

### 3. Streszczenie

**Wstęp:** Zaburzenie używania alkoholu (AUD) pozostaje istotną przyczyną śmiertelności na świecie. Jest ono bezpośrednią przyczyną ponad 40 jednostek chorobowych, spośród których jedną z najważniejszych jest alkoholowa choroba wątroby (ALD). Uszkodzenie wątroby w ALD przebiega etapami – od stłuszczenia, przez zapalenie aż po marskość. W patofizjologii progresji ALD odgrywają rolę liczne mechanizmy molekularne, w tym produkty zaawansowanej glikacji (AGE) oraz zaburzenia mikrobiomu. Niedawno odkryty został nowy podtyp AGE (nazwany AGE10) reagujący z przeciwciałami przeciwko syntetycznemu, melibiozopochodnemu AGE.

**Cel pracy:** Określenie powiązania klasycznych AGE z alkoholową chorobą wątroby. Ocena powiązania AGE10 z alkoholowym zapaleniem wątroby. Określenie dokładności diagnostycznej AGE10 w alkoholowym zapaleniu wątroby. Zbadanie zaburzeń mikrobiomu w AUD i ALD.

**Materialy i metody:** Na rozprawę składa się cykl 3 publikacji powiązanych tematycznie. Pierwsza publikacja to przegląd systematyczny i metaanaliza opracowane zgodnie z wytycznymi PRISMA. Włączono do niej 11 artykułów. Druga publikacja opiera się na porównaniu stężenia nowoodkrytego podtypu AGE (AGE10) u 65 pacjentów z alkoholowym zapaleniem wątroby i grupy kontrolnej składającej się z 65 osób bez istotnych schorzeń. Poziom AGE10 określono z wykorzystaniem kompetycyjnego testu ELISA. Trzecia praca opiera się na analizie sekwencji 16S rRNA. Uzyskano dane dla 122 pacjentów z AUD, 75 z alkoholową chorobą wątroby, 54 z chorobami wątroby o innej etiologii oraz grupę kontrolną składającą się z 260 osób bez istotnych schorzeń. Kontrolę jakości i wstępną obróbkę bioinformatyczną sekwencji przeprowadzono z wykorzystaniem USEARCH. Do uzyskania wariantów sekwencji ampliconu użyto algorytmu UNOISE3. Taksonomię przypisano z użyciem IDTAXA i bazy GTDB 07-RS207. Potencjał funkcjonalny mikrobiomu uzyskano przez PICRUSt2 z Metacyc jako bazą referencyjną. Różnicę w proporcjach występowania poszczególnych taksonów i w potencjalne funkcjonalnym określono z wykorzystaniem ANCOM-BC.

**Wyniki:** ALD jest powiązane z wyższym stężeniem klasycznych podtypów AGE (frakcja fluorescencyjna i CML). Żadne z badań zakwalifikowanych do przeglądu systematycznego i metaanalizy nie raportowało ich dokładności diagnostycznej w ALD. Pacjenci z alkoholowym

zapaleniem wątroby mieli istotnie wyższe stężenia AGE10 w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio  $184.5 \pm 71.1 \mu\text{g/mL}$  i  $123.5 \pm 44.9 \mu\text{g/mL}$ ,  $p < 0.001$ ). Dokładność diagnostyczna AGE10 wyrażona jako AUC wynosiła 0.778. Dla wartości odcięcia  $147.25 \mu\text{g/mL}$  czułość wynosiła 75% a swoistość 72%. Wykazano bardzo liczne zmiany mikrobiomu związane z AUD i ALD. Należą do nich między innymi proporcjonalny spadek typu *Firmicutes* oraz wzrost w typie *Proteobacteria*. Do spadku w *Firmicutes* w największym stopniu przyczyniły się rodziny *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Oscillospiraceae* i *Butyricicoccaceae*. Za wzrost *Proteobacteria* odpowiadały głównie rodziny *Enterobacteriaceae* i *Burkholderiaceae*. Zmiany te były bardziej zaznaczone u pacjentów z ALD w porównaniu z grupą AUD bez uszkodzenia wątroby. W profilu funkcjonalnym zaobserwowano proporcjonalne zwiększenie szlaku związanego z syntezą lipopolisacharydu.

