

UNIwersytet Medyczny w Białymstoku

Wydział Lekarski

Z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania  
w języku angielskim



Katarzyna Zdanowicz

**„Analiza stężeń wybranych adipokin i sfingolipidów w  
surowicy dzieci z kamicią żółciową”**

ROZPRAWA DOKTORSKA

PROMOTOR: DR HAB. N. MED. URSZULA DANILUK

KLINIKA PEDIATRII, GASTROENTEROLOGII, HEPATOLOGII,  
ŻYWIENIA, ALERGOLOGII I PULMONOLOGII

BIAŁYSTOK, 2023

Dziękuję Pani Promotor dr hab. n. med. Urszuli Daniluk za  
życzliwość, merytoryczne wskazówki oraz nieocenione  
wsparcie w przygotowaniu niniejszej pracy

Pracę dedykuję moim Rodzicom

# Spis treści

1. Zestawienie publikacji.....	5
2. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską.....	6
3. Wykaz stosowanych skrótów .....	7
4. Wstęp .....	8
5. Omówienie prac składających się na rozprawę doktorską .....	13
5.1. Cel pracy.....	13
5.2. Materiały i metody.....	13
5.3. Wyniki i wnioski.....	15
5.3.1. Praca oryginalna nr 1.....	15
5.3.2. Praca oryginalna nr 2.....	16
5.3.3. Praca pogładowa .....	18
6. Piśmiennictwo .....	19
7. Publikacje stanowiące rozprawę doktorską.....	23
8. Streszczenie w języku polskim.....	49
9. Streszczenie w języku angielskim.....	52
10. Informacje o charakterze udziału współautorów w publikacjach.....	55
11. Oświadczenia współautorów.....	58
12. Uchwała Komisji Bioetycznej.....	71

## 1. Zestawienie publikacji

Rodzaj publikacji	Liczba	Impact Factor	Punktacja MNiSW
Prace włączone do rozprawy doktorskiej	3	13,101	380
Prace, które nie zostały włączone do rozprawy doktorskiej	17	31,993	1200
Streszczenia zjazdowe	7	-	-
<b>Razem</b>	<b>27</b>	<b>45,094</b>	<b>1580</b>

## 2. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

### Prace oryginalne:

1. **Zdanowicz Katarzyna**, Ryżko Joanna, Bobrus-Chociejska Anna, Wojtkowska Małgorzata, Lebensztejn Dariusz Marek. The role of chemerin in the pathogenesis of cholelithiasis in children and adolescents. *Journal of Paediatric and Child Health* 2021; 57:371-375. doi: 10.1111/jpc.15223.

**IF: 1.929, MNiSW: 100**

2. **Zdanowicz Katarzyna**, Bobrus-Chociejska Anna, Pogodzińska Karolina, Błachnio-Zabielska Agnieszka, Żelazowska-Rutkowska Beata, Lebensztejn Dariusz Marek, Daniluk Urszula. Analysis of Sphingolipids in Pediatric Patients with Cholelithiasis—A Preliminary Study. *Journal of Clinical Medicine* 2022; 11:5613. <https://doi.org/10.3390/jcm11195613>

**IF: 4.964, MNiSW: 140**

### Praca poglądowa:

3. **Zdanowicz Katarzyna**, Daniluk Jarosław, Dariusz Marek Lebensztejn, Daniluk Urszula. The Etiology of Cholelithiasis in Children and Adolescents-A Literature Review. *Int J Mol Sci.* 2022;23:13376.

doi: 10.3390/ijms232113376.

