP, ALP, and TBIL in serum were assessed. Although there were statistically significant differences in the concentration of ALT ($p = 0.002$) and GGTP ($p < 0.001$) between the groups, the concentrations of these parameters, as well as other assessed parameters, were within the normal range in the vast majority of people in all groups (regardless of fatty liver severity). Therefore, they are not a good measure of the development of fatty liver disease. The results of studies conducted by other authors [16–19] also showed that the concentrations of liver enzymes in patients with NAFLD may be normal. Serum C-reactive protein concentration was also assessed in this study, and no significant differences between the groups were found. In addition, the concentrations of this parameter in the majority of study participants (with and without fatty liver) were normal. On the other hand, the authors who assessed serum concentrations of highly sensitive C-reactive protein (hs-CRP) showed that hs-CRP may be a marker of the development and progression of NAFLD [20,21]. The use of more advanced diagnostic methods (USG, MRI, CT) in routine diagnostics is not possible.

NAFLD's pathogenesis is complex and multifactorial. The development of this disease is influenced by many factors, such as nutritional factors, adipose tissue activity, insulin resistance, changes in the intestinal microbiota, and genetic factors. Chronic inflammation promotes the progression from simple steatosis to steatohepatitis. White adipose tissue (WAT) plays an important role in regulating NASH development by secreting adiponectin, leptin, IL-6, and TNF-α [22]. According to previous studies, SAT is not associated with the development of fatty liver. VAT shows increased metabolic activity and leads to the occurrence of many metabolic disorders, e.g., NAFLD [23]. In addition, the results obtained in this study confirm the relationship between total and visceral adipose tissue and NAFLD development. Significantly higher median VAT area in the transverse section of the abdomen and VAT/SAT ratio were observed in the groups with advanced fatty liver (grades II and III) compared to the group with grade I steatosis and both groups without fatty liver. Moreover, it was observed that as the percentage of total body fat, VAT area in the abdominal cross-section, and VAT/SAT ratio increased, there was an increase in the fatty liver. These correlations were statistically significant ($p < 0.001$).

Leptin may promote the development of inflammation by activating Kupffer cells, which are resident liver macrophages [22]. M1-type macrophages, which are induced by pro-inflammatory mediators, induce the secretion of pro-inflammatory cytokines, e.g., TNF-α, IL-6, and IL-1β. M2-type macrophages have anti-inflammatory activity. Changing the phenotype between M1 and M2 macrophages is an important mechanism in the regulation of inflammatory responses. Inflammatory processes in the liver and damage to hepatocytes cause the activation of hepatic stellate cells (which remain dormant under physiological conditions), which transform them into cells that produce excess collagen and lead to the development of fibrosis [4,24]. In addition to Kupffer cells, during the development of inflammation in NAFLD, liver dendritic cells, neutrophils, T lymphocytes, and NKT cells (natural killer T cells) are involved [22].

Pro-inflammatory adipokines and cytokines show great diagnostic potential in diseases when inflammation is involved in pathogenesis. In studies conducted so far, concentrations of some pro-inflammatory substances in the blood serum of patients with NAFLD

have been determined. To our knowledge, our study is the first to assess the profile of selected adipokines and cytokines in the saliva of NAFLD patients. This biological material was chosen because of the promising research results, indicating the possibility of using the determination of some adipokines and cytokines in saliva in the diagnosis of obesity [25,26]. In addition, the results of studies have shown a correlation between the concentration of various substances (including adipokines) in saliva, and their concentrations in blood [27–29] confirm the possibility of using saliva as an alternative diagnostic material to blood serum.

Salivary concentrations of MMP-9, MMP-2, resistin, visfatin, IL-6, IL-1β, and TNF-α were assessed in this study. Higher median MMP-2 concentrations were found in groups of people with fatty liver compared to groups of people without fatty livers. However, these results were not statistically significant ($p = 0.072$). However, statistically significant, positive correlations ($p < 0.001$; $r = 0.37$) were observed between hepatic steatosis and the concentration of MMP-2 in saliva. There are currently no other studies evaluating salivary MMP-2 levels in NAFLD patients. Yilmaz et al. found significant differences in the concentration of MMP-2 in the serum between patients with NAFLD and the group without this disease. However, they concluded that MMP-2 is not a marker that would allow differentiation between simple steatosis and NASH [30]. In studies by Ando et al., which evaluated serum cytokine concentrations in patients with histologically confirmed NASH, MMP-2 concentrations were indicative of the progression of fibrosis. However, they were not characteristic of steatosis or inflammation [31].

The median concentration of MMP-9 in saliva in our study was the highest in the group of people with obesity and without hepatic steatosis and showed lower values in the groups with a higher degree of steatosis. However, its lowest value was recorded in the control group (people without fatty liver and those with normal body weight). Differences between the groups were statistically significant ($p = 0.016$). The authors of other studies assessed only serum MMP-9 concentrations in patients with NAFLD. Goyale et al. showed a lower concentration of MMP-9 in the serum, which was associated with greater liver fibrosis [32]. Livzan et al. showed that the concentration of MMP-9 in blood serum may be a marker of the progression of the initial stages (F1-F2) of liver fibrosis [33]. Wagner et al. conducted a study of obese patients after bariatric surgery. NAFLD (NAS) activity was assessed by liver biopsy. There were no significant differences between the groups in the incidence of liver fibrosis. However, serum MMP-9 concentrations were elevated in NASH patients compared to NAFL and non-NAFLD patients, and borderline patients. Statistically significant correlations between the concentrations of MMP-9 and NAS were found [34]. Yilmaz et al. observed higher concentrations of MMP-9 in the serum of people with NAFLD compared to the control group [30]. Ando et al. did not find a relationship between the serum concentration of MMP-9 and disease activity in a group of patients with NASH [31].

To our knowledge, this study is the first to assess the concentration of IL-1β in saliva in terms of its possible use as a marker of NAFLD. Higher median concentrations of this cytokine were noted in the groups with obesity and fatty liver degrees I, II, and III (including the highest in the group with stage III fatty liver) compared to the groups without fatty liver, both with obesity and with normal body weight. The differences between the groups were statistically significant ($p = 0.001$). In addition, there were statistically significant positive correlations ($p < 0.001$; $r = 0.42$) between hepatic steatosis and the concentration of IL-1β in saliva. A study by Duan et al. showed that serum IL-1β concentrations were correlated with the development of NAFLD and were associated with NASH, as well as hepatic fibrosis [35]. Vonghia et al. found higher intrahepatic concentrations of this cytokine in patients with obesity and advanced liver fibrosis (F3-F4) [36]. Hadinia et al. compared the concentrations of IL-1β in three groups of patients: people with NAFL, NASH, and people with a normal liver condition. The study showed that IL-1β serum concentrations were significantly higher in patients with NASH compared to those with simple steatosis and the control group [37].

In our study, statistically significant differences ($p = 0.022$) in the median salivary resistin concentrations between the groups were found. Statistically significant positive correlations between hepatic steatosis and resistin concentration in saliva were also found ($p = 0.008$; $r = 0.27$). In addition, a positive relationship was observed between serum ALT concentration and salivary resistin concentration ($p = 0.032$; $r = 0.22$). The concentration of resistin in saliva was also correlated with the concentration of GGTP in serum ($p = 0.003$; $r = 30$). However, no other studies evaluating resistin as a prognostic biomarker of NAFLD have been conducted thus far.

Our research showed no statistically significant differences in the concentration of IL-6 in saliva depending on the presence of steatosis and its severity. There was also no statistically significant correlation between the degree of steatosis and the concentration of IL-6 in saliva. Therefore, perhaps saliva is not a suitable biological material to assess IL-6 concentration regarding NAFLD diagnosis. However, based on studies by other authors, it can be postulated that serum IL-6 may be a good marker of the development and progression of NAFLD. A study by Duan et al. showed that serum concentrations of this cytokine were correlated with the development of NAFLD [35]. In addition, Goyale et al. observed that higher concentrations of IL-6 in blood serum were associated with greater liver fibrosis [32]. Hadinia et al. assessed the concentration of IL-6 in groups of people with NAFL and NASH and people with normal liver conditions. They observed that serum concentrations of this cytokine were significantly higher in patients with NASH compared to those with NAFL and the control group [37].

Our study also assessed the concentration of TNF-α in the saliva of the study participants. However, the levels of this parameter in all patients were below the minimum value recognized by the testing equipment. Therefore, it seems that saliva may not be a suitable diagnostic material for determining TNF-α concentration in patients with NAFLD. However, studies by other authors who assessed TNF-α concentrations in the serum of patients with NAFLD obtained contradictory results. In the study by Hadinia et al., which compared serum TNF-α concentrations in NAFL, NASH, and control subjects, no significant differences were observed [37]. Goyale et al. also found no relationship between the serum levels of this cytokine and NAFLD [32]. However, a review of studies by Daan et al. showed that serum concentrations of this cytokine were associated with NAFLD and were also correlated with the development of NASH, as well as liver fibrosis [35].

In our study, the concentration of visfatin in the saliva of participants in all groups was assessed. Concentrations of visfatin in a significant proportion of participants were below the minimum value, recognizable by the equipment used for testing. Therefore, as was the case for TNF-α, saliva may not be a suitable biological material for the determination of visfatin in NAFLD patients. However, based on studies by other authors, it can be postulated that serum visfatin concentration may prove to be a potential marker of NAFLD development and progression. The results of the study by Qiu et al. showed that reduced serum visfatin concentrations were associated with an increased risk of developing NAFLD [38]. Similarly, Mousavi et al. reported associations between blood visfatin levels and NAFLD [39]. According to the results of studies by Elkabany et al., visfatin may be a promising serum biomarker for monitoring liver diseases in children and adolescents [40]. In contrast, a systematic review and meta-analysis by Ismaiel et al. showed that serum visfatin concentrations are not associated with NAFLD, the presence or severity of fatty liver, or liver fibrosis [12].

4. Materials and Methods

The protocols of the observational study were approved by the Bioethics Committee of the Medical University of Bialystok, and consent was obtained for its conduct (no. R-I-002/647/2019, APK.002.468.2020, APK.002.39.2021). Participants received detailed and exhaustive information about the course and purpose of the study, were informed about the possibility of resignation at each stage, and gave their written consent to participate in all components of the study before it began.

4.1. Participants

A total of 120 people (81 women and 39 men) aged 20–55 qualified for the study. The inclusion criterion was the presence of simple obesity (BMI = 30.0–39.9 kg/m^2), and in the control group—normal body weight (BMI = 18.5–24.9 kg/m^2). In addition, all participants in the study provided a certificate from a dentist confirming the state of oral health and, more specifically, the absence of periodontal disease and inflammation of the oral cavity. Exclusion criteria were the following diseases and disorders: secondary obesity, alcohol consumption >30 g per week (in men) and >20 g per week (in women), history of viral hepatitis (all types), hepatic cholestasis, history of surgical or pharmacological obesity treatment, eating disorders, diabetes type I and II, exacerbated coronary artery disease, having a pacemaker, hormonal disorders, using hormonal contraception or hormone replacement therapy, pregnancy and lactation, steroid therapy, and antiretroviral therapy.

The patients qualified for the study had their weight and height measured using a weighing scale (with an accuracy of 0.01 kg) and a height meter (with an accuracy of 0.5 cm) by RADWAG WPT 100/200 OW (Radom, Poland) and BMI was calculated. Liver elastography was also performed to assess the degree of hepatic steatosis and fibrosis.

Due to the resignation of participants at various stages of the project, and consequently the lack of complete studies, 12 people were rejected. In addition, two participants with advanced fibrosis were excluded from the obese group due to the specificity of the study, i.e., searching for early markers of non-alcoholic fatty liver disease. Moreover, from the control group, 10 participants with steatosis and fibrosis of the liver, as well as with metabolic obesity with normal body weight (MONW) syndrome, were eliminated. The control group was composed of participants with a normal clinical condition of the liver and without obesity.

The final group of study participants consisted of 96 people and was divided into 5 groups based on BMI and the criterion of the presence of fatty liver and its severity (S0 group—11 people with obesity and without fatty liver; S1 group—10 people with obesity and grade I steatosis; S2 group—24 people with obesity and grade II steatosis; S3 group—20 people with obesity and grade III steatosis; and the control group—31 people without obesity and steatosis).

4.2. Body Composition Analysis

Among the study participants, body composition analysis was performed, and the area of adipose tissue in the abdominal cross-section was determined using the bioelectrical impedance method and the BioScan 920–2 device (Essex, UK). The examination was performed in the morning, and the participants were informed of the necessity of fasting and resignation from intensive physical activity before the examination. Body composition analysis was performed in the supine position. The quantitative analysis of abdominal fat was performed in a standing position, and the electrodes were placed in a horizontal line at the level of the navel.

Based on this study, the following were assessed: total body fat content (%), total body fat mass (kg), total lean body mass (%), total skeletal muscle mass (kg), total body water content (l), as well as extracellular (l) and intracellular (l) water content, and the area of adipose tissue in the transverse section of the abdomen: visceral (VAT-Visceral Adipose Tissue, cm^2, %) and subcutaneous (SAT-Subcutaneous Adipose Tissue, cm^2, %). In addition, the visceral to subcutaneous fat ratio (VAT/SAT ratio) was established.

The obtained results were processed using the Maltron BioScan 920 v1.1 software.

4.3. Measurement of Liver Stiffness and Steatosis Using Dynamic Elastography

The measurement of liver stiffness (E) was performed using the Echosens FibroScan 530 compact (Paris, France), which also has the option of evaluating the controlled attenuation parameter (CAP). The study was conducted in the summer period (July–September).

Liver stiffness (correlated with fibrosis) is calculated based on the speed of propagation of the shear wave several centimeters into the liver. The transverse wave is generated at a

controlled frequency (50 Hz) of a characteristic and specific parameter for determining the stiffness of the liver. The CAP® measurement (evaluating fatty liver), based on VCTE® technology, is performed simultaneously with the liver stiffness measurement. This parameter is determined by measuring the phenomenon of ultrasonic attenuation and is expressed in dB/m (decibel/meter). It describes the decay of the ultrasound signal, depending on the depth of penetration in the examined liver.

The following ranges were adopted for the CAP: 0–10% hepatocyte steatosis—no fatty liver; 11–33%—1st-grade hepatocyte steatosis; 34–66%—2nd-grade hepatocyte steatosis; and ≥67% hepatocyte steatosis—3rd-grade steatosis. The ranges of the parameters evaluating liver stiffness (E) were as follows: F0 and F1—no liver fibrosis; F2—slight fibrosis; F3 and F4—advanced liver fibrosis.

The test was carried out by trained operators. Participants were advised to perform the test on fasting or at least 6 h after a meal. In addition, during the examination, they were instructed on what position to take (lying position with the right arm raised and placed behind the head). The appropriate amount of gel was then applied. The camera head was placed between the ribs at the level of the thickest layer of the liver parenchyma to avoid measurement near the lower or upper edge of the liver (possibility of overestimating the measurement results in the subcapsular area). Head sizes M and XL were used. For each participant, 10 normal liver stiffness measurements were taken at the same measurement point to ensure the repeatability and accuracy of the measurements.

