

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Riscul Cardiovascular în Ficatul Gras: Legături Patogenice

Doctorand **Abdulrahman Samy Mohamed Ismaiel**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Dan Lucian Dumitrașcu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Perspectivă istorică despre boala ficatului gras	21
2. Epidemiologia MAFLD	23
3. NAFLD vs. MAFLD – Ce este în nume?	27
4. Definiție și criterii de diagnostic pentru MAFLD	29
5. Manifestări clinice și asocieri extrahepatice în MAFLD	33
6. Mecanisme patofiziologice ale bolilor cardiovasculare în MAFLD	45
7. Diferențele dintre NAFLD și MAFLD și manifestările cardiovasculare	51
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	55
2. Metodologie generală	57
3. Studiul 1. Biomarkeri metabolici asociați cu disfuncție cardiacă în MAFLD: o analiză transversală	61
4. Studiul 2. Relația dintre adipokine și parametrii ecografici cardiovasculari în MAFLD	73
5. Studiul 3. Anxietatea și depresia în MAFLD și riscul cardiovascular	85
6. Studiul 4. Varianta <i>MBOAT7</i> rs641738 în MAFLD și riscul cardiovascular	99
7. Studiul 5. Predispoziție genetică în MAFLD și manifestările cardiovasculare —Referat sistematic	111
8. Discuții generale	127
9. Concluzii generale	131
10. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	133
REFERINȚE	137

Cuvinte cheie: boala ficatului gras non-alcoolic (NAFLD); steatoză hepatică metabolică (MAFLD); risc cardiovascular; patogeneză; markeri neinvazivi.

INTRODUCERE

Boala ficatului gras nonalcoolic (NAFLD) este cea mai frecventă patologie care afectează ficatul în țările occidentale, reprezentând aproximativ 75% din bolile hepatice cronice, cu o prevalență globală de 25%, fiind cea mai frecventă în Orientul Mijlociu și America de Sud și mai puțin frecvente în Africa. În România, prevalența NAFLD a fost raportată a fi de 20% într-un studiu care a implicat 3005 pacienți spitalizați care nu erau cunoscuți anterior cu nicio boală hepatică. Steatoza hepatică metabolică (MAFLD) este o nomenclatură recentă care a fost propusă în ultimul timp pentru a înlocui termenul anterior NAFLD.

Mai multe studii publicate au raportat că boala ficatului gras este un factor de risc independent asociat cu mortalitatea de orice cauză și de morbiditatea crescută asociată cu bolile cardiovasculare. Au fost propuse legături patofiziologice comune pentru a exercita un rol crucial în comorbiditățile asociate bolii hepatice grase, inclusiv diabetul zaharat de tip 2, obezitatea, dislipidemia și bolile cardiovasculare, toate acestea având un efect nefavorabil asupra cursului natural al bolii hepatice grase și viceversa.

Sunt disponibile în prezent date foarte limitate, cu dovezi insuficiente, cu privire la aceste potențiale legături fiziopatologice și parametrii cardiovasculari evaluați, folosind criteriile nou definite ale MAFLD. În consecință, sunt necesare investigații suplimentare pentru a evalua aceste asociații.

În prezent, în literatura de specialitate lipsesc date despre nivelurile serice de adiponectină și visfatină, varianta rs641738 lângă *MBOAT7*, metaboliți incluzând LPC (18:2/0:0), LPC (22:6), glicil tirozină și Cer (d18:0/). 23:0), precum și anxietatea și depresia în MAFLD, utilizând criteriile de diagnostic nou stabilite. Mai mult, rolul lor potențial în creșterea riscului cardiovascular rămâne neclar la pacienții cu MAFLD.