**IF: 6,208, MNiSW: 140**

### 3. Wykaz stosowanych skrótów

- ALT - aminotranferaza alaninowa
- AUC - ang. area under the curve; pole pod krzywą
- BMI - ang. body mass index; wskaźnik masy ciała
- Cer - ang. ceramide; ceramid
- FGF21- ang. fibroblast growth factor 21; czynnik wzrostu fibroblastów 21
- GGT - gamma-glutamylotranspeptydaza
- HDL - ang. high-density lipoprotein; lipoproteina wysokiej gęstości
- HOMA-IR - ang. homeostasis model assessment of insulin resistance; wskaźnik insulinooporności
- LacCer - ang. lactosylceramide; laktosylceramid
- LDL - ang. low-density lipoprotein; lipoproteina niskiej gęstości
- NAFLD - ang. non-alcoholic fatty liver disease; niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby
- PRISMA – ang. preferred reporting items for systematic reviews and meta analyses
- PUFA - ang. polyunsaturated fatty acids, wielonienasycone kwasy tłuszczowe
- RBP-4 – ang. retinol binding protein-4; białko wiążące retinol – 4
- ROC - ang. receiver operating characteristic
- SGA – ang. small for gestational age; za małe w stosunku do wieku ciążowego
- Sph - ang. sphingosine; sfingozyna
- SPA - ang. sphinganine; sfinganina
- TC- ang. total cholesterol; cholesterol całkowity
- TG – ang. triglyceride; trójglicerydy
- USG - ang. ultrasonography; badanie ultrasonograficzne
- WHO – ang. World Health Organisation; Światowa Organizacja Zdrowia
- WHR – ang. waist to hip ratio; wskaźnik talia – biodro

## 4. Wstęp

Kamica żółciowa (ang. cholelithiasis) jest chorobą spowodowana tworzeniem się złogów w pęcherzyku żółciowym i/lub drogach żółciowych wewnątrz- lub zewnątrzwątrobowych. Kamienie żółciowe powstają wskutek wytrącania składników żółci takich jak cholesterol, bilirubina czy sole kwasów żółciowych. Złogi obecne w drogach żółciowych i w pęcherzyku żółciowym w zależności od składu dzieli się na cholesterolowe, barwnikowe i mieszane. Powstanie kamieni barwnikowych czarnych związane jest z nadmiarem bilirubiny w żółci. Predysponują do tego anemie hemolityczne (takie jak anemia sierpowatokrwinkowa czy sferocytoza), zespół Gilberta, choroba Leśniowskiego-Crohna czy długotrwałe żywienie pozajelitowe [1]. Kamienie barwnikowe brązowe zawierają głównie bilirubinian wapnia powstały w wyniku działania beta-glukoronidazy, a następnie polimeryzacji wolnej bilirubiny, co obserwuje się w przewlekłych infekcjach dróg żółciowych [2]. Kamienie cholesterolowe dominują w krajach zachodnich, a częstość ich występowania rośnie gwałtownie od okresu dojrzewania [3]. W ostatnich latach obserwuje się stały wzrost częstości występowania kamicy żółciowej u dzieci i wynosi on od 0.3% do nawet 4% populacji pediatrycznej [4, 6]. Kamica żółciowa może dotyczyć dzieci w każdym wieku. Opisano przypadki jej rozpoznania już w okresie płodowym [6]. Formowaniu się kamieni żółciowych u dorosłych sprzyjają czynniki genetyczne, płeć żeńska, starszy wiek czy otyłość [1, 4, 7-10]. Mimo znanych czynników ryzyka wystąpienia kamieni cholesterolowych patomechanizm choroby jest złożony (obejmuje m. in. zaburzenia składu żółci oraz dyskinezę pęcherzyka żółciowego) i wciąż nie został dogłębnie wyjaśniony [11, 12-16]. Czynniki genetyczne mogą odpowiadać nawet za 25% przypadków kamicy żółciowej [7]. W badaniach przeprowadzonych wśród dzieci stwierdzono nieprawidłowości w obrębie genów takich jak *ABCG5*, *ABCG8* czy *UGT1A1* [8, 9]. Kolejnymi czynnikami wpływającymi na formowanie się kamieni w pęcherzyku i/lub drogach żółciowych są stosowane leki (takie jak ceftriakson, oktreatyd), żywienie pozajelitowe oraz zaburzony metabolizm cholesterolu [13-16]. Sugerowano, iż zmiana składu mikrobioty jelitowej w postaci nadmiernego wzrostu proteobakterii i zmniejszenia gatunków z rodzaju *Faecalibacterium*, *Lachnospira* i *Roseburia* może odgrywać rolę w rozwoju kamieni żółciowych [12]. Patogeneza kamicy żółciowej cholesterolowej u osób dorosłych jest ściśle związana z zespołem metabolicznym, którego wyznacznikami są insulinooporność, cukrzyca typu 2, otyłość trzewna czy zaburzenia lipidowe [17]. Ostatnio postuluje się zależność między stosowaniem diety bogatej w tłuszcze i cukry proste oraz z niską