4.4. Evaluation of Laboratory Parameters Related to Liver Function

Laboratory tests were performed during the period of July–September (a similar time range as in the case of elastography to be reliable and credible for further analyses). Ten milliliters of blood was collected after fasting. All biochemical assessments were performed in the same laboratory using standard methods.

Serum concentrations of AST, ALT, GGTP, ALP, TBIL and C-reactive protein were assessed. The reference ranges established by the laboratory where the tests were performed were taken into account for these parameters and were as follows: AST, 5–34 U/l; ALT, 0–55 U/L; GGTP, 9–36 U/l (women) and 12–64 U/l (men); ALP, 40–150 IU/L; TBIL, 0.2–1.2 mg/dL; C-reactive protein, 0–10 mg/L.

4.5. Saliva Collection

Saliva was collected using the standard method. Samples from study participants were collected between 9:00–11:00 a.m. Participants were instructed to maintain a minimum of 2 h between eating and drinking (other than pure water) and collecting saliva. Before saliva collection, the oral cavity was rinsed with deionized water. During the study, participants sat in a comfortable position with their heads slightly tilted downward. Unstimulated saliva was collected for 10 min by the spitting method described by Navazesh [41]. Saliva samples were homogenized and clarified by centrifugation at 1200 RPMI for 15 min at 4 °C. The aliquots of clarified supernatants were stored at −70 °C for the ELISA measurements.

4.6. Analysis of Salivary MMP-9, MMP-2, Resistin, Visfatin, IL-6, IL-1β and TNF-α Concentration

Highly sensitive assay kits (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) were used to measure the concentrations of proteins in the salivary samples of the control and experimental subjects. The microtiter plates provided in the kits were pre-coated with an antibody specific to the analyzed antigen. The tests were carried out according to the manufacturer's protocols.

4.7. Statistical Methods

Statistical analysis was performed using STATISTICA 13.3 software (StatSoft, Cracow, Poland). The significance level was $p < 0.05$. The values of the median, as well as the lower and upper quartiles, were determined. Comparative analysis of salivary adipokines

and cytokines between groups was performed using the Kruskal–Wallis ANOVA and the median test. The assessment of the relationship between the concentration of pro-inflammatory parameters in saliva and hepatic laboratory parameters in serum and the CAP of elastography was performed using Spearman's rank correlation. Non-parametric methods were used due to the lack of normality of the distribution.

5. Conclusions

The results of this study indicate an important direction in the diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease, i.e., the use of adipokines and cytokines as biomarkers of this disease. The obtained results showed that potential markers of NAFLD development may include: MMP-2, IL-1β and resistin, determined in saliva. However, to the best of our knowledge, our study is the first to assess the concentration of selected pro-inflammatoey parameters in saliva among people with obesity and non-alcoholic fatty liver disease. Therefore, further studies on a larger group of patients are necessary, the aim of which should be both to unambiguously determine whether the given adipokines and cytokines can be used as biomarkers of NAFLD, as well as to confirm whether saliva can be used as an alternative diagnostic material for blood serum. It should be noted that blood serum is a more homogeneous material than saliva, but saliva collection is a non-invasive procedure. In our next study, we plan to focus on pro-inflammatory cytokines and adipokines in serum, and characteristic/comparing on both materials.

Author Contributions: Conceptualization, L.O.; methodology, B.Z., L.O. and J.S.-Z.; software, B.Z. and J.S.-Z.; validation, L.O.; formal analysis, B.Z., L.O., J.S.-Z., K.W.-S. and A.G.; investigation, B.Z., L.O. and J.S.-Z.; resources, B.Z. and J.S.-Z.; data curation, B.Z., J.S.-Z., K.W.-S. and A.G.; writing—original draft preparation, B.Z., L.O. and J.S.-Z.; writing—review and editing, L.O. and A.B.; visualization, B.Z., L.O. and J.S.-Z.; supervision, L.O.; project administration, B.Z., L.O. and J.S.-Z.; funding acquisition, B.Z., L.O. and J.S.-Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was funded by internal sources of the Medical University of Bialystok (Project numbers: SUB/3/DN/21/001/3316, SUB/3/DN/21/002/3316 and SUB/3/DN/22/002/3316).

Institutional Review Board Statement: This study was approved by the local Bioethics Committee of the Medical University of Bialystok, Poland (No. R-I-002/647/2019, APK.002.468.2020 and APK.002.39.2021).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in this study.

Data Availability Statement: Data available on request due to restrictions, e.g., privacy or ethical.

Acknowledgments: We would like to thank TIBA Ltd. for its cooperation—the exclusive distributor of FibroScan devices in Poland. The graphical abstract was created with BioRender.com.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Younossi, Z.M. Non-alcoholic fatty liver disease—A global public health perspective. *J. Hepatol.* **2019**, *70*, 531–544. [CrossRef] [PubMed]
2. Younossi, Z.; Tacke, F.; Arrese, M.; Sharma, B.C.; Mostafa, I.; Bugianesi, E.; Wong, V.W.-S.; Yilmaz, Y.; George, J.; Fan, J.; et al. Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* **2019**, *69*, 2672–2682. [CrossRef]
3. Makri, E.; Goulas, A.; Polyzos, S.A. Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis and Emerging Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Arch. Med. Res.* **2021**, *52*, 25–37. [CrossRef]
4. Nassir, F. NAFLD: Mechanisms, Treatments, and Biomarkers. *Biomolecules* **2022**, *12*, 824. [CrossRef] [PubMed]
5. Kamarajah, S.K.; Chan, W.-K.; Mustapha, N.R.N.; Mahadeva, S. Repeated liver stiffness measurement compared with paired liver biopsy in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol. Int.* **2018**, *12*, 44–55. [CrossRef]
6. Yilmaz, Y.; Yesil, A.; Gerin, F.; Ergelen, R.; Akin, H.; Celikel, Ç.A.; Imeryuz, N. Detection of hepatic steatosis using the controlled attenuation parameter: A comparative study with liver biopsy. *Scand. J. Gastroenterol.* **2014**, *49*, 611–616. [CrossRef]

7. De Lédinghen, V.; Hiriart, J.-B.; Vergniol, J.; Merrouche, W.; Bedossa, P.; Paradis, V. Controlled Attenuation Parameter (CAP) with the XL Probe of the Fibroscan®: A Comparative Study with the M Probe and Liver Biopsy. *Dig. Dis. Sci.* **2017**, *62*, 2569–2577. [CrossRef] [PubMed]
8. Kulak-Bejda, A.; Waszkiewicz, N.; Bejda, G.; Zalewska, A.; Maciejczyk, M. Diagnostic Value of Salivary Markers in Neuropsychiatric Disorders. *Dis. Markers* **2019**, *2019*, 4360612. [CrossRef] [PubMed]
9. Carpenter, G.H. The Secretion, Components, and Properties of Saliva. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2013**, *4*, 267–276. [CrossRef]
10. Maciejczyk, M.; Mil, K.M.; Gerreth, P.; Hojan, K.; Zalewska, A.; Gerreth, K. Salivary cytokine profile in patients with ischemic stroke. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 17185. [CrossRef]
11. Park, H.K.; Kwak, M.K.; Kim, H.J.; Ahima, R.S. Linking resistin, inflammation, and cardiometabolic diseases. *Korean J. Intern. Med.* **2017**, *32*, 239–247. [CrossRef] [PubMed]
12. Ismaiel, A.; Leucuta, D.-C.; Popa, S.-L.; Dumitrascu, D.L. Serum Visfatin Levels in Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Liver Fibrosis: Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 3029. [CrossRef]
13. Maciejewska, D.; Stachowska, E. Niealkoholowe stłuszczenie wątroby (NAFLD)–epidemia XXI wieku. *Postep. Hig. Med. Dosw. (Online)* **2018**, *72*, 659–670. [CrossRef]
14. Barchuk, M.; Schreier, L.; Berg, G.; Miksztowicz, V. Metalloproteinases in non-alcoholic fatty liver disease and their behavior in liver fibrosis. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **2018**, *41*, 1–7. [CrossRef] [PubMed]
15. Kasper, P.; Martin, A.; Lang, S.; Kütting, F.; Goeser, T.; Demir, M.; Steffen, H.-M. NAFLD and cardiovascular diseases: A clinical review. *Clin. Res. Cardiol.* **2021**, *110*, 921–937. [CrossRef]
16. Hannah, W.N., Jr.; Harrison, S.A. Noninvasive imaging methods to determine severity of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **2016**, *64*, 2234–2243. [CrossRef]
17. Fracanzani, A.L.; Valenti, L.; Bugianesi, E.; Andreoletti, M.; Colli, A.; Vanni, E.; Bertelli, C.; Fatta, E.; Bignamini, D.; Marchesini, G.; et al. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: A role for insulin resistance and diabetes. *Hepatology* **2008**, *48*, 792–798. [CrossRef]
18. Skelly, M.M.; James, P.D.; Ryder, S.D. Findings on liver biopsy to investigate abnormal liver function tests in the absence of diagnostic serology. *J. Hepatol.* **2001**, *35*, 195–199. [CrossRef]
19. Mofrad, P.; Contos, M.J.; Haque, M.; Sargeant, C.; Fisher, R.A.; Luketic, V.A.; Sterling, R.K.; Shiffman, M.L.; Stravitz, R.T.; Sanyal, A.J. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology* **2003**, *37*, 1286–1292. [CrossRef] [PubMed]
20. Dev, N.; Kumar, R.; Porwal, Y.; Kumar, P.; Chakravarthy, S.; Kumawat, A. Association of high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in Asian Indians: A cross-sectional study. *J. Fam. Med. Prim. Care* **2020**, *9*, 390–394. [CrossRef]
21. Yeniova, A.O.; Küçükazman, M.; Ata, N.; Dal, K.; Kefeli, A.; Başyiğit, S.; Aktaş, B.; Ağladioğlu, K.; Akin, K.O.; Ertugrul, D.T.; et al. High-sensitivity C-reactive protein is a strong predictor of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepato-Gastroenterology* **2014**, *61*, 422–425.
22. Wang, H.; Mehal, W.; Nagy, L.E.; Rotman, Y. Immunological mechanisms and therapeutic targets of fatty liver diseases. *Cell. Mol. Immunol.* **2020**, *18*, 73–91. [CrossRef]
23. Petrescu, M.; Vlaicu, S.I.; Ciumărnean, L.; Milaciu, M.V.; Mărginean, C.; Florea, M.; Vesa, S.C.; Popa, M. Chronic Inflammation—A Link between Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Dysfunctional Adipose Tissue. *Medicina* **2022**, *58*, 641. [CrossRef] [PubMed]
24. Chen, J.; Deng, X.; Liu, Y.; Tan, Q.; Huang, G.; Che, Q.; Guo, J.; Su, Z. Kupffer Cells in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Friend or Foe? *Int. J. Biol. Sci.* **2020**, *16*, 2367–2378. [CrossRef] [PubMed]
25. Duffles, L.F.; Hermont, A.P.; Abreu, L.G.; Pordeus, I.A.; Silva, T.A. Association between obesity and adipokines levels in saliva and gingival crevicular fluid: A systematic review and meta-analysis. *J. Evidence-Based Med.* **2019**, *12*, 313–324. [CrossRef] [PubMed]
26. Zyśk, B.; Ostrowska, L.; Smarkusz-Zarzecka, J. Salivary Adipokine and Cytokine Levels as Potential Markers for the Development of Obesity and Metabolic Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11703. [CrossRef]
27. Pfaffe, T.; Cooper-White, J.; Beyerlein, P.; Kostner, K.; Punyadeera, C. Diagnostic Potential of Saliva: Current State and Future Applications. *Clin. Chem.* **2011**, *57*, 675–687. [CrossRef]
28. Tvarijonaviciute, A.; Martinez-Lozano, N.; Rios, R.; de Teruel, M.C.M.; Garaulet, M.; Cerón, J.J. Saliva as a non-invasive tool for assessment of metabolic and inflammatory biomarkers in children. *Clin. Nutr.* **2020**, *39*, 2471–2478. [CrossRef]
29. Mamali, I.; Roupas, N.D.; Armeni, A.K.; Theodoropoulou, A.; Markou, K.B.; Georgopoulos, N.A. Measurement of salivary resistin, visfatin and adiponectin levels. *Peptides* **2012**, *33*, 120–124. [CrossRef] [PubMed]
30. Yilmaz, Y.; Eren, F. Serum biomarkers of fibrosis and extracellular matrix remodeling in patients with nonalcoholic fatty liver disease: Association with liver histology. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *31*, 43–46. [CrossRef] [PubMed]
31. Ando, W.; Yokomori, H.; Tsutsui, N.; Yamanouchi, E.; Suzuki, Y.; Oda, M.; Inagaki, Y.; Otori, K.; Okazaki, I. Serum matrix metalloproteinase-1 level represents disease activity as opposed to fibrosis in patients with histologically proven nonalcoholic steatohepatitis. *Clin. Mol. Hepatol.* **2018**, *24*, 61–76. [CrossRef]
32. Goyale, A.; Jain, A.; Smith, C.; Papatheodoridi, M.; Misas, M.G.; Roccarina, D.; Prat, L.I.; Mikhailidis, D.P.; Nair, D.; Tsochatzis, E. Assessment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) severity with novel serum-based markers: A pilot study. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0260313. [CrossRef]

33. Livzan, M.A.; Akhmedov, V.A.; Krolevets, T.S.; Gaus, O.V.; Cherkashenko, N.A. Informativnost' neinvazivnykh markerov fibroza pecheni u patsientov s nealkogol'noi zhirovoi bolezn'yu pecheni [The informative value of non-invasive liver fibrosis markers in patients with nonalcoholic fatty liver disease]. *Ter Arkh.* **2016**, *88*, 62–68. [CrossRef]
34. Wagner, J.; Kumar, Y.; Lautenbach, A.; von Kroge, P.; Wolter, S.; Mann, O.; Izbicki, J.; Gagliani, N.; Duprée, A. Fatty acid-binding protein-4 (FABP4) and matrix metalloproteinase-9 (MMP9) as predictive values for nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Lipids Health Dis.* **2023**, *22*, 1. [CrossRef]
35. Duan, Y.; Pan, X.; Luo, J.; Xiao, X.; Li, J.; Bestman, P.L.; Luo, M. Association of Inflammatory Cytokines With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 880298. [CrossRef] [PubMed]
36. Vonghia, L.; Magrone, T.; Verrijken, A.; Michielsen, P.; Van Gaal, L.L.; Jirillo, E.; Francque, S. Peripheral and Hepatic Vein Cytokine Levels in Correlation with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)-Related Metabolic, Histological, and Haemodynamic Features. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0143380. [CrossRef] [PubMed]
37. Hadinia, A.; Doustimotlagh, A.H.; Goodarzi, H.R.; Arya, A.; Jafarinia, M. Circulating Levels of Pro-inflammatory Cytokines in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Iran J. Immunol.* **2019**, *16*, 327–333. [CrossRef]
38. Qiu, Y.; Wang, S.-F.; Yu, C.; Chen, Q.; Jiang, R.; Pei, L.; Huang, Y.-L.; Pang, N.-Z.; Zhang, Z.; Ling, W.; et al. Association of Circulating Adipsin, Visfatin, and Adiponectin with Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Adults: A Case-Control Study. *Ann. Nutr. Metab.* **2018**, *74*, 44–52. [CrossRef] [PubMed]
39. Mousavi, Z.; Ganji, A.; Tehrani, D.F.; Bahari, A.; EsmaeilZadeh, A.; Delghandi, M. Correlation of visfatin level with non-alcoholic fatty liver in metabolic syndrome. *Med. J. Islam. Repub. Iran* **2017**, *31*, 167–170. [CrossRef] [PubMed]
40. Elkabany, Z.A.; Hamza, R.T.; Ismail, E.A.R.; Elsharkawy, A.; Yosry, A.; Musa, S.; Khalaf, M.A.; Elgawesh, R.M.; Esmat, G. Serum visfatin level as a noninvasive marker for nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents with obesity: Relation to transient elastography with controlled attenuation parameter. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *32*, 1008–1016. [CrossRef]
41. Navazesh, M. Methods for Collecting Saliva. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1993**, *20*, 72–77. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