Prin urmare, am efectuat acest studiu observațional pentru a evalua nivelurile serice de adiponectină și visfatină, varianta rs641738 lângă *MBOAT7*, LPC (18:2/0:0), LPC (22:6), glicil tirozină și Cer (d18:0/23:0), în plus față de anxietate și depresie la pacienții cu MAFLD vs. martori. Mai mult, am evaluat posibilul lor rol în creșterea riscului cardiovascular prin efectuarea unei evaluări cardiovasculare cuprinzătoare, incluzând numeroși parametri cardiovasculari evaluați prin electrocardiografie, ecocardiografie și ecografie Doppler, precum și scoruri de risc cardiovascular.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Prima parte a tezei cuprinde 7 capitole care sunt rezumate în mod sistematic, subliniind importanța temei studiate. Primul capitol „O perspectivă istorică despre boala ficatului gras” descrie prima dată când NAFLD a fost raportată în literatura

medicală până în prezent, fiind denumită în prezent MAFLD. Al doilea capitol „Epidemiologia MAFLD” prezintă datele disponibile cu privire la ratele de incidență și prevalență. Al treilea capitol „NAFLD vs. MAFLD – Ce este în nume?” clarifică diferențele dintre criteriile de diagnosticare dintre NAFLD și MAFLD. Al patrulea capitol „Definiția și criteriile de diagnostic pentru MAFLD” prezintă criteriile de diagnostic publicate recent pentru noua nomenclatură MAFLD. Al cincilea capitol „Manifestări clinice și asocieri extrahepatice în MAFLD” menționează un rezumat al manifestărilor hepatice și extrahepatice ale MAFLD, inclusiv bolile cardiovasculare. Al șaselea capitol „Mecanismele fiziopatologice ale bolilor cardiovasculare în MAFLD” se concentrează pe multiplele legături potențiale patogene. Ultimul capitol, al șaptelea, „Diferențe între NAFLD și MAFLD și manifestările cardiovasculare” include date referitoare la discrepanțe ale rezultatelor cardiovasculare între NAFLD și MAFLD.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

A doua parte a tezei include 10 capitole care încep cu descrierea ipotezei generale și a obiectivelor studiului, metodologia generală, urmată de 4 studii observaționale și 1 referat sistematic, discuții generale, concluzii generale și contribuții de originalitate și inovatoare.

Studiul 1 „Biomarkeri metabolici asociați cu disfuncție cardiacă în MAFLD: un studiu transversal” a avut ca scop investigarea mai multor biomarkeri metabolici, inclusiv LPC (18:2/0:0), LPC (22:6), glicil tirozină și Cer (d18:0/23:0) și efectele lor cardiovasculare potențiale asupra funcțiilor cardiace sistolice, sistolice subclinice și diastolice în MAFLD.

Ipoteza noastră a fost că biomarkerii metabolici studiați ar facilita predicția MAFLD, precum și identificarea neinvazivă a disfuncției cardiovasculare și stratificarea riscului cardiovascular.

Am ajuns la concluzia că pacienții cu MAFLD au mai multe șanse de a dezvolta disfuncție sistolică cardiacă și subclinică, precum și disfuncție diastolică. Nivelurile scăzute de glicil tirozină au fost asociate cu funcția sistolică redusă a ventriculului stâng, iar nivelurile mai mici de LPC (18:2/0:0) au fost asociate cu disfuncția diastolică.

Studiul 2 „Relația dintre adipokine și parametrii ecografici cardiovasculari în MAFLD” compară nivelurile serice de adiponectină și visfatină la pacienții cu MAFLD și martorii, precum și asocierile potențiale ale acestora cu parametrii cardiovasculari măsurați prin ecocardiografie și ecografie Doppler.

Am emis ipoteza că o diferență semnificativă între nivelurile de adiponectină și visfatină ar fi prezentă între pacienții cu MAFLD vs. martori, la fel ca potențialul acestora de a prezice riscul cardiovascular, în special disfuncția sistolică și diastolică.

Conform rezultatelor noastre obținute, nu am găsit nicio diferență semnificativă în nivelurile serice de adiponectină și visfatină între pacienții cu MAFLD și martori. În ciuda faptului că raportul E/A a fost asociat semnificativ cu adiponectina în analiza univariată, această asociere a fost pierdută în modelele de regresie liniară multivariată. Interesant, cu toate că nivelurile de adiponectină nu au fost asociate cu fracția de ejeție a ventriculului stâng în analiza univariată, a fost găsită o asociere semnificativă invers proporțională după analiza de regresie liniară multivariată. Nivelurile de adiponectină și visfatină, pe de altă parte, nu au prezis grosimea peretelui posterior al

ventriculului stâng, iar nivelurile de visfatină nu au prezis grosimea intimei medie a carotidei sau grosimea peretelui septal interventricular.