zawartością błonnika, a wystąpieniem kamicy żółciowej [10]. Stwierdzono związek między występowaniem niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) i kamicy żółciowej [18]. Mechanizm współistnienia tych dwóch chorób nie został jednoznacznie określony, jednakże może być on związany z insulinoopornością, lipogenezą de novo i aktywacją szlaków sygnałowych kwasów żółciowych obecnych u tych pacjentów [19]. Natomiast u dzieci do głównych czynników mających wpływ na coraz częstsze rozpoznawanie kamicy żółciowej (zwłaszcza kamicy cholesterolowej) można zaliczyć istotny wzrost występowania otyłości, a także większą dostępność badań ultrasonograficznych [4, 20]. U dzieci nadwagę rozpoznaje się przy wartościach wskaźnika masy ciała (ang. body mass index, BMI)  $\geq 85$  centyla, zaś otyłość  $\geq 95$  centyla [20]. Użytecznym parametrem w rozpoznawaniu otyłości trzewnej jest też wskaźnik talia-biodro (ang. waist to hip ratio, WHR) [21]. Zarówno u dorosłych jak i u dzieci, otyłość związana jest nie tylko ze zwiększeniem ilości tkanki tłuszczowej, ale też z dysregulacją metaboliczną i endokrynologiczną [22]. Tkanka tłuszczowa obecnie nie jest traktowana tylko jako magazyn substancji odżywczych, ale również jako narząd endokryny produkujący substancje białkowe - adipokiny. Wątroba również wpływa na metabolizm lipidów i węglowodanów poprzez uwalnianie do krążenia hepatokin. W poszukiwaniu patomechanizmu kamicy żółciowej, jako choroby związanej z otyłością, przeprowadzono badania oceniające stężenia adipokin u dorosłych pacjentów z kamicy żółciową [16, 23-26]. Wyniki tych badań jednak są niejednoznaczne.

Jedną z często ocenianych adipokin u pacjentów z otyłością jest chemeryna. W ostatnich latach coraz więcej prac wskazuje na plejotropowe działanie chemeryny oraz podkreślany jest jej wpływ na angiogenezę, adipogenezę czy metabolizm energetyczny [27]. W populacji pediatrycznej opisano zmiany stężenia tej adipokiny w zależności od BMI. U dzieci i młodzieży z rozpoznaną nadwagą/otyłością obserwowano zwiększone wartości chemeryny, zaś u pacjentów z jądłowstrętem psychicznym jej stężenia były niższe w porównaniu ze zdrową populacją [28, 29]. Niklowitz i wsp. stwierdzili istotny związek pomiędzy stężeniem chemeryny a obwodem talii, WHR oraz oznaczeniem zawartości tłuszczu w organizmie przy zastosowaniu metody bioimpedancji elektrycznej. Wartości tej adipokiny nie korelowały z pomiarem grubości fałdu skórniego [30]. Obserwacje te mogą sugerować, że podskórna tkanka tłuszczowa nie jest zaangażowana w syntezę chemeryny. W innym badaniu wykazano dodatnią korelację pomiędzy stężeniem tej adipokiny a zaburzeniami gospodarki lipidowej w postaci wzrostu poziomu cholesterolu całkowitego (ang. total cholesterol, TC), cholesterolu zawartego we frakcji lipoprotein o niskiej gęstości (ang. low-density lipoprotein cholesterol, LDL), trójglicerydów (ang. triglyceride, TG) oraz spadku poziomu cholesterolu zawartego we frakcji

lipoprotein o wysokiej gęstości (ang. highdensity lipoprotein cholesterol, HDL) [28]. U dzieci z NAFLD stwierdzono nie tylko wyższe stężenia chemeryny, ale także dowiedziono jej użyteczności w przewidywaniu ilości wewnątrzwątrobowych lipidów oraz zaawansowania stłuszczenia wątroby [31]. Natomiast w badaniu oceniającym stężenie chemeryny u dorosłych pacjentów z kamicią żółciową, nie wykazało istotnych zmian stężenia tej adipokiny w badanej grupie [23].