12.3. Publikacja oryginalna nr 2. (P.3)

nutrients

MDPI

Article

Evaluation of the Diagnostic Utility of Selected Serum Adipokines and Cytokines in Subjects with MASLD—A Pilot Study

Beata Zyśk [1,*], Lucyna Ostrowska [1], Joanna Smarkusz-Zarzecka [1], Karolina Orywal [2], Barbara Mroczko [2] and Urszula Cwalina [3]

[1] Department of Dietetics and Clinical Nutrition, Medical University of Białystok, Mieszka I 4B Street, 15-054 Białystok, Poland; lucyna.ostrowska@umb.edu.pl (L.O.)
[2] Department of Biochemical Diagnostics, Medical University of Białystok, Waszyngtona 15A Street, 15-269 Białystok, Poland; mroczko@umb.edu.pl (B.M.)
[3] Department of Biostatistics and Medical Informatics, Medical University of Białystok, Szpitalna 37 Street, 15-295 Białystok, Poland
* Correspondence: beata.zysk@sd.umb.edu.pl

Abstract: Excess adipose tissue, particularly of the visceral type, triggering chronic low-grade inflammation and altering its secretory profile, is a contributing factor to the initiation and progression of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD). This study aimed to compare the levels of selected adipokines and cytokines in individuals with normal weight and obesity, assessing their potential for diagnosing MASLD and establishing a cutoff point for body fat content associated with hepatic steatosis development. The research involved 99 participants categorized by body mass index and MASLD presence, undergoing body composition analysis, liver elastography, biochemical tests, and evaluation of adipokines and cytokines in serum. The results indicated elevated IL-6 (interleukin 6) serum levels in individuals with obesity with MASLD compared to the normal-weight group without MASLD. The multivariate regression analysis demonstrated a connection between hepatic steatosis and total adipose tissue content, VAT (visceral adipose tissue), VAT/SAT (subcutaneous adipose tissue) ratio, HOMA-IR (homeostasis model assessment of insulin resistance), IL-6, Il-1β (interleukin 1β), and MMP-2 (matrix metalloproteinase 2). Among the adipokines and cytokines examined in this study, interleukin 6 was the strongest predictor of MASLD regardless of gender. In addition, an association between the development of hepatic steatosis and higher serum IL-1β levels and higher adipose tissue was observed in women. However, further studies on a larger group of patients are needed to consider the use of these cytokines as markers of MASLD. The HOMA-IR index demonstrated potential diagnostic utility in identifying hepatic steatosis.

Keywords: hepatic steatosis; NAFLD; MASLD; adipose tissue; visceral adipose tissue; VAT; adipokines; cytokines; Il-6; Il-1β

check for updates

Citation: Zyśk, B.; Ostrowska, L.; Smarkusz-Zarzecka, J.; Orywal, K.; Mroczko, B.; Cwalina, U. Evaluation of the Diagnostic Utility of Selected Serum Adipokines and Cytokines in Subjects with MASLD—A Pilot Study. *Nutrients* **2024**, *16*, 1381. https://doi.org/10.3390/nu16091381

Academic Editors: Javier Gómez-Ambrosi and Milan Piya

Received: 23 February 2024
Revised: 28 April 2024
Accepted: 29 April 2024
Published: 2 May 2024

Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Given that the primary cause of hepatic steatosis, aside from chronic excessive alcohol intake, is systemic metabolic dysfunction stemming from peripheral and hepatic insulin resistance, a proposition emerged in 2020 among global experts to alter the current nomenclature from "non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)" to "metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD)" [1]. In 2023, there was a renewed proposal to modify the terminology to "metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD)". This revised term considers the potential coexistence of these crucial etiological factors—metabolic syndrome and alcohol abuse—in the onset of liver steatosis, as well as the prospect of its development in individuals without obesity [2].

The global prevalence of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) has risen by approximately 50% in the general population over the past 30 years, now impacting up to one-third of the global population [3]. The prevalence is notably higher in patients with obesity, reaching 75.3% [4], owing to the close connection between MASLD pathogenesis and metabolic disorders arising from prolonged positive energy balance, leading to excessive visceral adipose tissue (VAT) and its disorders [5]. Nevertheless, MASLD can also develop in individuals of normal weight or overweight, constituting approximately 18.3% of the adult population [6]. It is hypothesized that these individuals may exhibit increased VAT and a heightened risk of developing metabolic disorders, and relying solely on body mass index (BMI) may not be a reliable marker for diagnosing MASLD [7].

Visceral adipose tissue exhibits significantly higher metabolic activity compared to subcutaneous adipose tissue (SAT). A mere 1% rise in its content results in a substantial 40% increase in hepatic lipid accumulation [8]. Adipose tissue plays a pivotal role in the onset and the progression of MASLD, owing to its capability to release numerous biologically active substances. The surplus adipose tissue, particularly visceral adipose tissue, creates a predisposition for chronic low-grade inflammation, accompanied by alterations in its secretory profile. This involves heightened secretion of leptin, tumor necrosis factor α (TNF-α), and interleukin 6 (IL-6), as well as a reduction in adiponectin secretion [9].

The relationship between leptin and adiponectin and MASLD has been extensively described in the previous literature. However, further research on adiponectin is impotant, as this adipokine is a promising diagnostic and therapeutic target [5,9]. There are still many adipokines and cytokines whose involvement in the pathogenesis of MASLD and MASH is still unclear, including resistin, TNF-α, IL-6, IL-1β (interleukin 1β), IL-23 (interleukin 23), and extracellular matrix metalloproteinases (more specifically, gelatinase). The assessment of concentrations of specific adipokines and cytokines holds promise as a potential component in the diagnosis of hepatic steatosis. Currently, a very reliable and sensitive method of assessing the degree of steatosis is the transient elastography method [1]. An analysis of the correlation of the degree of hepatic steatosis, as assessed by this method, with serum concentrations of adipokines and cytokines will be helpful in finding potential markers of MASLD. Blood samples for determining these adipokines or cytokines could conveniently be collected alongside other routine blood biochemical tests.

The purpose of this research was to assess and compare the serum levels of specific adipokines and cytokines in individuals with normal weight and obesity, exploring their potential utility in diagnosing MASLD. Additionally, the study sought to determine a cutoff value for body fat content that may contribute to the onset of hepatic steatosis.

2. Materials and Methods

An observational study was carried out in July and August 2020, with approval obtained from the Bioethics Committee of the Medical University of Bialystok (Approval Nos. RI-002/647/2019, APK.002.468.2020, and APK.002.39.2021). Detailed information about the study was provided to the participants, who were informed of the possibility of withdrawing from the study at any point. Written consent was obtained from all participants. The sequential steps of the study are depicted in Figure 1.

Figure 1. Stages of the observational study.

2.1. Criteria for Qualifying Patients for the Study

Subjects in the age range of 20–55 years, women and men with normal body weight (BMI = 18.5–24.9 kg/m^2), as well as primary obesity of the first and second degree (BMI = 30.0–39.9 kg/m^2), were eligible to participate in the study by random selection. Exclusion criteria for the study included the presence of viral hepatitis (all types), hepatic cholestasis, and daily alcohol consumption >30 g in men and >20 g in women, as well as the presence of type 1 and 2 diabetes mellitus, acute coronary artery disease, eating disorders, endocrine disorders; the use of hormonal contraception or hormone replacement therapy; a history of steroid therapy and antiretroviral therapy; the presence of a pacemaker; and pregnancy and lactation. For participants with obesity, additional exclusion criteria were secondary obesity and pharmacological or surgical treatment of obesity.

Participants were selected based on their medical history, resulting in the inclusion of 107 subjects. They underwent a nutrition assessment and were categorized according to BMI. Thus, the participants were divided into a group of normal weight (n = 38) and a group with obesity (n = 69). Subsequently, all participants underwent liver elastography to evaluate the presence of hepatic steatosis and fibrosis. Each participant's blood pressure was measured using an electric blood pressure monitor and selected biochemical parameters were assessed. The next step was to assess the presence of MASLD among all participants based on the latest diagnostic criteria [2]:

Hepatic steatosis identified by imaging and at least 1 out of 5 of the following:

- ✓ BMI ≥25 kg/m² or waist circumference >94 cm (men) and >80 cm (women);
- ✓ Fasting serum glucose ≥5.6 mmol/L [100 mg/dL] or 2 h post-load glucose levels ≥7.8 mmol/L [≥140 mg/dL];
- ✓ Blood pressure ≥130/85 mmHg or specific antihypertensive drug treatment;
- ✓ Plasma triglycerides ≥1.70 mmol/L (150 mg/dL) or lipid lowering treatment;
- ✓ Plasma HDL-cholesterol ≤1.0 mmol/L (40 mg/dL) (men) and ≤1.3 mmol/L (50 mg/dL) (women) OR lipid lowering treatment.

From the control group (with normal body weight), 8 subjects meeting MASLD criteria were eliminated. The explicit grouping was structured as follows:

- Group G1 comprised individuals with normal weight without MASLD (n = 30).
- Group G2 included those with obesity without MASLD (n = 11).
- Group G3 encompassed those with obesity and MASLD (with or without hepatic fibrosis) (n = 58).

2.2. Nutrition Assessment

All subjects taking part in the study had their body weight (to the nearest 0.01 kg) and body height (to the nearest 0.5 cm) measured using a WPT 100/200 OW (RADWAG, Radom, Poland) scale with a height gauge. In addition, the body mass index was calculated from the following formula:

$$BMI = \frac{\text{weight(kg)}}{\text{height(m)}^2}$$

Study participants underwent a body composition analysis through electrical bioimpedance, and their cross-sectional fat area in the abdominal region was assessed using a BioScan 920-2 device (Maltron, Rayleigh, Essex, UK). The assessments were conducted in the morning, and participants took part in the study after fasting and refraining from vigorous physical activity the day before.

First, the study assessed total body fat (kg, %). A body fat percentage exceeding 35% in women and 25% in men indicates the presence of obesity. The body composition analysis was conducted with participants in the supine position, and electrodes were positioned on the right upper and lower limbs. Subsequently, the abdominal cross-sectional fat area, including visceral (cm^2, %) and subcutaneous (cm^2, %), was determined. Values exceeding 120 cm^2 for VAT and over 225 cm^2 for SAT are considered elevated [10]. The quantitative analysis of abdominal adipose tissue was performed in the standing position, with electrodes aligned horizontally at the umbilical level. The ratio of visceral to subcutaneous fat (VAT/SAT) was also calculated, with values exceeding 0.9 indicating an increased risk of developing metabolic diseases [10]. The results were processed using Maltron BioScan 920 v1.1 software.

2.3. Transient Elastography Measurement of Liver Stiffness and Steatosis

Liver elastography was conducted using the FibroScan 530 Compact device (Echosens, Paris, France). Employing the Vibration-Controlled Transient Elastography (VCTE) method, this device allows for the measurement of liver stiffness. Additionally, it offers the option of assessing the controlled attenuation parameter (CAP) to measure liver steatosis.

Trained operators conducted a series of 10 valid measurements on each participant to ensure the accuracy and reproducibility of the results. Depending on individual anatomical conditions, M- and XL-sized heads were used. The test was performed either in a fasting state or a minimum of 6 h after a meal, with participants in a supine position and the right arm extended and positioned behind the head. An adequate amount of gel was applied before measurement, and the head was positioned in the right intercostal region at the level of the thickest layer of liver parenchyma, avoiding measurement near the liver's lower or upper edge due to the risk of overestimation in the subcapsular space. During the measurement series, the proper positioning of the probe, i.e., perpendicular to the integuments, was ensured [11].

Liver stiffness (E) correlates with the fibrosis of this organ. The value of this parameter is calculated based on the speed of propagation of the transverse wave, spreading several centimeters into the liver. The transverse wave is generated at a controlled frequency (50 Hz), with the characteristic parameter specific for determining liver stiffness [11].

The results obtained were interpreted using a 5-point scale representing the relationship between liver stiffness (in kPa; kilopascal) and the degree of liver fibrosis [12], and the corresponding ranges are illustrated in Figure 2.

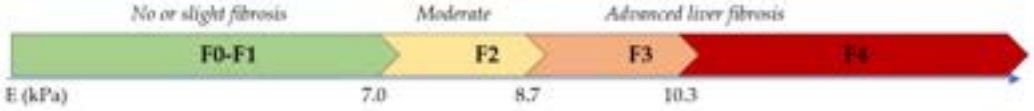


Figure 2. Degrees of liver fibrosis (transient elastography measurement of liver stiffness).

Measurement of the CAP® is carried out simultaneously with the measurement of liver stiffness and allows for quantitative assessment of liver steatosis. This parameter is determined by measuring the ultrasound attenuation phenomenon and is expressed in dB/m (decibel/meter). It describes the fading of the ultrasound signal depending on the depth of penetration in the liver.

The values of the CAP parameter were classified based on the 4-stage liver steatosis scale [13], which is shown in Figure 3.

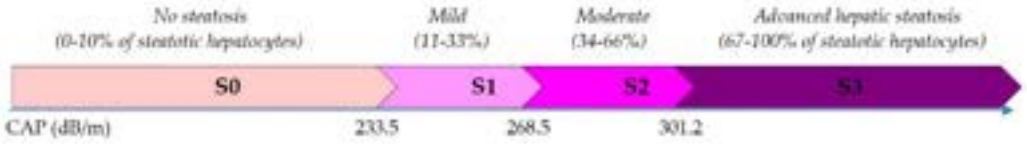


Figure 3. Degrees of liver steatosis (transient elastography measurement of liver steatosis).

2.4. Evaluation of Biochemical Parameters and Adipokine and Cytokine Serum Levels

2.4.1. Collection of Blood Samples

Blood used in the study was collected in the morning (7:00–10:00 a.m.) from all participants at the same laboratory. Participants were informed in advance about the necessary preparations for the test, which included avoiding heavy, fatty meals and alcohol on the day before the test. Additionally, they were instructed to refrain from increased physical activity immediately before the test. Participants were required to fast before entering the study. Venous blood samples (15 mL) were collected from each patient into a tube with a clot activator (S-Monovette, SARSTEDT, Numbrecht, Germany) and centrifuged to obtain serum samples. Blood serum was utilized for blood biochemical tests, while the remaining quantity of blood serum was frozen at −80 °C for the determination of adipokine and cytokine levels.