Studiul 3 „Anxietatea și depresia în MAFLD și riscul cardiovascular” a comparat anxietatea și depresia la pacienții cu MAFLD și martori, precum și parametrii CV ecocardiografici multipli și ecografiile Doppler.

Am emis ipoteza că anxietatea și depresia ar crește riscul CV la pacienții cu MAFLD.

Deși pacienții cu MAFLD au avut un risc mai mare de anxietate (așa cum a fost evaluat de LWASQ) și depresie (conform evaluării de BDI) în analiza univariată, această asocieră a fost pierdută în analiza de regresie multivariată. În ciuda faptului că disfuncția sistolică subclinică a fost raportată la subiecții cu scoruri mai mari de evaluare a factorilor somatici la LWASQ în analiza univariată, semnificația a fost pierdută după analiza multivariată. Mai mult, grosimea peretelui septal interventricular a fost asociată cu anxietate și depresie. Cu toate acestea, după analiza multivariată, semnificația statistică s-a atenuat la niveluri ne semnificative.

Studiul 4 „Varianta *MBOAT7* rs641738 în MAFLD și riscul cardiovascular” investighează asocieră dintre varianta rs641738 în MAFLD, precum și asocieră acesteia cu riscul cardiovascular incluzând mai mulți parametri structurali și funcționali ecocardiografici, ecografie Doppler a carotidei arterelor și scorurile de risc cardiovascular.

Am emis ipoteza că varianta rs641738 lângă *MBOAT7* va fi asociată cu o susceptibilitate crescută de a dezvolta MAFLD și riscul cardiovascular asociat.

În populația de studiu evaluată a subiecților caucazieni de origine europeană, nu am găsit nicio asocieră semnificativă între varianta rs641738 și MAFLD. Parametrii cardiovasculari multipli, inclusiv parametrii cardiaci structurali, funcțiile sistolice și diastolice și riscul cardiovascular subclinic, nu s-au dovedit a fi asociați cu rs641738. Chiar dacă varianta rs641738 a prezis algoritmul de risc ASCVD și ActiTest în analiza univariată, această semnificație a fost pierdută după analizele de regresie multivariată liniară și cuantilă.

Studiul 5 „Predispoziție genetică în MAFLD și manifestările cardiovasculare — Referat sistematic” rezumă literatura actuală care descrie rolul și efectele variantei rs641738 și oferă o actualizare a dovezilor publicate recent care evaluează relația dintre rs641738 și prezența și severitatea steatozei hepatice, a fibrozei, a markerilor biochimici și a progresiei la HCC, precum și a rezultatelor cardiovasculare în NAFLD/MAFLD.

Cercetarea publicată demonstrează o relație semnificativă între varianta rs641738 și scăderea expresiei hepatice a *MBOAT7*, creșterea conținutului de grăsime hepatică, severitatea NAFLD și susceptibilitatea de a dezvolta NASH, fibroză avansată și HCC la adulții NAFLD de etnie caucaziană, hispanica și afro-americană. Cu toate acestea, majoritatea studiilor efectuate pe populațiile asiatice au contrazis aceste constatări. Varianta rs641738 a fost asociată cu niveluri mai mari de ALT în plasmă în studiile la copii și adolescenți care au implicat subiecți obezi, dar asocieră sa cu NAFLD/MAFLD la copii și adolescenți rămâne neclară. Studiile care examinează relația dintre varianta rs641738 și rezultatele cardiovasculare la pacienții cu NAFLD/MAFLD sunt rare în prezent. Acest polimorfism nu a fost asociat cu boala coronariană, potrivit cercetărilor actuale.

CONCLUZII GENERALE

Pe parcursul acestei teze de doctorat, am evaluat câțiva biomarkeri și scoruri non-invasive care pot fi utilizați pentru a stratifica riscul cardiovascular la pacienții cu MAFLD vs. martori, precum și utilizarea acestor markeri ca metode neinvazive pentru a evalua steatoza hepatică. Am evaluat metaboliții, adipokinele, varianta genetică, anxietatea și depresia în MAFLD și riscul cardiovascular asociat. Steatoza hepatică a fost evaluată atât folosind ultrasonografie, cât și SteatoTest™ (Biopredictive), îmbunătățind astfel acuratețea evaluării noastre. Evaluarea cardiovasculară efectuată a fost cuprinzătoare, incluzând mai mulți parametri structurali și funcționali ecocardiografici, ecografie Doppler a arterelor carotide și mai multe scoruri cardiovasculare.