Kolejną, wzbudzającą zainteresowanie badaczy adipokiną jest waspina, która ulega ekspresji w trzewnej i podskórnej tkance tłuszczowej [23, 31-33]. Nadekspresja waspiny jest mechanizmem kompensacji wrażliwości na insulinę i metabolizmu glukozy. U dzieci niezależnie od płci, wieku i BMI niższe stężenia waspiny były związane z lepszą wrażliwością na insulinę [32]. W innym badaniu zaobserwowano wyższe stężenie waspiny u otyłych dzieci oraz jej dodatnią korelację z wykładnikami stanu zapalnego [33]. Ponadto u dzieci z NAFLD zauważono wyższe stężenia waspiny w grupie osób chorych w porównaniu do zdrowych. Substancja ta także dodatnio korelowała z zawartością lipidów w wątrobie [31]. W badaniu przeprowadzonym u osób dorosłych z kamicią żółciową nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniu waspiny w grupie badanej i kontrolnej [23].

Inną adipokiną, w przypadku której potwierdzono związek z otyłością jest progranulina. Podwyższona ekspresja progranuliny w trzewnej tkance tłuszczowej i wzrost jej stężenia w surowicy obserwowano w otyłości, cukrzycy typu 2 i dyslipidemii u osób dorosłych [34]. Dotychczas przeprowadzone badania oceniające stężenia progranuliny wśród otyłych dzieci są sprzeczne [35, 36]. Niklowitz i wsp. nie stwierdzili zależności stężenia progranuliny od BMI. Ponadto progranulina nie była związana z insulinoopornością, wykładnikami stanu zapalnego czy zespołem metabolicznym u dzieci [35]. W innym badaniu progranulina była istotnie wyższa u otyłych dzieci oraz korelowała z TG, TC, wartościami skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego [36]. Interesujące wyniki uzyskano natomiast u osób dorosłych z kamicią żółciową, które sugerują, że wyższe wartości progranuliny w surowicy mogą mieć związek z formowaniem się kamieni żółciowych [23].

Następną adipokiną produkowaną przez tkankę tłuszczową i wątrobę jest białko wiążące retinol-4 (retinol binding protein-4, RBP-4). Białko to uważane jest za czynnik ryzyka kardiometabolicznego. Wykazano, że RBP-4 indukuje oporność na insulinę, a wartości RBP-4 w osoczu są podwyższone w przypadku cukrzycy typu 2, otyłości i zespołu metabolicznego. Stwierdzono ponadto, że stężenie RBP-4 zmniejsza się podczas interwencji medycznych powodujących poprawę profilu metabolicznego, takich jak dieta, wysiłek fizyczny, doustne leki przeciwcukrzycowe i hipolipemizujące [37]. Dostępne dane dotyczące wartości RBP-4 u

dorosłych pacjentów z kamicią żółciową są sprzeczne. Wang i wsp. zaobserwowali niższe wartości adipokiny u pacjentów z kamicią żółciową w porównaniu do zdrowych kontroli w przeciwieństwie do wyników uzyskanych przez Hen i wsp. [24, 25]. Ponadto wyższe stężenia tej adipokiny wiązały się z zaburzeniami gospodarki lipidowej, węglowodanowej oraz wyższymi wartościami aminotransferazy alaninowej (ALT) [25].