2.4.2. Methods for Evaluating Selected Biochemical Parameters

Among the participants, serum concentrations of fasting glucose, glucose after 1 h and 2 h OGTT (oral glucose tolerance test), fasting insulin, insulin after 1 h and 2 h OGTT, total cholesterol, HDLs (high-density lipoproteins), LDLs (low-density lipoproteins), TG (triglycerides), AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine transaminase), GGTP (gamma-glutamyl transferase), ALP (alkaline phosphatase), and CRP (C-reactive protein) were assessed with ALINITY ci-series (Abbott, Wiesbaden, Germany). Concentration of cholesterol was assessed method with cholesterol esterase, HDL by method with accelerator selective detergent, LDL using method with liquid selective detergent, triglyceride with method with glycerol phosphate oxidase, ALT and AST by spectrophotometric method with NADH, GGTP by method with L-gamma-glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide as a substrate, and ALP by method with para-nitrophenyl phosphate. Meanwhile, serum C-reactive protein (CRP) concentrations were determined using turbidimetric method, glucose using method with hexokinase, and insulin using chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA).

2.4.3. Methods for Determining Serum Levels of Adipokines and Cytokines

Serum levels of total adiponectin, resistin, TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-23, and total MMP-2 (matrix metalloproteinase 2) and MMP-9 (matrix metalloproteinase 9) were assessed in all subjects participating in the study with the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufactures' instructions (R&D Systems, Abingdon, UK).

2.5. Statistical Analysis of the Results

"Statistica" software (version 13 PL; TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA) was employed for the statistical analysis of the results. Due to the small size of one of the groups, it was not possible to assess the normality of the distribution of variables within this group. Therefore, nonparametric methods were used. The Kruskal–Wallis ANOVA test with post hoc analysis was applied to evaluate the significance of quantitative variables, while differences between qualitative variables were assessed using the chi-square test of independence. Multivariate analysis was performed by utilizing multivariate regression modeling the variable that determines the dependent variable (CAP). Regression models were performed for the CAP dependent variable (separate models for women and men), where the independent variables were total adipose tissue (%), VAT (cm^2), VAT/SAT Ratio, HOMA-IR index, and adipokines and cytokines. For the diagnosis of hepatic steatosis, ROC

analysis was performed, and the tangent method was employed to calculate cutoff points for optimal parameter accuracy. The overall effectiveness was expressed by examining the area under the ROC curve with a 95% confidence interval. The statistical significance level was set at $p < 0.05$.

3. Results

Table 1 shows the characteristics of the study participants, divided into groups on the basis of body mass index and the criterion for the presence of MASLD.

Table 1. Baseline characteristics of study participants.

Parameter	G1 (n = 30) Normal Weight without MASLD		G2 (n = 11) Obesity without MASLD		G3 (n = 58) Obesity with MASLD		*P*			
	Median	Q1–Q3	Median	Q1–Q3	Median	Q1–Q3	K-W All Groups	Post Hoc G1–G2	Post Hoc G2–G3	Post Hoc G1–G3
Age (years)	35.50	29.00–43.00	39.00	30.00–46.00	46.00	40.00–52.00	<0.001 *	1.000	0.185	<0.001 *
BMI (kg/m^2)	23.10	22.20–24.60	31.60	31.00–33.00	34.45	32.60–36.60	<0.001 *	0.005 *	0.113	<0.001 *
Total adipose tissue (%)	27.69	22.19–30.39	38.34	33.52–45.15	42.52	33.83–46.91	<0.001 *	0.001 *	1.000	<0.001 *
VAT (cm^2)	87.50	65.00–132.00	220.00	148.00–261.00	291.00	199.00–350.00	<0.001 *	0.014 *	0.328	<0.001 *
SAT (cm^2)	66.50	57.00–92.00	112.00	92.00–145.00	135.50	110.00–151.00	<0.001 *	0.004 *	0.666	<0.001 *
VAT/SAT ratio	1.37	0.94–1.62	1.89	1.42–2.51	2.18	1.56–2.86	<0.001 *	0.161	0.865	<0.001 *
CAP (dB/m)	193.50	178.00–214.00	215.00	197.00–229.00	292.50	276.00–315.00	<0.001 *	1.000	<0.001 *	<0.001 *
E (kPa)	3.85	3.30–5.00	4.10	2.80–4.50	5.50	4.30–6.30	<0.001 *	1.000	0.042 *	<0.001 *
	n	%	n	%	n	%				
Women	26	86.67	8	72.73	36	62.07				
Men	4	13.33	3	27.27	22	37.93				

Values are expressed as the median and interquartile range (Q1–Q3) or percentage of respondents (%); *p* *—statistical significance ($p < 0.05$). Abbreviations: BMI—body mass index; VAT—visceral adipose tissue; SAT—subcutaneous adipose tissue; CAP—controlled attenuation parameter; dB/m—decibel/meter; kPa—kilopascal.

Over 84% of participants with obesity were diagnosed with MASLD (G3). Individuals in this group were not statistically significantly different from those without MASLD (G2) in terms of gender ($p = 0.500$), age ($p = 0.185$), BMI ($p = 0.113$), total adipose tissue ($p = 1.000$), VAT ($p = 0.328$), SAT ($p = 0.666$), and VAT/SAT ratio ($p = 0.865$). The groups differed significantly in the values of the CAP parameter ($p < 0.001$) and the parameter assessing liver fibrosis, E ($p = 0.042$). In the G3 group, grade I hepatic steatosis was observed in 12 subjects (21%), grade II—in 24 subjects (41%), and grade III—in 22 subjects (38%). Liver fibrosis in this group was observed in 12 people, i.e., 21% (grade I fibrosis—in 4 people (7%); grade II fibrosis—in 6 people (10%); grade III fibrosis—in 1 person (2%); and grade IV fibrosis—also in 1 person (2%)).

Table 2 compares the serum concentrations of selected adipokines and cytokines in the subjects.

Table 2. Comparative analysis of concentrations of selected adipokines and cytokines in the study groups.

Parameter	G1 (n = 30)		G2 (n = 11)		G3 (n = 58)		*P*			
	Median	Q1–Q3	Median	Q1–Q3	Median	Q1–Q3	K-W All Groups	Post Hoc G1–G2	Post Hoc G2–G3	Post Hoc G1–G3
Adiponectin (ng/mL)	6728.05	4453.80–11,906.50	7448.80	4717.90–8764.00	6283.30	4255.00–9762.30	0.585	–	–	–
Resistin (ng/mL)	9.85	8.02–12.61	14.08	9.47–17.98	11.37	8.82–15.04	0.086	–	–	–
TNF-α (pg/mL)	3.67	2.30–4.84	3.17	0.52–4.95	3.86	2.38–5.79	0.491	–	–	–

Table 2. *Cont.*

Parameter	G1 (n = 30)		G2 (n = 11)		G3 (n = 50)		*p*			
	Median	Q1–Q3	Median	Q1–Q3	Median	Q1–Q3	K-W All Groups	Post Hoc		
								G1–G2	G2–G3	G1–G3
IL-6 (pg/mL)	0.70	0.27–1.24	1.53	1.24–2.08	2.00	1.51–2.87	<0.001 *	0.025 *	0.953	<0.001 *
IL-1β (pg/mL)	0.54	0.14–1.22	0.52	0.09–0.63	0.34	0.01–0.90	0.212	–	–	–
IL-23 (pg/mL)	2.40	0.91–4.29	3.33	0.00–6.59	0.71	0.00–2.47	0.029 *	1.000	0.308	0.052
MMP-2 (ng/mL)	399.83	308.68–530.26	375.64	291.78–628.68	339.40	270.76–436.70	0.087	–	–	–
MMP-9 (ng/mL)	859.10	624.10–1083.80	1037.00	628.40–1630.80	811.55	656.10–1091.90	0.360	–	–	–

Values are expressed as median and interquartile range (Q1–Q3). Statistically significant differences between the medians were detected by the Kruskal–Wallis ANOVA test with post hoc analysis; *p* *—statistical significance ($p < 0.05$). Abbreviations: TNF-α—tumor necrosis factor alpha; IL-6—interleukin 6; IL-1β—interleukin 1β; IL-23—interleukin 23; MMP-2—matrix metalloproteinase 2; MMP-9—matrix metalloproteinase 9; ng/mL—nanograms/milliliter; pg/mL—picograms/milliliter.

Statistically significant differences were observed in interleukin-6 concentrations when comparing G1 vs. G2 ($p = 0.025$) and G1 vs. G3 ($p < 0.001$) groups. However, no statistically significant differences were found in interleukin-6 concentrations between subjects with obesity (G2) and those with obesity and MASLD (G3). There were no statistically significant differences in the concentrations of other evaluated adipokines, cytokines, and gelatinases among all study groups.

Selected blood biochemical parameters were then evaluated and are shown in Table 3.

Table 3. Comparative analysis of selected biochemical parameters between groups.

Parameter	G1 (n = 30)		G2 (n = 11)		G3 (n = 50)		*p*			
	Median	Q1–Q3	Median	Q1–Q3	Median	Q1–Q3	K-W All Groups	Post Hoc		
								G1–G2	G2–G3	G1–G3
CRP (mg/L)	1.00	1.00–1.30	1.10	1.00–3.70	2.25	1.40–4.10	<0.001 *	0.774	0.132	<0.001 *
Fasting glucose (mg/dL)	91.00	85.00–94.00	95.00	89.00–104.00	96.00	89.00–106.00	0.032 *	0.822	1.000	0.026 *
Glucose after 1 h (mg/dL)	124.50	85.00–145.00	116.00	93.00–138.00	147.00	123.00–182.00	0.001 *	1.000	0.065	0.001 *
Glucose after 2 h (mg/dL)	97.50	84.00–110.00	98.00	80.00–107.00	106.50	98.00–127.00	0.005 *	1.000	0.050	0.019 *
Fasting insulin (µU/mL)	6.25	4.70–8.10	9.40	7.40–12.40	12.35	8.60–15.50	<0.001 *	0.039 *	0.620	<0.001 *
HOMA-IR	1.41	1.03–1.89	2.28	1.67–3.03	2.84	1.93–4.22	<0.001 *	0.045 *	0.645	<0.001 *
QUICKI	0.36	0.35–0.38	0.34	0.32–0.35	0.33	0.31–0.35	<0.001 *	0.043 *	0.840	<0.001 *
AST (U/L)	17.50	16.00–19.00	20.00	18.00–26.00	20.00	16.00–27.00	0.073	–	–	–
ALT (U/L)	15.00	13.00–19.00	23.00	18.00–30.00	25.00	20.00–34.00	<0.001 *	0.034 *	1.000	<0.001 *
GGTP (U/L)	14.00	11.00–17.00	21.00	15.00–28.00	27.50	20.00–43.00	<0.001 *	0.058	0.425	<0.001 *
ALP (IU/L)	53.50	45.00–63.00	52.00	48.00–59.00	62.00	50.00–72.00	0.034 *	1.000	0.150	0.102
Cholesterol-T (mg/dL)	190.50	179.00–231.00	216.00	182.00–232.00	199.50	181.00–231.00	0.562	–	–	–
HDL-C (mg/dL)	61.50	51.00–76.00	55.00	43.00–72.00	48.50	42.00–56.00	0.001 *	0.493	0.712	<0.001 *
LDL-C (mg/dL)	100.50	82.00–115.00	135.00	97.00–163.00	123.00	107.00–154.00	0.001 *	0.050	1.000	0.001 *
TG (mg/dL)	69.00	52.00–85.00	101.00	81.00–123.00	119.50	82.00–163.00	<0.001 *	0.070	1.000	<0.001 *

Values are expressed as median and interquartile range (Q1–Q3). Statistically significant differences between the medians were detected by the Kruskal–Wallis ANOVA test with post hoc analysis; *p* *—statistical significance ($p < 0.05$). Abbreviations: CRP—C-reactive protein; HOMA-IR—homeostasis model assessment of insulin resistance; QUICKI—quantitative insulin sensitivity check index; AST—aspartate aminotransferase; ALT—alanine transaminase; GGTP—gamma-glutamyl transferase; ALP—alkaline phosphatase; T—total; HDL-C—high-density lipoprotein; LDL-C—low-density lipoprotein; TG—triglycerides.

The comparison of blood biochemical parameters and insulin resistance indices between participants with obesity (G2 vs. G3) did not yield statistically significant differences. However, in the G1 vs. G3 group, statistically significant differences were observed across most studied parameters (in addition to AST, ALP and total cholesterol levels). Elevated fasting insulin levels were found to be a statistically significant differentiator between G2 and G1 patients ($p = 0.039$). Furthermore, these groups exhibited statistically significant differences in the HOMA-IR index ($p = 0.045$) and QUICKI index ($p = 0.043$). The groups also differed in ALT levels ($p = 0.034$).

Tables 4 and 5 present multiple regression models examining the association between the extent of hepatic steatosis in female and male participants and specific parameters of body composition, as well as serum concentrations of selected adipokines, cytokines, and gelatinases. The tables include full (saturated) models, as well as other models obtained by backward stepwise regression. Empty cells in the table indicate that a particular variable in the model was not used.

Table 4. Selected multiple regression models for the dependent variable CAP (dB/m) in a group of women.

Variable		Model 1	Model 2	Model 3	Model 4	Model 5	Model 6	Model 7
Total adipose tissue (%)	β	3.779			4.072			
	SE	0.666			0.556			
	p	<0.001 *			<0.001 *			
VAT (cm^2)	β		0.296 *			0.259	0.317	
	SE		0.056			0.056	0.057	
	p		<0.001			<0.001 *	<0.001 *	
VAT/SAT Ratio	β			23.494				20.387
	SE			5.287				5.182
	p			<0.001 *				<0.001 *
HOMA-IR	β	6.371	5.563	7.172	5.854	4.531	5.804	6.200
	SE	2.380	2.501	2.548	2.323	2.509	2.649	2.507
	p	0.010 *	0.030 *	0.007 *	0.014 *	0.075	0.032 *	0.016 *
Adiponectin (ng/mL)	β	0.001	0.001	0.001				
	SE	0.001	0.001	0.001				
	p	0.078	0.128	0.184				
Resistin (ng/mL)	β	−0.631	−2.049	−2.111				
	SE	1.103	1.135	1.194				
	p	0.569	0.076	0.082				
TNF-α (pg/mL)	β	0.158	0.482	0.616				
	SE	1.788	1.832	1.920				
	p	0.930	0.793	0.749				
Il-6 (pg/mL)	β	3.370	12.374	16.354		11.692		15.245
	SE	4.138	3.693	3.829		3.441		3.464
	p	0.419	0.001 *	<0.001 *		0.001 *		<0.001 *
IL-1β (pg/mL)	β	17.783	17.861	16.165	15.763		13.296	
	SE	6.404	6.583	6.871	5.931		6.564	
	p	0.007 *	0.009 *	0.022 *	0.010 *		0.047 *	
IL-23 (pg/mL)	β	−1.630	−0.905	−0.896				
	SE	1.022	1.058	1.111				
	p	0.116	0.396	0.423				
MMP-2 (ng/mL)	β	−0.059	−0.074	−0.093				
	SE	0.041	0.042	0.044				
	p	0.153	0.083	0.039 *				

Table 4. *Cont.*

Variable		Model 1	Model 2	Model 3	Model 4	Model 5	Model 6	Model 7
MMP-9 (ng/mL)	β	−0.006	−0.016	−0.013				
	SE	0.014	0.015	0.015				
	p	0.678	0.287	0.400				
Adj. R^2		0.554	0.529	0.483	0.536	0.482	0.427	0.442

p *—statistical significance ($p < 0.05$). Abbreviations: VAT—visceral adipose tissue; VAT/SAT Ratio—ratio of visceral to subcutaneous fat; HOMA-IR—homeostasis model assessment of insulin resistance; TNF-alfa—tumor necrosis factor alpha; IL-6—interleukin 6; IL-1β—interleukin 1β; IL-23—interleukin 23; MMP-2—matrix metalloproteinase 2; MMP-9—matrix metalloproteinase 9; dB/m—decibel/meter; ng/mL—nanograms/milliliter; pg/mL—picograms/milliliter.