Conform rezultatelor obținute, pacienții cu MAFLD sunt predispuși la dezvoltarea disfuncției cardiace sistolice, subclinice sistolice și diastolice. Nivelurile reduse de glicil tirozină pot prezice scăderea funcției sistolice a ventriculului stâng, în timp ce nivelurile mai scăzute ale LPC (18:2/0:0) pot prezice disfuncția diastolică. În ceea ce privește adipokinele, nivelurile serice de adiponectină și visfatină nu au diferit semnificativ între pacienții cu MAFLD și martori, în timp ce nivelurile de adiponectină s-au dovedit a fi semnificativ invers proporționale cu FEVS după analizele de regresie multivariată. După efectuarea analizei multivariate, anxietatea și depresia nu au crescut riscul de a dezvolta MAFLD sau parametrii cardiovasculari evaluați. Mai mult, nu am găsit nicio asociere semnificativă între varianta rs641738 și MAFLD în populația de studiu evaluată a subiecților caucazieni de origine europeană, nici nu a fost asociată cu o gamă largă de parametri cardiovasculari evaluați, inclusiv parametrii cardiaci structurali, funcțiile sistolice și diastolice și subclinici. risc cardiovascular. Deși varianta rs641738 a prezis algoritmul de risc ASCVD, această semnificație a fost pierdută după analizele de regresie multivariată. Cu toate acestea, în referatul nostru sistematic, am observat o asociere semnificativă între varianta rs641738 și scăderea expresiei hepatice a *MBOAT7*, creșterea conținutului de grăsime hepatică, severitatea NAFLD și susceptibilitatea de a dezvolta NASH, fibroză avansată și HCC la adulții NAFLD caucazieni, hispanici, și etnie afro-americană. Cu toate acestea, majoritatea studiilor care au implicat populații asiatice au contrazis aceste constatări. În prezent, există puține studii care examinează relația dintre varianta rs641738 și rezultatele cardiovasculare la pacienții cu NAFLD/MAFLD, raportând absența oricărei asocieri cu boala coronariană.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

Această teză de doctorat, prin tema evaluată, adaugă literaturii actuale noi perspective necunoscute anterior legate de mai mulți biomarkeri și scoruri în MAFLD folosind criteriile nou definite și riscul cardiovascular asociat.

Din cunoștințele noastre, acesta este primul studiu observațional care compară efectele mai multor biomarkeri metabolici asupra funcțiilor cardiace sistolice, sistolice subclinice și diastolice la pacienții cu MAFLD vs. martori.

Mai mult decât atât, literatura actuală nu are date referitoare la nivelurile de adiponectină și visfatină la pacienții cu MAFLD utilizând criteriile nou definite. În ciuda faptului că nivelurile scăzute de adiponectină și nivelurile crescute de visfatină sunt cunoscute a fi asociate cu o varietate de bolile cardiovasculare, acești parametri nu au fost evaluați la pacienții cu MAFLD pentru utilizarea lor potențială ca biomarkeri. Acesta este primul studiu care analizează nivelurile serice de adiponectină și visfatină la pacienții cu MAFLD, precum și parametri ecocardiografici și ecocardiografici cu ultrasunete Doppler și relațiile acestora cu adiponectina și visfatina.

În timp ce mai multe studii publicate au examinat asocierea dintre anxietate și depresie în NAFLD, constatările sunt neconcludente cu rezultate contradictorii. Pe de altă parte, anxietatea și depresia sunt asociate cu un risc mai mare de apariție a unei varietăți de tulburări metabolice, inclusiv obezitatea, sindromul metabolic și diabetul de tip 2, precum și bolile cardiovasculare. Datele privind anxietatea și depresia la pacienții cu MAFLD care utilizează criteriile de diagnostic nou definite și riscul cardiovascular asociat lipsesc în literatura actuală. Din câte știm, acesta este primul studiu care evaluează anxietatea și depresia la pacienții cu MAFLD.