Natomiast jedną z hepatokin, czyli substancji produkowanej głównie w wątrobie oraz związanej z otyłością jest czynnik wzrostu fibroblastów 21 (fibroblast growth factor 21, FGF21). Bezpośrednio reguluje on metabolizm lipidów i zmniejsza akumulację lipidów w wątrobie [38]. Istotnie wyższe stężenia FGF21 zostały wykazane w surowicy dorosłych pacjentów z NAFLD, dzieci z otyłością oraz cukrzycą typu 2 w porównaniu z grupą kontrolną [39-41]. Wśród otyłych dzieci stwierdzono dodatnią korelację FGF21 z HOMA-IR (ang. homeostasis model assessment of insulin resistance) [40]. Tylko w jednym badaniu analizowano stężenie FGF21 w surowicy dorosłych pacjentów z kamicią żółciową, które nie wykazało istotnych różnic między grupą badaną a grupą kontrolną [23].

Do tej pory nie ma opublikowanych danych oceniających stężenia adipokin i hepatokin u dzieci z kamicią żółciową. Należy też zaznaczyć, że większość omówionych wyżej badań dotyczyło osób dorosłych, a na uzyskane wyniki mogły mieć wpływ czynniki środowiskowe, takie jak współwystępowanie innych chorób, dłuższy czas przebiegu nadwagi/otyłości, stosowanie leków wpływających na gospodarkę lipidową i węglowodanową, palenie papierosów czy picie alkoholu. Z tego powodu bezpośrednie przeniesienie wyników badań adipokin na populację pediatryczną jest niemożliwe.

Interesujące są ostatnie doniesienia dotyczące oznaczeń sfingolipidów w różnych chorobach, w tym związanych z otyłością [42-46]. Do sfingolipidów zalicza się między innymi: ceramidy (ang. ceramides, Cer), laktosylceramidy (ang. lactosylceramides, LacCer), sfingozyna (ang. sphingosine, Sph) i sfinganina (ang. sphinganine, SPA). Sfingolipidy biorą udział w proliferacji, metabolizmie oraz apoptozie komórek. Mogą być również zaangażowane w odpowiedź zapalną ustroju [43, 44, 46]. Wasilewska i wsp. stwierdzili istotnie wyższe stężenia Cer w surowicy dzieci z NAFLD w porównaniu do zdrowych osób. W tym samym badaniu zanotowano także pozytywne korelacje między całkowitym stężeniem Cer a insuliną i HOMA-IR [45]. Nieliczne prace doświadczalne, przeprowadzone w populacji dorosłych sugerują korzystny efekt wybranych lipidów (wielonienasycone kwasy tłuszczowe, ang. polyunsaturated fatty acids, PUFA) w zapobieganiu tworzenia się złogów cholesterolowych w pęcherzyku żółciowym poprzez ich wpływ na zmianę składu lipidowego żółci oraz surowicy [47, 48]. Ponadto, w modelu zwierzęcym stwierdzono, że hamowanie syntezy Cer przy użyciu

myriokiny istotnie wpływało na rzadsze występowanie kamieni żółciowych u genetycznie predysponowanych myszy [49]. Do chwili obecnej nie ma danych dotyczących profilu sfingolipidów u pacjentów z kamicą żółciową, zarówno wśród dorosłych jak i dzieci.

Biorąc pod uwagę wyniki wspomnianych wyżej badań, wskazujących na związek adipokin, hepatokin i sfingolipidów z otyłością i towarzyszącymi jej chorobami, jak również częste współistnienie otyłości z kamicą żółciową, interesujące wydają się być badania oceniające stężenia wybranych adipokin, hepatokin lub sfingolipidów u dzieci z kamicą żółciową.

## **5. Omówienie prac składających się na rozprawę doktorską**

### **5.1. Cel pracy**

Główne cele badawcze to:

- ocena stężeń chemeryny, waspiny, progranuliny, RBP-4, FGF21 oraz wybranych sfingolipidów (Cer, LacCer, Spa, Sph) u dzieci z kamicią żółciową w porównaniu do rówieśników bez kamicy żółciowej,
- analiza korelacji badanych markerów z parametrami antropometrycznymi oraz wybranymi wynikami badań biochemicznych krwi,
- analiza wieloczynnikowa wpływu stężenia badanych substancji po uwzględnieniu wieku, płci, obecności otyłości oraz poziomów trójglicerydów i cholesterolu całkowitego na obecność kamicy żółciowej u dzieci przy pomocy uogólnionego modelu liniowego.