Table 5. Selected multiple regression models for the dependent variable CAP (dB/m) in a group of men.

Variable		Model 8	Model 9	Model 10	Model 11	Model 12
Total adipose tissue (%)	β	3.160			3.496	
	SE	1.068			0.886	
	p	0.008 *			0.001 *	
VAT (cm^2)	β		0.303			0.317
	SE		0.114			0.077
	p		0.016 *			<0.001 *
VAT/SAT Ratio	β			7.995		
	SE			10.498		
	p			0.456		
HOMA-IR	β	−1.855	1.955	6.925	−2.022	0.289
	SE	6.771	6.581	7.343	4.064	3.847
	p	0.787	0.770	0.358	0.623	0.941
Adiponectin (ng/mL)	β	0.001	0.001	0.003		
	SE	0.003	0.003	0.004		
	p	0.801	0.711	0.514		
Resistin (ng/mL)	β	0.069	−1.089	0.367		
	SE	1.686	1.866	2.078		
	p	0.968	0.567	0.862		
TNF-α (pg/mL)	β	2.371	−1.796	1.316		
	SE	3.171	3.680	4.176		
	p	0.464	0.631	0.756		
Il-6 (pg/mL)	β	16.647	21.978	10.523	19.275	22.752
	SE	10.741	11.932	12.858	7.521	7.500
	p	0.139	0.082	0.424	0.017 *	0.006 *
IL-1β (pg/mL)	β	15.213	13.921	21.758		
	SE	20.498	21.392	25.280		
	p	0.468	0.523	0.401		
IL-23 (pg/mL)	β	0.969	0.577	1.165		
	SE	0.913	0.976	1.102		
	p	0.302	0.562	0.304		
MMP-2 (ng/mL)	β	0.021	−0.028	−0.071		
	SE	0.093	0.093	0.110		
	p	0.828	0.765	0.527		
MMP-9 (ng/mL)	β	−0.006	0.011	0.006		
	SE	0.021	0.023	0.028		
	p	0.795	0.651	0.825		
Adj. R^2		0.337	0.291	0.045	0.413	0.432

p *—statistical significance ($p < 0.05$). Abbreviations: VAT—visceral adipose tissue; VAT/SAT Ratio—ratio of visceral to subcutaneous fat; HOMA-IR—homeostasis model assessment of insulin resistance; TNF-α—tumor necrosis factor alpha; IL-6—interleukin 6; IL-1β—interleukin 1β; IL-23—interleukin 23; MMP-2—matrix metalloproteinase 2; MMP-9—matrix metalloproteinase 9; dB/m—decibel/meter; ng/mL—nanograms/milliliter; pg/mL—picograms/milliliter.

It was observed that a higher degree of liver steatosis in women was significantly associated with increased adipose tissue (%), the HOMA-IR index, and a higher concentration of interleukin 1β (pg/mL; picograms/milliliter). It was noted that an increased level of liver steatosis showed a significant correlation with a greater abdominal cross-sectional VAT area (cm^2) and the HOMA-IR index, along with elevated levels of interleukin 6 (pg/mL) and interleukin 1β (pg/mL). It was found that a heightened level of hepatic steatosis exhibited a notable correlation with an increased VAT/SAT ratio and HOMA-IR index and elevated levels of interleukin 6 (pg/mL) and interleukin 1β (pg/mL), coupled with reduced levels of matrix metalloproteinase 2 (ng/mL—nanograms/milliliter). The 3-factor models confirmed the existence of such relationships.

In the male group, a relationship was noted between a higher degree of liver steatosis and increased total adipose tissue (%). The same relationship was observed for VAT (cm^2). In addition, based on three-factor models, we found that a higher degree of hepatic steatosis in men was significantly associated with increased adipose tissue (%), and higher interleukin-6 concentration (pg/mL). Moreover, a higher degree of hepatic steatosis was significantly associated with increased VAT area (cm^2) and higher concentrations of this interleukin (pg/mL).

Subsequently, an ROC analysis was conducted to determine cutoff points for the studied body composition parameters and the occurrence of hepatic steatosis, as presented in Table 6.

Table 6. ROC analysis for selected body composition parameters in men and women to determine cutoff points for the incidence of hepatic steatosis.

	Women (n = 70)	**Men (n = 29)**
Parameter	**Total adipose tissue (%)**	
AUC (95% CI)	0.94 (0.88–1.00)	0.77 (0.49–1.00)
p-Value AUC	<0.001 *	0.063
Cutoff point	40.21	26.85
Sensitivity	92%	100%
Specificity	91%	71%
	Women (n = 70)	**Men (n = 29)**
Parameter	**VAT (cm^2)**	
AUC (95% CI)	0.87 (0.78–0.95)	0.80 (0.59–1.00)
p-Value AUC	<0.001 *	0.005 *
Cutoff point	156	155
Sensitivity	89%	100%
Specificity	77%	43%
	Women (n = 70)	**Men (n = 29)**
Parameter	**VAT/SAT Ratio**	
AUC (95% CI)	0.75 (0.63–0.86)	0.58 (0.29–0.86)
p-Value AUC	<0.001 *	0.591
Cutoff point	2.05	2.04
Sensitivity	56%	82%
Specificity	85%	57%

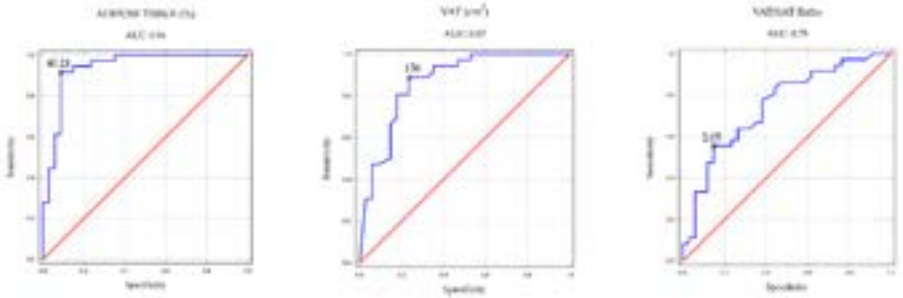
Abbreviations: AUC—area under curve; CI—confidence interval; VAT—visceral adipose tissue; VAT/SAT Ratio—ratio of visceral to subcutaneous fat. *p* *—statistical significance ($p < 0.05$).

ROC analysis revealed significant diagnostic value among women for several parameters: total percent adipose tissue (cutoff point: 40.21%; AUC: 0.94; $p < 0.001$), visceral tissue

area in abdominal cross-section (cutoff point: 156 cm^2; AUC: 0.87, $p < 0.001$), and VAT/SAT ratio (cutoff point, 2.05; AUC, 0.75; $p < 0.001$).

In contrast, for men, the ROC analysis indicated significant diagnostic value only for the visceral fat area (cutoff point, 155 cm^2; AUC, 0.80; $p = 0.005$).

Figures 4 and 5 visually depict the cutoff points for the aforementioned body composition parameters, which demonstrated statistical significance in men and women.



(**A**) (**B**) (**C**)

Figure 4. Cutoff points for the incidence of hepatic steatosis in women for (**A**) Total adipose tissue (%); (**B**) VAT (cm^2); (**C**) VAT/SAT Ratio.

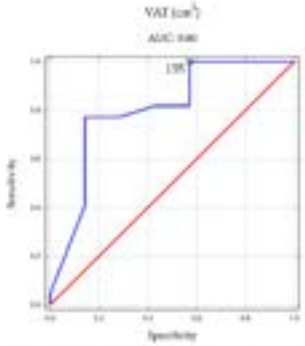


Figure 5. Cutoff points of hepatic steatosis incidence for visceral fat area in abdominal cross-section in men.

ROC analysis was also performed to assess cutoff points for the HOMA-IR index and the incidence of hepatic steatosis. The results are shown in Table 7.

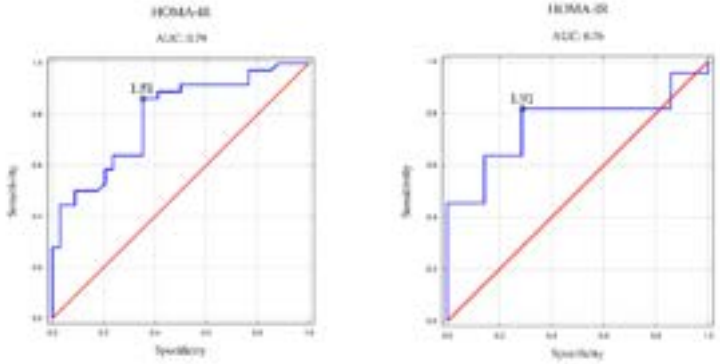
Table 7. ROC analysis for the HOMA-IR index in men and women to determine cutoff points for the incidence of hepatic steatosis.

	Women (n = 70)	**Men (n = 29)**
Parameter	**HOMA-IR**	**HOMA-IR**
AUC (95% CI)	0.79 (0.69–0.90)	0.76 (0.58–0.94)
p-Value AUC	<0.001 *	0.005 *
Cutoff point	1.81	1.91
Sensitivity	86%	82%
Specificity	65%	71%

Abbreviations: AUC—area under curve; CI—confidence interval; HOMA-IR—homeostasis model assessment of insulin resistance. *p* *—statistical significance ($p < 0.05$).

ROC analysis showed a significant diagnostic value for this parameter in both women (cutoff point, 1.81; AUC, 0.79; $p < 0.001$) and men (cutoff point: 1.91; AUC: 0.76; $p = 0.005$).

Figure 6 demonstrates the cutoff points for the HMA-IR index in men and women.



(A) **(B)**

Figure 6. Cutoff points for the incidence of hepatic steatosis for the HOMA-IR index in (**A**) women and (**B**) men.

4. Discussion

Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease has emerged as a global health concern. The absence of early-stage symptoms poses challenges for diagnosis, leading to incidental identification or detection at advanced stages, such as the progression to steatohepatitis (MASH), liver fibrosis, and potentially cirrhosis. Diagnostic methods for MASLD include computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI), ultrasound (US), and elastography (FibroScan). However, their routine use is impractical due to the high costs associated with CT and MRI, despite their high sensitivity. CT also poses the additional drawback of exposing individuals to ionizing radiation. Ultrasound can only diagnose steatosis affecting more than 20% of hepatocytes. Elastography, offering high sensitivity and the capability to detect even minor hepatic steatosis, as well as assess liver fibrosis, is not yet widely available [14].

Currently, there is a lack of effective biochemical tests and markers for diagnosing hepatic steatosis. Our prior research demonstrated that commonly used liver disease diagnostic parameters, such as AST, ALT, GGTP, ALP, and TBIL (total bilirubin) levels, remained within the normal range in most hepatic steatosis patients, making them inadequate for accurate diagnosis [15]. This aligns with findings from other researchers [16–19]. In recent years, there has been a growing focus on identifying potential markers for metabolic diseases. While previous studies have examined the serum levels of anti-inflammatory and pro-inflammatory adipokines and cytokines in individuals with various conditions characterized by chronic inflammation, such as obesity, type 2 diabetes, and cardiovascular disease [20–22], our study stands out as one of the few to investigate the serum adipokines and cytokines profile in patients with MASLD coexisting with obesity.

The literature findings suggest that the presence and progression of MASLD may be indicated by reduced levels of the anti-inflammatory adipokine adiponectin, alongside elevated levels of pro-inflammatory cytokines, including TNF-α, IL-6, and IL-1β. Adiponectin not only diminishes lipid accumulation in adipose tissue and the liver but also enhances liver insulin sensitivity, regulating overall glucose homeostasis. Moreover, it inhibits the proliferation of hepatic stellate cells, pivotal in the development of liver fibrosis [9]. Conversely, the aforementioned pro-inflammatory cytokines activate diverse inflammatory pathways that disrupt insulin signaling [23]. Our investigation also gauged resistin and interleukin 23 levels. Resistin is secreted not only by adipocytes and inflammatory cells

but also by hepatic stellate cells. It is believed to primarily impact the liver, with elevated concentrations leading to increased glucose production and the onset of hepatic insulin resistance [24]. Interleukin 23 may play an important role in inflammatory pathways associated with liver damage. According to the results of a recently published study by Yang et al., this cytokine may be a potential marker in the development of fibrosis and cirrhosis [25]. Additionally, metalloproteinases, specifically gelatinases, were selected for evaluation in our study. While matrix metalloproteinases are thought to play a crucial role in liver disease pathogenesis, the precise mechanism remains unclear, with limited studies on the subject. Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) may contribute significantly to liver fibrosis development, as it is highly expressed in myofibroblasts and is believed to have a profibrogenic role. Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B) is expressed in leukocytes during liver ischemia–reperfusion injury [26].

The results of our study were compared to those of studies other authors on NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease), as no such studies on MASLD have yet been established. In addition, 99% of patients with NAFLD meet MASLD criteria [27]. Our study revealed a significant increase in serum IL-6 levels among patients with both obesity and MASLD compared to the normal-weight group without MASLD. Moreover, the assessment of IL-6 levels was found to significantly differentiate between patients with obesity without MASLD and normal-weight individuals. However, serum IL-6 levels did not differ between groups with obesity, both with and without MASLD, indicating that they are not exclusive markers of hepatic steatosis. Baltieri et al.'s study, evaluating IL-6 concentrations in women with obesity post-bariatric surgery with and without hepatic steatosis, found no significant differences between the groups [28]. Duan et al.'s systematic review, encompassing 51 studies, revealed a significant association between increased IL-6 concentrations and an elevated risk of developing NAFLD. However, a careful analysis, considering the clinical subtypes of the disease, indicated that IL-6 concentrations were not significantly linked to steatohepatitis and liver fibrosis [23]. Conversely, Hadinia et al.'s study observed significantly higher levels of IL-6 in patients with NASH compared to a group with NAFL and the group of healthy subjects [29]. Similar results were reported by Fontes-Cal et al. in their study [30]. In our study, there were no significant differences in resistin levels between all groups. Bekaert et al.'s systematic review, encompassing 12 studies on resistin, indicated a significant association between elevated resistin levels and the occurrence or progression of NAFLD in half of the studies [24]. The results from Hegazy et al.'s study demonstrated significantly higher resistin levels in individuals with NAFLD compared to the control group [31]. The variability in findings may imply that increased resistin levels are correlated more significantly with heightened tissue resistance to insulin, thereby elevating the likelihood of hepatic steatosis.