Deși mai multe referate sistematice și meta-analize au evaluat asocierea dintre varianta rs641738 în NAFLD, rezultatele au fost contradictorii. Cu toate acestea, nu au existat studii care să evalueze efectele variantei rs641738 la pacienții cu MAFLD utilizând criteriile definite recent. Mai mult, sunt disponibile date foarte limitate cu privire la rolul variantei rs641738 și bolile cardiovasculare. În consecință, am investigat pentru prima dată relația dintre varianta rs641738 în MAFLD, precum și legătura acesteia cu riscul cardiovascular, inclusiv mai mulți parametri structurali și funcționali ecocardiografici, ecografie Doppler a arterelor carotide și scorurile de risc cardiovascular.

De asemenea, am continuat cercetările noastre prin efectuarea primului referat sistematic cuprinzător care evaluează varianta rs641738 în NAFLD și rezultatele cardiovasculare asociate care demonstrează o relație semnificativă între varianta rs641738 și scăderea expresiei hepatice a *MBOAT7*, creșterea conținutului de grăsime hepatică, severitatea NAFLD și susceptibilitatea de a dezvolta NASH. fibroză avansată și HCC la adulții NAFLD de etnie caucaziană, hispaică și afro-americană. În referatul nostru, am subliniat, de asemenea, lacunele actuale în dovezile legate de acest subiect. Am descoperit că cercetările care evaluează relația dintre varianta rs641738 și rezultatele cardiovasculare la pacienții cu NAFLD/MAFLD sunt foarte limitate în acest moment.

În concluzie, credem că această teză de doctorat a adus în lumină date originale și noi prin evaluarea markerilor și scorurilor multiple în MAFLD și riscul cardiovascular asociat, contribuind la o mai bună înțelegere a acestei relații complexe.

PhD Thesis Summary

Cardiovascular Risk in Fatty Liver Disease: Pathogenic Links

PhD Student **Abdulrahman Samy Mohamed Ismaiel**

PhD Coordinator Prof.dr. **Dan Lucian Dumitrașcu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. A historical perspective about fatty liver disease	21
2. Epidemiology of MAFLD	23
3. NAFLD vs. MAFLD – What’s in the name?	27
4. Definition and diagnostic criteria for MAFLD	29
5. Clinical Outcomes and Extra-Hepatic Associations in MAFLD	33
6. Pathophysiological Mechanisms of CVD in MAFLD	45
7. Differences between NAFLD and MAFLD and CV outcomes	51
PERSONAL CONTRIBUTIONS	
1. Hypothesis/Objective	55
2. General Methodology	57
3. Study 1. Metabolic Biomarkers Related to Cardiac Dysfunction in Metabolic-Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease: A Cross-sectional Analysis	61
4. Study 2. Relationship Between Adipokines and Cardiovascular Ultrasound Parameters in Metabolic-Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease	73
5. Study 3. Anxiety and Depression in Metabolic-Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease and Cardiovascular Risk	85
6. Study 4. <i>MBOAT7</i> rs641738 variant in metabolic-dysfunction-association fatty liver disease and cardiovascular risk	99
7. Study 5. Genetic predisposition in metabolic-dysfunction-associated fatty liver disease and cardiovascular outcomes— Systematic review	111
8. General Discussions	127
9. General Conclusions	131
10. Originality and Innovative Contributions	133
REFERENCES	137

Keywords: non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD); metabolic-dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD); cardiovascular risk; pathogenesis; non-invasive markers.

INTRODUCTION

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most frequent pathology affecting the liver in the Western countries, representing approximately 75% of chronic liver diseases, with a global prevalence of 25%, being most frequent in the Middle East and South America and least frequent in Africa. In Romania, the prevalence of NAFLD was reported to be 20% in a study involving 3,005 hospitalized patients that weren't previously known with any liver disease. Metabolic-dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD) is a recent nomenclature that was proposed lately to substitute the previous term NAFLD.