**Wnioski:** Alkoholowa choroba wątroby jest powiązana z istotnie wyższymi stężeniami klasycznych AGE oraz nowoodkrytego AGE10. Dokładność diagnostyczna AGE10 w alkoholowym zapaleniu wątroby jest obiecująca. Zarówno ALD jak i AUD wykazują liczne, negatywne zmiany w mikrobiomie; nasilenie tych zmian jest większe w ALD w porównaniu z AUD bez uszkodzenia wątroby.

## 4. Summary

**Introduction:** Alcohol use disorder (AUD) remain a significant cause of mortality worldwide. Alcohol abuse is a direct cause of over 40 diseases, including alcoholic liver disease (ALD). The progression of liver injury in ALD occurs in stages, from steatosis to inflammation and cirrhosis. Numerous molecular mechanisms play a role in the pathophysiology of ALD progression, including advanced glycation end products (AGE) and microbiome disturbances. Recently, a new subtype of AGE (named AGE10) that reacts with antibodies against the synthetic melibiose-derived AGE has been discovered.

**Aims:** To determine the association of classic AGE with alcoholic liver disease. To evaluate the association of AGE10 with alcoholic hepatitis. To determine the diagnostic accuracy of AGE10 in alcoholic hepatitis. To investigate microbiome disturbances in AUD and ALD.

**Materials and methods:** The thesis consist of a cycle of 3 thematically related publications. The first publication is a systematic review and meta-analysis conducted in accordance with the PRISMA guidelines. 11 articles were included. The second publication is based on a comparison of the plasma levels of the newly discovered AGE subtype (AGE10) in 65 patients with alcoholic hepatitis and a control group of 65 individuals without significant illnesses. The level of AGE10 was determined using a competitive ELISA test. The third study is based on 16S rRNA sequencing analysis. Data was obtained for 122 patients with AUD, 75 with alcoholic liver disease, 54 with liver diseases of other etiologies and a control group of 260 individuals without significant illnesses. Quality control and bioinformatics preprocessing of the sequences was performed using USEARCH. The UNOISE3 algorithm was used to obtain amplicon sequence variants. Taxonomy was assigned using IDTAXA and the GTDB 07-RS207 database. Microbiome functional potential was obtained using PICRUST2 with Metacyc as a reference database. The differential abundance was determined using ANCOM-BC.

**Results:** ALD is associated with higher levels of classic AGE subtypes (fluorescent fraction and CML). None of the studies included in the systematic review and meta-analysis reported their diagnostic accuracy in ALD. Patients with alcoholic liver disease had significantly higher AGE10 levels compared to the control group ( $184.5 \pm 71.1 \mu\text{g/mL}$  and  $123.5 \pm 44.9 \mu\text{g/mL}$ , respectively,  $p < 0.001$ ). The diagnostic accuracy of AGE10 expressed as AUC was 0.778. For the cut-off value of  $147.25 \mu\text{g/mL}$ , the sensitivity was 75% and specificity 72%. Numerous microbiome changes related to AUD and ALD were observed, including a proportional decrease in *Firmicutes* phylum and an increase in *Proteobacteria* phylum. The families *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Oscillospiraceae*, and *Butyricoccaceae* contributed the most to the decrease in *Firmicutes*, while *Enterobacteriaceae* and *Burkholderiaceae* were mainly responsible for the increase in *Proteobacteria*. These changes were more pronounced in patients with ALD compared to the AUD without liver damage group. A proportional increase in the lipopolysaccharide synthesis pathway was observed in the functional profile.

**Conclusions:** Alcoholic liver disease is associated with significantly higher levels of classic AGE and newly discovered AGE10. The diagnostic accuracy of AGE10 in alcoholic liver disease is promising. Both ALD and AUD show numerous negative microbiome changes, with more pronounced changes in ALD compared to AUD without liver damage.