Obesity plays a pivotal role in the initiation and progression of MASLD, with a global systematic review indicating a prevalence of 75.3% among people with obesity [2]. Our study further substantiates this, revealing MASLD in nearly 84% of participants with obesity. Through a tangent ROC analysis, we identified cutoff points for specific body composition components associated with an elevated risk of hepatic steatosis. In women, this threshold was established at 40.21% total body fat, while in men, it was 26.85% (though the diagnostic value was not statistically significant for men). In contrast, Ariya et al. determined cutoffs for total percent body fat at 32.23% in women and 26.73% in men, utilizing dynamic elastography for body composition and dual-energy X-ray absorptiometry scanning for hepatic steatosis assessment [32]. Our study also determined cutoff points for the visceral fat area in the abdominal cross-section, with values of 156 cm^2 in women and 155 cm^2 in men. Comparable studies by Yu et al. and Lee et al. in the Asian population, utilizing computed tomography for both visceral adipose tissue and hepatic steatosis assessments, reported different cutoffs. Yu et al. identified cutoffs as 115.55 cm^2 in women and 178.35 cm^2 in men [33], while Lee et al. established values of 68 cm^2 in women and 100.6 cm^2 in men [34]. The ROC analysis in our study indicated that the VAT/SAT ratio's

cutoff points signaling an increased risk of steatosis were 2.05 in women and 2.04 in men (though diagnostically statistically insignificant for men).

The diminished capacity of adipocytes to store surplus energy in the course of obesity, stemming from a positive energy balance and adipose tissue expansion, results in adipose tissue dysfunction and insulin-resistance development. Accelerated lipolysis in adipose tissue leads to the formation of excess free fatty acids, while the liver accumulates surplus lipids, predominantly triglycerides. Concurrently, heightened lipogenesis in the liver exacerbates fat accumulation. These processes can contribute to the onset of hepatic insulin resistance and hepatic steatosis [35]. Our ROC analysis identified the HOMA-IR index (with a cutoff point of 1.81 in women and 1.91 in men) as a potential diagnostic parameter for hepatic steatosis. Motamed et al., in their study, proposed cutoff points of 1.95 in women and 1.79 in men for the HOMA-IR index in NAFLD diagnosis [36]. Similarly, Isokuortti et al., based on a population-based study, determined 1.9 as the optimal cutoff point for this index, irrespective of gender. Notably, their linear regression analysis indicated that a HOMA-IR value of 2 still corresponded to normal liver fat [37].

Considering the strong correlation observed in our study between various factors, such as obesity, insulin resistance, chronic inflammation, and hepatic steatosis, we conducted multivariate regression analysis to explore their relationship with the CAP-dependent variable. The combined results of the regression models revealed that, in women, a higher degree of hepatic steatosis was significantly associated with an elevated HOMA-IR index, increased percentage of total adipose tissue, greater area of visceral fat in abdominal cross-section (cm^2), and higher VAT/SAT ratio, as well as higher concentrations of IL-6 and IL-1β and lower concentrations of MMP-2. The results of the regression models in the male group showed that a higher degree of hepatic steatosis was significantly associated with an increased percent body fat, greater area of visceral fat in abdominal cross-section (cm^2), and higher serum IL-6 levels. Previous research has demonstrated a positive correlation between IL-6 levels and systemic insulin resistance, IL-6 expression in the liver, liver inflammation, and the degree of fibrosis in patients with NAFLD [38–40]. A systematic review by Duan et al. indicated a connection between serum interleukin 1β levels and the development of NAFLD, progression to NASH, and the emergence of liver fibrosis [23]. Yilmaz et al. found significantly higher levels of MMP-2 in patients with NAFLD compared to healthy subjects, but these levels did not differentiate between simple steatosis and steatohepatitis [41], consistent with Ando et al.'s study, which also assessed MMP-2 as a potential marker for liver fibrosis progression [42]. Munsterman et al.'s results further supported the association between increased MMP-2 levels and the development of liver fibrosis [43].

While our study has provided valuable insights, it is important to acknowledge its limitations. Notably, the sample size, particularly in the male group, is relatively small. In addition, the number of participants in the groups is unequal to each other. However, this way of classifying participants within the groups was dictated by the purpose of the study. Additionally, our study exclusively utilized the electrical bioimpedance method for assessing body composition, whereas DEXA (dual-energy X-ray absorptiometry) is considered the gold standard with higher accuracy. Although the dynamic elastography method employed in our study exhibits high precision and sensitivity for diagnosing steatosis and fibrosis even in the early stages, it does not permit the assessment of steatohepatitis. To conclusively confirm or exclude the clinical potential of adipokines and cytokines and their utility in diagnosing MASLD, larger-scale studies with more balanced groups, including individuals with and without hepatic steatosis, steatohepatitis, and hepatic fibrosis at various stages, are necessary. The consideration of diverse populations, such as those with normal weight, obesity, or insulin resistance, is also crucial. Furthermore, extensive population-based studies are required to validate the cutoff points established in our investigation.

5. Conclusions

Among the adipokines and cytokines examined in this study, interleukin 6 was the strongest predictor of MASLD regardless of gender. In addition, an association between the development of hepatic steatosis and higher serum IL-1β levels and higher adipose tissue was observed in women. However, further studies on a larger group of patients are needed to consider the use of these cytokines as markers of MASLD. The HOMA-IR index demonstrated potential diagnostic utility in identifying hepatic steatosis. The findings suggest that body composition analysis, especially of visceral fat, along with fasting glucose and insulin assessments, including the calculation of the HOMA-IR index, should be integral to systematic screening.

Author Contributions: Conceptualization, B.Z. and L.O.; methodology, B.Z. and L.O.; validation, B.Z. and L.O.; formal analysis, B.Z. and U.C.; investigation, B.Z., L.O., J.S.-Z. and K.O.; resources, L.O. and B.M.; data curation, B.Z. and L.O.; writing—original draft preparation, B.Z. and K.O.; writing—review and editing, B.Z. and L.O.; visualization, B.Z. and L.O.; supervision, L.O. and B.M.; project administration, B.Z., L.O. and J.S.-Z.; funding acquisition, B.Z., L.O. and J.S.-Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by own sources of the Medical University of Bialystok (Project numbers: SUB/3/DN/21/001/3316 and SUB/3/DN/21/002/3316).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of the Medical University of Bialystok (Nos. R-I-002/647/2019, approved on 19 December 2019; APK.002.468.2020, approved on 17 December 2020 and APK.002.39.2021, approved on 28 January 2021).

Informed Consent Statement: Written informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy and ethical.

Acknowledgments: We would like to thank TIBA sp. z o.o. for cooperation and renting the FibroScan device.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Eslam, M.; Newsome, P.N.; Sarin, S.K.; Anstee, Q.M.; Targher, G.; Romero-Gomez, M.; Zelber-Sagi, S.; Wai-Sun Wong, V.; Dufour, J.F.; Schattenberg, J.M.; et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J. Hepatol.* **2020**, *73*, 202–209. [CrossRef]
2. Rinella, M.E.; Lazarus, J.; Ratziu, V.; Francque, S.M.; Sanyal, A.J.; Kanwal, F.; Romero, D.; Abdelmalek, M.F.; Anstee, Q.M.; Arab, J.P.; et al. A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *Hepatology* **2023**, *78*, 1966–1986. [CrossRef]
3. Younossi, Z.M.; Golabi, P.; Paik, J.M.; Henry, A.; Van Dongen, C.; Henry, L. The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): A systematic review. *Hepatology* **2023**, *77*, 1335–1347. [CrossRef] [PubMed]
4. Quek, J.; Chan, K.E.; Wong, Z.Y.; Tan, C.; Tan, B.; Lim, W.H.; Tan, D.J.H.; Tang, A.S.P.; Tay, P.; Xiao, J.; et al. Global prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in the overweight and obese population: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2023**, *8*, 20–30. [CrossRef]
5. Polyzos, S.A.; Kountouras, J.; Mantzoros, C.S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism* **2019**, *92*, 82–97. [CrossRef] [PubMed]
6. Ye, Q.; Zou, B.; Yeo, Y.H.; Li, J.; Huang, D.Q.; Wu, Y.; Yang, H.; Liu, C.; Kam, L.Y.; Tan, X.X.E.; et al. Global prevalence, incidence, and outcomes of non-obese or lean non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *5*, 739–752. [CrossRef] [PubMed]
7. Cembrowska, P.; Stefańska, A.; Odrowąż-Sypniewska, G. Obesity phenotypes: Normal-weight individuals with metabolic disorders versus metabolically healthy obese. *Med. Res. J.* **2017**, *1*, 95–99. [CrossRef]
8. Fazel, Y.; Koenig, A.B.; Sayiner, M.; Goodman, Z.D.; Younossi, Z.M. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism* **2016**, *65*, 1017–1025. [CrossRef]

9. Wang, H.; Mehal, W.; Nagy, L.E.; Rotman, Y. Immunological mechanisms and therapeutic targets of fatty liver diseases. *Cell. Mol. Immunol.* **2021**, *18*, 73–91. [CrossRef]
10. Maltron International Ltd. *BioScan 920 User Guide*; Maltron International Ltd.: Essex, UK, 2014.
11. Janczewska, E.; Pisula, A.; Simon, K. Recommendations for elastography-based imaging of liver. *Prz. Epidemiol.* **2015**, *69*, 317–321.
12. Wong, V.W.; Vergniol, J.; Wong, G.L.; Foucher, J.; Chan, H.L.; Le Bail, B.; Choi, P.C.; Kowo, M.; Chan, A.W.; Merrouche, W.; et al. Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **2010**, *51*, 454–462. [CrossRef] [PubMed]
13. Karlas, T.; Petroff, D.; Garnov, N.; Böhm, S.; Tenckhoff, H.; Wittekind, C.; Wiese, M.; Schiefke, I.; Linder, N.; Schaudinn, A.; et al. Non-invasive assessment of hepatic steatosis in patients with NAFLD using controlled attenuation parameter and 1H-MR spectroscopy. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e91987. [CrossRef] [PubMed]
14. Castera, L.; Friedrich-Rust, M.; Loomba, R. Noninvasive Assessment of Liver Disease in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **2019**, *156*, 1264–1281. [CrossRef] [PubMed]
15. Zyśk, B.; Ostrowska, L.; Smarkusz-Zarzecka, J.; Witczak-Sawczuk, K.; Gomowicz, A.; Bielawska, A. Pro-Inflammatory Adipokine and Cytokine Profiles in the Saliva of Obese Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)-A Pilot Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 2891. [CrossRef] [PubMed]
16. Hannah, W.N., Jr.; Harrison, S.A. Noninvasive imaging methods to determine severity of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **2016**, *64*, 2234–2243. [CrossRef] [PubMed]
17. Fracanzani, A.L.; Valenti, L.; Bugianesi, E.; Andreoletti, M.; Colli, A.; Vanni, E.; Bertelli, C.; Fatta, E.; Bignamini, D.; Marchesini, G.; et al. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: A role for insulin resistance and diabetes. *Hepatology* **2008**, *48*, 792–798. [CrossRef] [PubMed]
18. Skelly, M.M.; James, P.D.; Ryder, S.D. Findings on liver biopsy to investigate abnormal liver function tests in the absence of diagnostic serology. *J. Hepatol.* **2001**, *35*, 195–199. [CrossRef] [PubMed]
19. Mofrad, P.; Contos, M.J.; Haque, M.; Sargeant, C.; Fisher, R.A.; Luketic, V.A.; Sterling, R.K.; Shiffman, M.L.; Stravitz, R.T.; Sanyal, A.J. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology* **2003**, *37*, 1286–1292. [CrossRef] [PubMed]
20. Moghbeli, M.; Khedmatgozar, H.; Yadegari, M.; Avan, A.; Ferns, G.A.; Ghayour Mobarhan, M. Cytokines and the immune response in obesity-related disorders. *Adv. Clin. Chem.* **2021**, *101*, 135–168. [CrossRef]
21. Borges, M.D.; Franca, E.L.; Fujimori, M.; Silva, S.M.C.; de Marchi, P.G.F.; Deluque, A.L.; Honorio-Franca, A.C.; de Abreu, L.C. Relationship between Proinflammatory Cytokines/Chemokines and Adipokines in Serum of Young Adults with Obesity. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* **2018**, *18*, 260–267. [CrossRef]
22. Jhuma, K.A.; Giasuddin, A.S.; Hossain, M.S. Status of Serum Pro-inflammatory Cytokines (IL-1, IL-6, TNF-α) and Anti-inflammatory Cytokines (IL-4, IL-10, IL-13) in Newly Diagnosed Bangladeshi Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Mymensingh Med. J.* **2023**, *32*, 1149–1155. [PubMed]
23. Duan, Y.; Pan, X.; Luo, J.; Xiao, X.; Li, J.; Bestman, P.L.; Luo, M. Association of Inflammatory Cytokines with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 880298. [CrossRef] [PubMed]
24. Bekaert, M.; Verhelst, X.; Geerts, A.; Lapauw, B.; Calders, P. Association of recently described adipokines with liver histology in biopsy-proven non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review. *Obes. Rev.* **2016**, *17*, 68–80. [CrossRef] [PubMed]
25. Yang, X.; Liao, L.; Liang, Z.; Yu, S.; Guo, Z. Correlation Analysis of IL-17, IL-21, IL-23 with Non-Alcoholic Liver Fibrosis and Cirrhosis. *J. Inflamm. Res.* **2024**, *17*, 2327–2335. [CrossRef] [PubMed]
26. Naim, A.; Pan, Q.; Baig, M.S. Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Liver Diseases. *J. Clin. Exp. Hepatol.* **2017**, *7*, 367–372. [CrossRef] [PubMed]
27. Hagström, H.; Vessby, J.; Ekstedt, M.; Shang, Y. 99% of patients with NAFLD meet MASLD criteria and natural history is therefore identical. *J. Hepatol.* **2024**, *80*, e76–e77. [CrossRef] [PubMed]
28. Baltieri, L.; Chaim, E.A.; Chaim, F.D.M.; Utrini, M.P.; Gestic, M.A.; Cazzo, E. Correlation between nonalcoholic fatty liver disease features and levels of adipokines and inflammatory cytokines among morbidly obese individuals. *Arq. Gastroenterol.* **2018**, *55*, 247–251. [CrossRef] [PubMed]
29. Hadinia, A.; Doustimotlagh, A.H.; Goodarzi, H.R.; Arya, A.; Jafarinia, M. Circulating Levels of Pro-inflammatory Cytokines in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Iran. J. Immunol.* **2019**, *16*, 327–333. [CrossRef] [PubMed]
30. Fontes-Cal, T.C.M.; Mattos, R.T.; Medeiros, N.I.; Pinto, B.F.; Belchior-Bezerra, M.; Roque-Souza, B.; Dutra, W.O.; Ferrari, T.C.A.; Vidigal, P.V.T.; Faria, L.C.; et al. Crosstalk Between Plasma Cytokines, Inflammation, and Liver Damage as a New Strategy to Monitoring NAFLD Progression. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 708959. [CrossRef]
31. Hegazy, M.; Abo-Elfadl, S.; Mostafa, A.; Ibrahim, M.; Rashed, L.; Salman, A. Serum Resistin Level and Its Receptor Gene Expression in Liver Biopsy as Predictors for the Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Eurasian J. Hepatogastroenterol.* **2014**, *4*, 59–62. [CrossRef]
32. Ariya, M.; Koohpayeh, F.; Ghaemi, A.; Osati, S.; Davoodi, S.H.; Razzaz, J.M.; Javedan, G.; Ehrampoush, E.; Homayounfar, R. Assessment of the association between body composition and risk of non-alcoholic fatty liver. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0249223. [CrossRef] [PubMed]