Several published studies reported that fatty liver disease is an independent risk factor linked with all-cause mortality and increased cardiovascular disease (CVD)-related morbidity. Commonly shared pathophysiological links were proposed to exert a crucial role in fatty liver disease-associated comorbidities, including type 2 diabetes mellitus, obesity, dyslipidemia, and CVD, all of which were found to exert an unfavorable effect on fatty liver disease's natural course and vice versa.

Very limited data with insufficient evidence is currently available regarding these evaluated potential pathophysiological links and cardiovascular parameters using the newly defined criteria of MAFLD. Accordingly, further investigation remains necessary to evaluate these associations.

At the moment, the literature lacks data about serum adiponectin and visfatin levels, rs641738 variant near *MBOAT7*, metabolites including LPC (18:2/0:0), LPC (22:6), glyceryl tyrosine, and Cer (d18:0/23:0), as well as anxiety and depression in MAFLD, utilizing the newly established diagnosis criteria. Moreover, their potential role in increasing cardiovascular risk remains unclear in patients with MAFLD.

Therefore, we conducted this observational study of cross-sectional design to assess the serum levels of adiponectin and visfatin, rs641738 variant near *MBOAT7*, LPC (18:2/0:0), LPC (22:6), glyceryl tyrosine, and Cer (d18:0/23:0), in addition to anxiety and depression in MAFLD patients vs. controls. Moreover, we assessed their possible role in increasing the cardiovascular risk through conducting a comprehensive cardiovascular assessment including numerous cardiovascular parameters evaluated by electrocardiography, echocardiography, and Doppler ultrasound, as well as cardiovascular risk scores.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

The first part of the thesis includes 7 chapters that are summarized in a systematic manner, emphasizing the importance of the studied topic. The first chapter "A historical perspective about fatty liver disease" describes the first time NAFLD was reported in the medical literature till present, currently being termed MAFLD. The second chapter "Epidemiology of MAFLD" outlines the available data regarding the

incidence and prevalence rates. The third chapter "NAFLD vs. MAFLD – What's in the name?" clarifies the differences in the diagnostic criteria between NAFLD and MAFLD. The fourth chapter "Definition and diagnostic criteria for MAFLD" presents the recently published diagnostic criteria for the new nomenclature MAFLD. The fifth chapter "Clinical Outcomes and Extra-hepatic Associations in MAFLD" mentions a summary of the hepatic and extra-hepatic manifestations of MAFLD, including cardiovascular disease. The sixth chapter "Pathophysiological Mechanisms of CVD in MAFLD" focuses on the multiple potential pathogenic links. The last chapter, the seventh, "Differences between NAFLD and MAFLD and CV outcomes" includes data regarding the cardiovascular outcome discrepancies between NAFLD and MAFLD.

PERSONAL CONTRIBUTION

The second part of the thesis includes 10 chapters that begin with a description of the study's general hypothesis and objectives, general methodology, followed by 4 observational studies and 1 systematic review, general discussions, general conclusions, and originality and innovative contributions.

Study 1 "Metabolic Biomarkers Related to Cardiac Dysfunction in Metabolic-Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease: A Cross-sectional Analysis" aimed to investigate several metabolic biomarkers including LPC (18:2/0:0), LPC (22:6), Glycyl tyrosine, and Cer (d18:0/23:0) and their potential cardiovascular effects on systolic, subclinical systolic, and diastolic cardiac functions in MAFLD.

Our hypothesis was that the studied metabolic biomarkers would facilitate the prediction of MAFLD as well as the non-invasive identification of cardiovascular dysfunction and cardiovascular risk stratification.

We concluded that MAFLD patients are more likely to develop cardiac systolic and subclinical systolic dysfunction, as well as diastolic dysfunction. Even after controlling for confounding factors, lower glycyl tyrosine levels were associated with reduced LV systolic function, and lower LPC (18:2/0:0) levels were associated with diastolic dysfunction.

Study 2 "Relationship Between Adipokines and Cardiovascular Ultrasound Parameters in Metabolic-Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease" aimed to compare serum adiponectin and visfatin levels in MAFLD patients and controls, as well as their potential associations with cardiovascular parameters measured by echocardiography and Doppler ultrasound.

We hypothesized that a significant difference between adiponectin and visfatin levels would be present between MAFLD patients vs. controls and that they could predict cardiovascular risk, specifically systolic and diastolic dysfunction.