Wyniki badań przedstawiono w dwóch pracach oryginalnych.

W pracy poglądowej omówiono wyniki najnowszych badań dotyczących etiologii kamicy żółciowej u dzieci.

### **5.2. Materiały i metody**

Do badań włączono dzieci z nowo rozpoznaną kamicią żółciową za pomocą badania ultrasonograficznego (USG). Pacjenci byli hospitalizowani w Klinice Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii, Żywienia, Alergologii i Pulmonologii Uniwersyteckiego Dziecięcego Szpitala Klinicznego w Białymstoku w latach 2017-2018. Każdy z pacjentów miał wykonane pomiary antropometryczne i obliczone BMI. Do obiektywnej oceny wyniku BMI zastosowano siatki centylowe. U dzieci poniżej 3 roku życia użyto siatek centylowych Światowej Organizacji Zdrowia (ang. World Health Organisation, WHO), a w przypadku dzieci w wieku 3-18 lat siatek centylowych opublikowanych przez Kułaga Z. i wsp. BMI zostało także przedstawione w postaci z-score. Nadwagę rozpoznano u dzieci przy wartościach BMI  $\geq 85$  centyla, zaś otyłość  $\geq 95$  centyla BMI zgodnie z aktualnymi wytycznymi [17].

Do grupy kontrolnej włączono dzieci z wykluczonymi organicznymi schorzeniami przewodu pokarmowego i prawidłowym wynikiem badania USG, które były hospitalizowane w Klinice Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii, Żywienia, Alergologii i Pulmonologii Uniwersyteckiego Dziecięcego Szpitala Klinicznego w Białymstoku.

Kryteria wykluczenia z badań obejmowały obecność złogów w innych narządach, rozpoznanie ostrego zapalenia trzustki, anemii hemolitycznej, defektów anatomicznych dróg żółciowych, niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby czy aktywnej infekcji. Do badań nie włączono również pacjentów otrzymujących kwas ursodeoksycholowy, leki mające wpływ na gospodarkę węglowodanową i lipidową.

Badania były przeprowadzone po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (nr zgody R-I-002/393/2016 i APK.002.464.2020) oraz pisemnej zgody rodzica bądź opiekuna na udział w badaniu.

W pierwszej pracy oryginalnej, opublikowanej w **Journal of Paediatric and Child Health** (2021; 57:371-374), badaniem objęto 54 dzieci (21 chłopców i 33 dziewczynki) z potwierdzoną kamicią żółciową, natomiast grupę porównawczą stanowiło 26 dzieci bez kamicy żółciowej z prawidłowym BMI. Do drugiego badania opublikowanego w **Journal of Clinical Medicine** (2022; 11:5613) włączono 48 dzieci z kamicią żółciową, a 38 dzieci stanowiło grupę kontrolną dobraną pod względem BMI. W obu badaniach uczestniczyły dzieci w wieku 1-17 lat. Krew do analiz biochemicznych, oceny stężeń adipokin, hepatokin oraz sfingolipidów pobrano u wszystkich pacjentów po 10-12 godzinnym pozostaniu na czczo. Otrzymaną po odwirowaniu krwi surowicę przechowywano w zamrażarce (-80°C) do czasu analizy.

W pierwszym badaniu oznaczono wybrane parametry biochemiczne takie jak: ALT, gamma-glutamyltranspeptydazę (GGT), bilirubinę pośrednią, bezpośrednią oraz całkowitą, TG, TC, HDL i LDL. Dokonano także pomiarów parametrów metabolizmu węglowodanów – stężenie glukozy oraz insuliny, na podstawie których wyliczono wskaźnik insulinooporności HOMA-IR. Oznaczeń biochemicznych dokonano w lokalnym laboratorium wg standardowych technik. Pomiar stężenia chemeryny, waspiny, progranuliny, RBP-4 i FGF21 w surowicy wykonano za pomocą metody immunoenzymatycznej ELISA (Cloud-Clone Corp., Katy, TX, USA) zgodnie z protokołem załączonym przez producenta.