33. Yu, P.; Yang, H.; Qi, X.; Bai, R.; Zhang, S.; Gong, J.; Mei, Y.; Hu, P. Gender differences in the ideal cutoffs of visceral fat area for predicting MAFLD in China. *Lipids Health Dis.* **2022**, *21*, 148. [CrossRef] [PubMed]
34. Lee, S.; Kim, K.W.; Lee, J. Sex-specific Cutoff Values of Visceral Fat Area for Lean vs. Overweight/Obese Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Asians. *J. Clin. Transl. Hepatol.* **2022**, *10*, 595–599. [CrossRef] [PubMed]
35. Makri, E.; Goulas, A.; Polyzos, S.A. Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis and Emerging Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Arch. Med. Res.* **2021**, *52*, 25–37. [CrossRef] [PubMed]
36. Motamed, N.; Miresmail, S.J.; Rabiee, B.; Keyvani, H.; Farahani, B.; Maadi, M.; Zamani, F. Optimal cutoff points for HOMA-IR and QUICKI in the diagnosis of metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease: A population based study. *J. Diabetes Complicat.* **2016**, *30*, 269–274. [CrossRef] [PubMed]
37. Isokuortti, E.; Zhou, Y.; Peltonen, M.; Bugianesi, E.; Clement, K.; Bonnefont-Rousselot, D.; Lacorte, J.M.; Gastaldelli, A.; Schuppan, D.; Schattenberg, J.M.; et al. Use of HOMA-IR to diagnose non-alcoholic fatty liver disease: A population-based and inter-laboratory study. *Diabetologia* **2017**, *60*, 1873–1882. [CrossRef] [PubMed]
38. Jarrar, M.H.; Baranova, A.; Collantes, R.; Ranard, B.; Stepanova, M.; Bennett, C.; Fang, Y.; Elariny, H.; Goodman, Z.; Chandhoke, V.; et al. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2008**, *27*, 412–421. [CrossRef] [PubMed]
39. Baranova, A.; Schlauch, K.; Elariny, H.; Jarrar, M.; Bennett, C.; Nugent, C.; Gowder, S.J.; Younoszai, Z.; Collantes, R.; Chandhoke, V.; et al. Gene expression patterns in hepatic tissue and visceral adipose tissue of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Obes. Surg.* **2007**, *17*, 1111–1118. [CrossRef] [PubMed]
40. Wieckowska, A.; Papouchado, B.G.; Li, Z.; Lopez, R.; Zein, N.N.; Feldstein, A.E. Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. Gastroenterol.* **2008**, *103*, 1372–1379. [CrossRef]
41. Yilmaz, Y.; Eren, F. Serum biomarkers of fibrosis and extracellular matrix remodeling in patients with nonalcoholic fatty liver disease: Association with liver histology. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *31*, 43–46. [CrossRef]
42. Ando, W.; Yokomori, H.; Tsutsui, N.; Yamanouchi, E.; Suzuki, Y.; Oda, M.; Inagaki, Y.; Otori, K.; Okazaki, I. Serum matrixmetalloproteinase-1 level represents disease activity as opposed to fibrosis in patients with histologically proven nonalcoholic steatohepatitis. *Clin. Mol. Hepatol.* **2018**, *24*, 61–76. [CrossRef] [PubMed]
43. Munsterman, I.D.; Kendall, T.J.; Khalil, N.; Popa, M.; Lomme, R.; Drenth, J.P.H.; Tjwa, E.T.T.L. Extracellular matrix components indicate remodelling activity in different fibrosis stages of human non-alcoholic fatty liver disease. *Histopathology* **2018**, *73*, 612–621. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

13. Zgody Komisji Bioetycznej

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY
UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM W BIAŁYMSTOKU
ul. Jana Kilińskiego 1
15-089 Białystok
tel. 85 748 54 07, fax 85 748 55 08
komisjabioetyczna@umb.edu.pl

Białystok, 17.12.2020 r.

Uchwała nr: APK.002.468.2020

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku, po zapoznaniu się z projektem badania zgodnie z zasadami GCP/ Guidelines for Good Clinical Practice /- **w y r a ż a z g o d ę** na prowadzenie tematu badawczego: „Ocena wpływu rozmieszczenia w ustroju tkanki tłuszczowej i czynników środowiskowych na występowanie insulinooporności i niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby" przez mgr Beatę Zyśk wraz z zespołem badawczym z UMB.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej przy UMB

prof. dr hab. Otylia Kowal-Bielecka

KOMISJA BIOETYCZNA
PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM W BIAŁYMSTOKU
ul. Jana Kilińskiego 1
15-089 Białystok
tel. 85 748 54 07, fax 85 748 55 08
komisjabioetyczna@umb.edu.pl

Białystok, 28.01.2021 r.

Uchwała nr: APK.002.39.2021

Na podstawie art. 29 ust. 2 i 14 ustawy dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (t.j. Dz. U z 2020, poz. 514 ze zm.), Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku, po zapoznaniu się z projektem badania zgodnie z zasadami GCP/ Guidelines for Good Clinical Practice /- **w y r a ż a z g o d ę** na prowadzenie tematu badawczego: „Poszukiwanie markerów otyłości metabolicznej" przez prof. dr hab. Lucynę Ostrowską wraz z zespołem badawczym z UMB.

Planowany okres realizacji od 28.01.2021 r. do grudnia 2023 r.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej przy UMB

prof. dr hab. Otylia Kowal-Bielecka

Pouczenie:
1. Odwołanie od uchwały komisji bioetycznej wyrażającej opinię może wnieść:
1) wnioskodawca;
2) kierownik podmiotu, w którym eksperyment medyczny ma być przeprowadzony;
3) komisja bioetyczna właściwa dla ośrodka, który ma uczestniczyć w wieloośrodkowym eksperymencie medycznym.
2. Odwołanie, o którym mowa w ust. 1, wnosi się za pośrednictwem komisji bioetycznej, która podjęła uchwałę, do Odwoławczej Komisji Bioetycznej w terminie 14 dni od dnia doręczenia uchwały wyrażającej opinię.

KOMISJA BIOETYCZNA
UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO w BIAŁYMSTOKU
ul. Jana Kilińskiego 1
15-089 Białystok
tel. (085) 748 54 07, fax. (085) 748 55 08
prorektorkl@umb.edu.pl

Białystok, 19-12-2019

Uchwała nr: R-I-002/647/2019

Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, po zapoznaniu się z projektem badania zgodnie z zasadami GCP/ Guidelines for Good Clinical Practice /- **w y r a ż a z g o d ę** na prowadzenie tematu badawczego: „Poszukiwanie markerów otyłości" przez prof. dr hab. Lucynę Ostrowską wraz z zespołem badawczym z UMB.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej UMB

prof. dr hab. Otylia Kowal-Bielecka

14. Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

mgr Beata Zyśk
Zakład Dietetyki i Żywienia Klinicznego
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Białystok, 10.03.2025r.

Oświadczenie autora

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. *Zyśk B, Ostrowska L, Smarkusz-Zarzecka J. Salivary adipokine and cytokine levels as potential markers for the development of obesity and metabolic disorders. International Journal of Molecular Sciences 2021; 22(21): 11703. doi: 10.3390/ijms222111703.*

wchodzącej w skład mojej rozprawy doktorskiej polegał na udziale w opracowaniu koncepcji pracy, przeszukaniu baz naukowych i wyselekcjonowaniu publikacji włączonych do pracy przeglądowej, pozyskaniu niezbędnych danych z pracy i opracowaniu manuskryptu oraz jego edycji, co określam jako 70% udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

2. *Zyśk B, Ostrowska L, Smarkusz-Zarzecka J, Witczak-Sawczuk K, Gornowicz A, Bielawska A. Pro-inflammatory adipokine and cytokine profiles in the saliva of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) - a pilot study. International Journal of Molecular Sciences 2023; 24(3): 2891. doi: 10.3390/ijms24032891.*

wchodzącej w skład mojej rozprawy doktorskiej polegał na zaplanowaniu badań, udziale w opracowaniu metodologii, rekrutowaniu uczestników, wykonaniu pomiarów antropometrycznych, analizy składu ciała, pomiaru stłuszczenia i sztywności wątroby, analizie statystycznej, analizie i interpretacji wyników, graficznym opracowaniu danych, przygotowaniu manuskryptu oraz pozyskaniu źródeł finansowania, co określam jako 70% udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

3. *Zyśk B, Ostrowska L, Smarkusz-Zarzecka J, Orywal K, Mroczko B, Cwalina U. Evaluation of the diagnostic utility of selected serum adipokines and cytokines in subjects with MASLD - a pilot study. Nutrients 2024; 16(9): 1381. doi: 10.3390/nu16091381.*

wchodzącej w skład mojej rozprawy doktorskiej polegał na udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, rekrutowaniu uczestników, wykonaniu pomiarów antropometrycznych, analizy składu ciała, pomiaru stłuszczenia i sztywności wątroby, analizie statystycznej, analizie i interpretacji wyników, graficznym opracowaniu danych, przygotowaniu i edycji manuskryptu oraz pozyskaniu źródeł finansowania co określam jako 70% udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

Beata Zyśk
Podpis autora rozprawy doktorskiej

KIEROWNIK
Zakładu Dietetyki i Żywienia Klinicznego
prof dr hab. n. med. Lucyna Ostrowska

15. Oświadczenia współautorów publikacji

prof. dr hab. n. med. Lucyna Ostrowska
Zakład Dietetyki i Żywienia Klinicznego
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Białystok, 10.03.2025r.

Oświadczenie współautora

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. *Zyśk B, Ostrowska L, Smarkusz-Zarzecka J. Salivary adipokine and cytokine levels as potential markers for the development of obesity and metabolic disorders. International Journal of Molecular Sciences 2021; 22(21): 11703.*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Beaty Zyśk polegał na udziale w opracowaniu koncepcji pracy, pomocy przy analizie zebranych badań, pomocy w edycji manuskryptu, a także na nadzorze merytorycznym nad przygotowaniem manuskryptu.

2. *Zyśk B, Ostrowska L, Smarkusz-Zarzecka J, Witczak-Sawczuk K, Gornowicz A, Bielawska A. Pro-inflammatory adipokine and cytokine profiles in the saliva of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) - a pilot study. International Journal of Molecular Sciences 2023; 24(3): 2891.*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Beaty Zyśk polegał na udziale w opracowaniu koncepcji pracy i metodologii, pomocy przy prowadzeniu badań, analizie i interpretacji wyników, pozyskaniu źródeł finansowania, pomocy przy przygotowaniu i edycji manuskryptu oraz na nadzorze merytorycznym.

3. *Zyśk B, Ostrowska L, Smarkusz-Zarzecka J, Orywal K, Mroczko B, Cwalina U. Evaluation of the diagnostic utility of selected serum adipokines and cytokines in subjects with MASLD - a pilot study. Nutrients 2024, 16(9): 1381.*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Beaty Zyśk polegał na udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, pomocy przy prowadzeniu badań, analizie i interpretacji wyników, pozyskaniu źródeł finansowania, pomocy przy edycji manuskryptu oraz na nadzorze merytorycznym.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionych prac przez Panią mgr Beatę Zyśk jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie cyklu prac opublikowanych w czasopismach naukowych.

KIEROWNIK
Zakładu Dietetyki i Żywienia Klinicznego
prof dr hab. n. med. Lucyna Ostrowska

prof. dr hab. n. med. Barbara Mroczko
Zakład Diagnostyki Biochemicznej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Białystok, 07.03.2025r.

Oświadczenie współautora

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. *Zyśk B, Ostrowska L, Smarkusz-Zarzecka J, Orywal K, Mroczko B, Cwalina U. Evaluation of the diagnostic utility of selected serum adipokines and cytokines in subjects with MASLD - a pilot study. Nutrients 2024, 16(9): 1381.*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Beaty Zyśk polegał na zapewnieniu niezbędnych zasobów do przeprowadzenia badań oraz na nadzorze merytorycznym nad przygotowaniem manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej pracy przez Panią mgr Beatę Zyśk jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie cyklu prac opublikowanych w czasopismach naukowych.

Barbara Mroczko

Podpis

prof. dr hab. n. farm. Anna Bielawska
Zakład Biotechnologii
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Białystok, 06.03.2025r.

Oświadczenie współautora

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. *Zyśk B, Ostrowska L, Smarkusz-Zarzecka J, Witczak-Sawczuk K, Gornowicz A, Bielawska A. Pro-inflammatory adipokine and cytokine profiles in the saliva of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) - a pilot study. International Journal of Molecular Sciences 2023, 24(3): 2891.*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Beaty Zyśk polegał na ocenie merytorycznej i pomocy w edycji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej pracy przez Panią mgr Beatę Zyśk jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie cyklu prac opublikowanych w czasopismach naukowych.

KIEROWNIK
Zakład Biotechnologii
prof. dr hab. Anna Bielawska

Podpis

dr hab. n. farm. Agnieszka Gornowicz
Zakład Biotechnologii
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Białystok, 06.03.2025r.

Oświadczenie współautora

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. *Zyśk B, Ostrowska L, Smarkusz-Zarzecka J, Witczak-Sawczuk K, Gornowicz A, Bielawska A. Pro-inflammatory adipokine and cytokine profiles in the saliva of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) - a pilot study. International Journal of Molecular Sciences 2023, 24(3): 2891.*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Beaty Zyśk polegał na wykonaniu oznaczeń adipokin, cytokin i żelatynaz w ślinie za pomocą testu immunoenzymatycznego (ELISA), a także na analizie danych badawczych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej pracy przez Panią mgr Beatę Zyśk jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie cyklu prac opublikowanych w czasopismach naukowych.

ADIUNKT
Zakładu Biotechnologii
dr hab. Agnieszka Gornowicz
Podpis

dr hab. n. med. Karolina Orywal
Zakład Diagnostyki Biochemicznej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Białystok, 07.03.2025r.

Oświadczenie współautora

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. *Zyśk B, Ostrowska L, Smarkusz-Zarzecka J, Orywal K, Mroczko B, Cwalina U. Evaluation of the diagnostic utility of selected serum adipokines and cytokines in subjects with MASLD - a pilot study. Nutrients 2024, 16(9): 1381.*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Beaty Zyśk polegał na wykonaniu oznaczeń adipokin, cytokin i żelatynaz w surowicy krwi za pomocą testu immunoenzymatycznego (ELISA), a także na pomocy w przygotowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej pracy przez Panią mgr Beatę Zyśk jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie cyklu prac opublikowanych w czasopismach naukowych.