According to our obtained results, we found no significant difference in serum adiponectin and visfatin levels between MAFLD patients and controls. Despite the fact that the E/A ratio was significantly associated with adiponectin in univariate analysis, this association was lost in multivariate linear regression models. Interestingly, despite the fact that adiponectin levels were not associated with left ventricular ejection fraction in univariate analysis, a significant inversely proportional association was found after multivariate linear regression analysis. Adiponectin and visfatin levels, on the other hand, did not predict left ventricular posterior wall thickness, and visfatin

levels did not predict carotid intima media thickness or interventricular septal wall thickness.

Study 3 "Anxiety and Depression in Metabolic-Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease and Cardiovascular Risk" compared anxiety and depression in MAFLD patients to controls, as well as multiple echocardiographic and Doppler ultrasound CV parameters.

We hypothesized that anxiety and depression would increase the CV risk in MAFLD patients.

Although MAFLD patients had a higher risk of anxiety (as evaluated by the LWASQ) and depression (as evaluated by the BDI) in univariate analysis, this association was lost in multivariate regression analysis. Despite the fact that subclinical systolic dysfunction was reported in subjects with higher somatic factor assessment scores on the LWASQ in univariate analysis, the significance was lost after multivariate analysis. Moreover, interventricular septal wall thickness was linked to anxiety and depression. However, after multivariate analysis, the statistical significance attenuated to non-significant levels.

Study 4 "*MBOAT7* rs641738 variant in metabolic-dysfunction-associated fatty liver disease and cardiovascular risk" investigates the association between the rs641738 variant in MAFLD, as well as its association with cardiovascular risk including several echocardiographic structural and functional parameters, Doppler ultrasound of the carotid arteries, and cardiovascular risk scores.

We hypothesized that the rs641738 variant near *MBOAT7* will be associated with an increased susceptibility to develop MAFLD and associated cardiovascular risk.

In the evaluated study population of Caucasian subjects of European descent, we found no significant association between the rs641738 variant and MAFLD. Multiple cardiovascular parameters, including structural cardiac parameters, systolic and diastolic functions, and subclinical cardiovascular risk, were not found to be associated with rs641738. Even though the rs641738 variant predicted the ASCVD risk algorithm and the ActiTest in univariate analysis, this significance was lost after multivariate linear and quantile regression analyses.

Study 5 "Genetic predisposition in metabolic-dysfunction-associated fatty liver disease and cardiovascular outcomes—Systematic review" summarizes the current literature describing the role and effects of the rs641738 variant, and provide an update on recently published evidence assessing the relationship between rs641738 and the presence and severity of hepatic steatosis, fibrosis, biochemical markers, and progression to HCC, as well as cardiovascular outcomes in NAFLD/MAFLD.

The published research demonstrates a significant relationship between rs641738 variant and decreased hepatic expression of *MBOAT7*, increased hepatic fat content, NAFLD severity, and susceptibility to develop NASH, advanced fibrosis, and HCC in NAFLD adults of Caucasian, Hispanic, and African American ethnicity. Nevertheless, the majority of the studies conducted on Asian populations contradicted these findings. The rs641738 variant was linked to higher plasma ALT levels in pediatric and adolescent studies involving obese subjects, but its association with NAFLD/MAFLD in pediatric and adolescent subjects remains unclear. Studies examining the relationship between rs641738 variant and cardiovascular outcomes in NAFLD/MAFLD patients are scarce at the moment. This polymorphism has not been linked to coronary artery disease, according to current research.

GENERAL CONCLUSIONS

Throughout this PhD thesis, we evaluated several non-invasive biomarkers and scores that can be used to stratify the cardiovascular risk in MAFLD patients vs. controls, as well as using these markers as non-invasive methods to evaluate hepatic steatosis. We evaluated metabolites, adipokines, genetic variant, anxiety and depression in MAFLD and associated cardiovascular risk. Hepatic steatosis was evaluated using both ultrasonography and SteatoTest™ (Biopredictive), hence, improving the accuracy of our evaluation. The performed cardiovascular assessment was comprehensive including multiple echocardiographic structural and functional parameters, Doppler ultrasound of the carotid arteries, and several cardiovascular scores.