Dr hab. n. med.
Karolina Orywal
ADIUNKT
Zakład Diagnostyki Biochemicznej UMB

.....

Podpis

dr n. o zdr. Joanna Smarkusz-Zarzecka
Zakład Dietetyki i Żywienia Klinicznego
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Białystok, 10.03.2025r.

Oświadczenie współautora

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. *Zyśk B, Ostrowska L, Smarkusz-Zarzecka J. Salivary adipokine and cytokine levels as potential markers for the development of obesity and metabolic disorders. International Journal of Molecular Sciences 2021; 22(21): 11703.*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Beaty Zyśk polegał na pomocy przy analizie zebranych badań i w edycji manuskryptu.

2. *Zyśk B, Ostrowska L, Smarkusz-Zarzecka J, Witczak-Sawczuk K, Gornowicz A, Bielawska A. Pro-inflammatory adipokine and cytokine profiles in the saliva of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) - a pilot study. International Journal of Molecular Sciences 2023; 24(3): 2891.*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Beaty Zyśk polegał na udziale w opracowaniu metodologii, wykonaniu pomiarów antropometrycznych, analizy składu ciała, pomiaru stłuszczenia i sztywności wątroby, pomocy w przygotowaniu manuskryptu oraz pozyskaniu źródeł finansowania.

3. *Zyśk B, Ostrowska L, Smarkusz-Zarzecka J, Orywal K, Mroczko B, Cwalina U. Evaluation of the diagnostic utility of selected serum adipokines and cytokines in subjects with MASLD - a pilot study. Nutrients 2024, 16(9): 1381.*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Beaty Zyśk polegał na pomocy w zaplanowaniu badań, wykonaniu pomiarów antropometrycznych, analizy składu ciała, pomiaru stłuszczenia i sztywności wątroby oraz pozyskaniu źródeł finansowania.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionych prac przez Panią mgr Beatę Zyśk jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie cyklu prac opublikowanych w czasopismach naukowych.

Joanna Smarkusz-Zarzecka
Podpis

dr n. o zdr. Katarzyna Witczak-Sawczuk
Zakład Dietetyki i Żywienia Klinicznego
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Białystok, 10.03.2025r.

Oświadczenie współautora

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. *Zyśk B, Ostrowska L, Smarkusz-Zarzecka J, Witczak-Sawczuk K, Gornowicz A, Bielawska A. Pro-inflammatory adipokine and cytokine profiles in the saliva of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) - a pilot study. International Journal of Molecular Sciences 2023, 24(3): 2891.*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Beaty Zyśk polegał na wykonaniu pomiarów antropometrycznych, analizy składu ciała, pomiaru stłuszczenia i sztywności wątroby oraz pomocy w analizie wyników.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej pracy przez Panią mgr Beatę Zyśk jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie cyklu prac opublikowanych w czasopismach naukowych.

Katarzyna Witczak-Sawczuk

Podpis

dr n. o zdr. Urszula Cwalina
Zakład Biostatystyki i Informatyki Medycznej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Białystok, 07.03.2025r.

Oświadczenie współautora

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. *Zyśk B, Ostrowska L, Smarkusz-Zarzecka J, Orywal K, Mroczko B, Cwalina U. Evaluation of the diagnostic utility of selected serum adipokines and cytokines in subjects with MASLD - a pilot study. Nutrients 2024, 16(9): 1381.*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Beaty Zyśk polegał na analizie statystycznej zgromadzonych danych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej pracy przez Panią mgr Beatę Zyśk jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie cyklu prac opublikowanych w czasopismach naukowych.

Urszula Cwalina

Podpis

16. Życiorys

Dane osobowe

Imię i Nazwisko: Beata Zyśk

Data i miejsce urodzenia: 17.11.1995 r., Szczytno

Adres e-mail: beata_zysk@tlen.pl

Wykształcenie

2020 – 2025	Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Szkoła Doktorska
2019 – 2020	Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, studia podyplomowe, kierunek: Dietetyka kliniczna
2017 – 2019	Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, kierunek: Dietetyka, studia II stopnia
2014 – 2017	Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, kierunek: Dietetyka, studia I stopnia

Doświadczenie i aktywność zawodowa

2024 – obecnie	Asystent dydaktyczny w Zakładzie Dietetyki i Żywienia Klinicznego, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
wrzesień 2024	Współpraca dietetyczna z firmą NutriDesign Lab
2023 – 2024	Dietetyk w poradni leczenia bólu i ran przewlekłych „Nie musi boleć”
2023 – obecnie	Członek Polskiego Towarzystwa Leczenia Otyłości (od 2023r.) oraz członek Sekcji Dietetyki Medycznej PTLO (od 2025r.)
2021 – obecnie	Członek Zarządu Polskiego Stowarzyszenia Praktycznej Terapii Otyłości
2019 – 2020	Dietetyk w poradni Med-Line & Med-Estetic
maj 2019	Współpraca dietetyczna z Centrum Medycznym Medicover

Podnoszenie kompetencji specjalistycznych

19.11.2023	Otrzymanie tytułu „Specjalisty Przyjaznego Dzieciom” na V Kongresie Pediatryczno-Żywieniowym na podstawie egzaminu certyfikacyjnego
02.09.2021	Kurs przeprowadzania badania elastograficznego wątroby i interpretacji wyników – uzyskanie uprawnień operatora aparatu FibroScan 530
10-12.02.2020	Kurs specjalizacyjny „Podstawy leczenia żywieniowego” – Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego (Nr 05-703/3-04-007-2020)

17. Dorobek naukowy

Łączna wartość Impact Factor (IF) całego dorobku naukowego: **38,014**

Łączna wartość punktów Ministra Edukacji i Nauki (MEiN) całego dorobku naukowego: **1 170**

Indeks Hirscha (według Web of Science i Scopus): **5**

Liczba cytowań (według Web of Science/ Scopus): **66/69**

Publikacje w czasopismach naukowych

1. Ostrowska L, Smarkusz-Zarzecka J, **Zyśk B**, Orywal K, Mroczko B, Cwalina U. Could selected adipokines/cytokines serve as markers of adipose tissue dysfunction? International Journal of Molecular Sciences 2024; 25(24): 13744. doi: 10.3390/ijms252413744.
   IF = 4,9; MEiN = 140
2. **Zyśk B**, Ostrowska L, Smarkusz-Zarzecka J, Orywal K, Mroczko B, Cwalina U. Evaluation of the diagnostic utility of selected serum adipokines and cytokines in subjects with MASLD - a pilot study. Nutrients 2024; 16(9): 1381. doi: 10.3390/nu16091381.
   IF = 4,8; MEiN = 140
3. Ostrowska L, Smarkusz-Zarzecka J, Gornowicz A, Lendzion K, **Zyśk B**, Pogodziński D. Analysis of selected salivary adipokines and cytokines in patients with obesity - a pilot study. International Journal of Molecular Sciences 2023; 24(4): 4145. doi: 10.3390/ijms24044145.
   IF = 4,9; MEiN = 140
4. **Zyśk B**, Ostrowska L, Smarkusz-Zarzecka J, Witczak-Sawczuk K, Gornowicz A, Bielawska A. Pro-inflammatory adipokine and cytokine profiles in the saliva of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) - a pilot study. International Journal of Molecular Sciences 2023; 24(3): 2891. doi: 10.3390/ijms24032891.
   IF = 4,9; MEiN = 140
5. Pogodziński D, Ostrowska L, Smarkusz-Zarzecka J, **Zyśk B**. Secretome of adipose tissue as the key to understanding the endocrine function of adipose tissue. International Journal of Molecular Sciences 2022; 23(4): 2309. doi: 10.3390/ijms23042309.
   IF = 5,6; MEiN = 140
6. Borys FM, **Zyśk B**, Zańko A, Chimkowska D, Smarkusz-Zarzecka J, Kiełczewska B, Ostrowska L. Assessment of the diet and body composition of students recreationally training team sports. Baltic Journal of Health and Physical Activity 2021; 13(2): 47-54. doi: 10.29359/BJHPA.13.2.05.

MEiN = 70

7. **Zyśk B**, Ostrowska L, Smarkusz-Zarzecka J. Salivary adipokine and cytokine levels as potential markers for the development of obesity and metabolic disorders. International Journal of Molecular Sciences 2021; 22(21): 11703. doi: 10.3390/ijms222111703.
   IF = 6,208; MEiN = 140
8. Ostrowska L, Gier D, **Zyśk B**. The influence of reducing diets on changes in thyroid parameters in women suffering from obesity and Hashimoto's disease. Nutrients 2021; 13(3): 862. doi: 10.3390/nu13030862.
   IF = 6,706; MEiN = 140
9. **Zyśk B**, Stefańska E, Ostrowska L. Effect of dietary components and nutritional status on the development of pre-school children. Roczniki Państwowego Zakładu Higieny 2020; 71(4): 393-403. doi: 10.32394/rpzh.2020.0133.
   MEiN = 20

Autorstwo/ współautorstwo rozdziałów w podręcznikach

1. **Zyśk B**, Ostrowska L. Żywienie w chorobach wątroby i dróg żółciowych. W: Panasiuk A. (red.) Hepatologia. Tom 2. Warszawa: Wyd. lekarskie PZWL; Wyd. naukowe PWN, 2024: 969-1001. MEiN = 20
2. **Zyśk B**, Ostrowska L. Stłuszczeniowa choroba wątroby a otyłość. W: Gorczyca-Głowacka I, Tomasiewicz K, Wełnicki M. (red.) Stłuszczeniowa choroba wątroby związana z zaburzeniami metabolicznymi w praktyce klinicznej. Warszawa: Medical Tribune Polska, 2024: 19-32. MEiN = 20
3. Ostrowska L, **Zyśk B**. Definicja, epidemiologia i diagnostyka choroby otyłościowej. W: Ostrowska L, Bogdański P, Mamcarz A. (red.) Otyłość i jej powikłania. Praktyczne zalecenia diagnostyczne i terapeutyczne. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2021: 3-51. MEiN = 20
4. **Zyśk B**. Zasady żywienia różnych grup ludności. Metody oceny sposobu żywienia i stanu odżywienia. W: Ostrowska L. (red.) Żywienie człowieka - skrypt do ćwiczeń. Białystok: Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, 2021: 126-170 MEiN = 20
5. **Zyśk B**, Ostrowska L. Dieta wysokowitaminowa u osób w starszym wieku. W: Kamocki ZK, Kędra B. (red.) Wybrane zagadnienia chirurgii osób w podeszłym wieku. = Challenges of surgery in the elderly. Białystok: Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, 2020: 63-98. MEiN = 20

Wygłoszone wykłady i doniesienia zjazdowe

1. Jak ukierunkować leczenie dietetyczne u osób ze stłuszczeniową chorobą wątroby związaną z dysfunkcją metaboliczną (MASLD). Wyzwania Hepato-Gastroenterologii 2024. Białystok, 6-7.09.2024.
2. Ocena wybranych elementów sposobu żywienia i aktywności fizycznej pacjentów z chorobą otyłościową i NAFLD. III Międzynarodowa Multidyscyplinarna Konferencja Doktorantów Uniwersytetu Szczecińskiego "MKDUS 2.0". Szczecin/ online 21-23.06.2023.
3. Związek między chorobą otyłościową a niealkoholową stłuszczeniową chorobą wątroby (NAFLD). II Ogólnopolskie Sympozjum Medyczne Problematyka chorób metabolicznych. Online 21.04. 2022.

Granty wewnętrzne

1. Projekt naukowy z subwencji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku – B.SUB.24.251. Kierownik: prof. dr hab. n. med. Lucyna Ostrowska. **Współwykonawca: mgr Beata Zyśk**. Analiz różnic stężenia wybranych hormonów jelitowych w surowicy krwi u pacjentów z różnym stanem odżywienia, po spożyciu standaryzowanego posiłku.
2. Projekt naukowy z subwencji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku – B.SUB.24.112. Kierownik: prof. dr hab. n. med. Lucyna Ostrowska. **Współwykonawca: mgr Beata Zyśk**. Ocena różnic stężenia greliny w surowicy krwi u pacjentów z różnym stanem odżywienia, po spożyciu standaryzowanego posiłku.
3. Projekt naukowy z subwencji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku – B.SUB.23.104. **Kierownik: mgr Beata Zyśk**. Ocena wskaźników stłuszczenia i zwłóknienia wątroby w aspekcie możliwości ich zastosowania w diagnostyce i monitorowaniu niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (NAFLD).
4. Projekt naukowy z subwencji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku – SUB/3/DN/22/002/3316. **Kierownik: mgr Beata Zyśk**. Poszukiwanie markerów insulinooporności oraz niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (NAFLD).
5. Projekt naukowy z subwencji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku – SUB/3/DN/21/002/3316. **Kierownik: mgr Beata Zyśk**. Ocena wpływu rozmieszczenia w ustroju tkanki tłuszczowej i czynników środowiskowych na występowanie insulinooporności i niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby.

6. Projekt naukowy z subwencji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku – SUB/3/DN/21/001/3316). Kierownik: prof. dr hab. n. med. Lucyna Ostrowska. **Współwykonawca: mgr Beata Zyśk**. Poszukiwanie markerów otyłości metabolicznej.
7. Projekt naukowy z subwencji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku – SUB/3/DN/20/001/3316. Kierownik: prof. dr hab. n. med. Lucyna Ostrowska. **Współwykonawca: mgr Beata Zyśk**. Poszukiwanie markerów otyłości.

Popularyzacja nauki oraz promocja Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

1. Audycja „Nie tylko marynistyczna" w Radiu Akadera – rozmowa z Krzysztofem Sadowskim nt. „Jak zdrowo przetrwać święta?" 20.12.2023.
2. Promocja kierunku Dietetyka – udział w webinariach kierunkowych wspólnie z prof. Lucyną Ostrowską 30.03.2021.
3. Promocja kierunku Dietetyka – udział w cyklu wirtualnych spotkań pt. „Studiuj w UMB!" 09.06.2020.
4. Wydarzenia edukacyjne i promocja UMB – działalność w kole naukowym „SKN Dietetyk" przy Zakładzie Dietetyki i Żywienia Klinicznego w czasie trwania studiów magisterskich.
5. Akcje promocyjne – pełnienie roli opiekuna studentów w toku kształcenia w Szkole Doktorskiej, a następnie w ramach pracy na stanowisku asystenta dydaktycznego.

Organizacja konferencji naukowych

1. Członek Komitetu Organizacyjnego II Kongresu Polskiego Towarzystwa Leczenia Otyłości. Warszawa, 01.12.2023 – 02.12.2023.
2. Organizacja Konferencji „Czas w dietetyce", Białystok, 13.04.2018.

Interdyscyplinarna współpraca z jednostkami Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

3. Współpraca z Centrum Badań Klinicznych UMB, 2024 – obecnie.
4. Współpraca z Zakładem Diagnostyki Biochemicznej UMB, 2020-2025.
5. Współpraca z Zakładem Biotechnologii Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej UMB, 2020-2025.