According to the obtained results, patients with MAFLD are prone to develop cardiac systolic, subclinical systolic, and diastolic dysfunction. Reduced glycyl tyrosine levels can predict decreased left ventricular systolic function, while lower LPC (18:2/0:0) levels can predict diastolic dysfunction. Regarding adipokines, serum adiponectin and visfatin levels did not differ significantly between MAFLD patients and controls, while adiponectin levels were found to be significantly inversely proportional with LVEF after correcting for confounding factors. After performing multivariate analysis, anxiety and depression did not increase the risk of developing MAFLD or the evaluated cardiovascular parameters. Moreover, we found no significant association between the rs641738 variant and MAFLD in the evaluated study population of Caucasian subjects of European descent, neither was it related to a wide range of assessed cardiovascular parameters, including structural cardiac parameters, systolic and diastolic functions, and subclinical cardiovascular risk. Although the rs641738 variant predicted the ASCVD risk algorithm, this significance was lost after correcting for confounding factors. Nevertheless, in our systematic review, we observed a significant association between the rs641738 variant and decreased hepatic expression of *MBOAT7*, increased hepatic fat content, NAFLD severity, and susceptibility to develop NASH, advanced fibrosis, and HCC in NAFLD adults of Caucasian, Hispanic, and African American ethnicity. Nonetheless, the majority of studies involving Asian populations contradicted these findings. There are currently few studies examining the relationship between the rs641738 variant and cardiovascular outcomes in NAFLD/MAFLD patients, reporting an absence of any link to coronary artery disease.

ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS

This doctoral thesis, through the assessed topic, adds to the current literature new perspectives that were previously unknown related to several biomarkers and scores in the MAFLD using the newly defined criteria and associated cardiovascular risk.

To the best of our knowledge, this is the first observational study to compare the effects of several metabolic biomarkers on systolic, subclinical systolic, and diastolic cardiac functions in MAFLD patients vs. controls.

Moreover, the current literature lacks any data regarding adiponectin and visfatin levels in MAFLD patients using the newly defined criteria. Despite the fact that decreased adiponectin levels and increased visfatin levels are known to be associated with a variety of CVD, these parameters were not evaluated in MAFLD patients for their potential use as biomarkers. This is the first study to look at serum adiponectin and visfatin levels in MAFLD patients, as well as comprehensive cardiovascular echocardiographic and Doppler ultrasound parameters and their relationships with adiponectin and visfatin.

While several published studies have examined the association between anxiety and depression in NAFLD, the findings are inconclusive with conflicting results. On the other hand, anxiety and depression are associated with a higher risk of a variety of metabolic disorders, including obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes, as well as CVD. Data on anxiety and depression in MAFLD patients using the newly defined diagnosis criteria and associated cardiovascular risk are lacking in the current literature. To the best of our knowledge, this is the first study to evaluate anxiety and depression in MAFLD patients.

Although several systematic reviews and meta-analyses evaluated the association between the rs641738 variant in NAFLD, results have been conflicting. However, there have been no studies evaluating the effects of the rs641738 variant in MAFLD patients using the recently defined criteria. Moreover, very limited data are available regarding the role of the rs641738 variant and CVD. Accordingly, we investigated for the first time the relationship between the rs641738 variant in MAFLD, as well as its link with cardiovascular risk including several echocardiographic structural and functional parameters, Doppler ultrasound of the carotid arteries, and cardiovascular risk scores.

We also continued our research by conducting the first comprehensive systematic review evaluating the rs641738 variant in NAFLD and associated cardiovascular outcomes demonstrating a significant relationship between rs641738 variant and decreased hepatic expression of *MBOAT7*, increased hepatic fat content, NAFLD severity, and susceptibility to develop NASH, advanced fibrosis, and HCC in NAFLD adults of Caucasian, Hispanic, and African American ethnicity. In our review, we also pointed out the current gaps in the evidence related to this topic. We found that the research evaluating the relationship between rs641738 variant and cardiovascular outcomes in NAFLD/MAFLD patients are very limited at the moment.

In conclusion, we believe that this PhD thesis brought into the light original and novel data by evaluating multiple markers and scores in MAFLD and associated cardiovascular risk, contributing to a better understanding of this complex relationship.