W drugim badaniu oznaczono w surowicy parametry gospodarki lipidowej (TC i TG wg standardowej techniki laboratoryjnej) oraz oceniono stężenia wybranych sfingolipidów jak: C16:0-Laktosylceramid (C16:0-LacCer), C18:0-Laktosylceramid (C18:0-LacCer), C18:1-Laktosylceramid (C18:1-LacCer), C24:0-Laktosylceramid (C24:0-LacCer), C24:1-Laktosylceramid (C24:1-LacCer), C14:0-Ceramid (C14:0-Cer), C16:0-Ceramid (C16:0-Cer), C18:0-Ceramid (C18:0-Cer), C18:1-Ceramid (C18:1-Cer), C20:0-Ceramid (C20:0-Cer), C22:0-Ceramid (C22:0-Cer), C24:0-Ceramid (C24:0-Cer), C24:1-Ceramid (C24:1-Cer), Sph oraz SPA za pomocą ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas typu potrójny kwadrupol (UHPLC/MS/MS) według metody

opisanej przez Bielawskiego i wsp.

Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem programu Statistica przy użyciu testów nieparametrycznych (test U-Manna-Whitney'a, testu zgodności chi-kwadrat oraz test Kruskala-Wallis z analizą post-hoc). Korelacje oceniono używając testu Spearmana. Przydatność diagnostyczną badanych markerów sprawdzono za pomocą analizy krzywej ROC (ang. receiver operating characteristic). Dokonano także analizy wieloczynnikowej przy pomocy uogólnionego modelu liniowego. Za istotne statystycznie uznano  $p < 0,05$ .

## 5.3. Wyniki i wnioski

### 5.3.1. Praca oryginalna nr 1

W pierwszej pracy oryginalnej wykazano znamienne wyższe stężenie chemeryny ( $p < 0.001$ ), FGF21 ( $p = 0.02$ ) i RBP-4 ( $p = 0.02$ ) u pacjentów z kamicą żółciową (grupa badana) w porównaniu do grupy kontrolnej (*Tabela 2 w artykule nr 1*). Następnie grupę badaną podzielono na dwie grupy na podstawie wartości BMI. Grupa I obejmowała 35 dzieci z prawidłowym BMI oraz grupa II 19 dzieci z nadwagą lub otyłością. W grupie II zaobserwowano istotnie wyższe wartości TG ( $p = 0.04$ ), HOMA-IR ( $p = 0.002$ ) oraz RBP-4 ( $p = 0.02$ ) w porównaniu do grupy I (*Tabela 3 i 4 w artykule nr 1*) oraz istotnie wyższe poziomy chemeryny ( $p = 0.001$ ), FGF21 ( $p = 0.01$ ) oraz RBP-4 ( $p = 0.004$ ) w porównaniu do zdrowych kontroli (*Tabela 4 w artykule nr 1*). Biorąc pod uwagę fakt, że nadmierna masa ciała stanowi czynnik ryzyka wystąpienia kamicy żółciowej oraz ma wpływ na wartości adipokin i hepatokin, dalsza analiza statystyczna objęła pacjentów z prawidłowym BMI (grupa I z kamicą żółciową vs grupa kontrolna). Jediną istotną różnicą statystyczną jaką zaobserwowano między pacjentami było istotnie wyższe stężenie chemeryny w grupie I w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p < 0.001$ ). Nie zaobserwowano natomiast istotnej różnicy w stężeniu tej substancji w grupie z kamicą żółciową porównując dzieci z prawidłowym BMI do pacjentów z nadmiernym BMI (grupa I vs grupa II) (*Tabela 4 w artykule nr 1*). Dokonano również oceny korelacji pomiędzy parametrami biochemicznymi, a stężeniami poszczególnych adipokin (*Tabela 5 w artykule nr 1*). W grupie z kamicą żółciową zaobserwowano dodatnie korelacje pomiędzy: chemeryną i TG ( $r = 0.30$ ;  $p = 0.03$ ), HOMA-IR i FGF21 ( $r = 0.42$ ;  $p = 0.002$ ), jak również waspiną i HDL ( $r = 0.28$ ;  $p = 0.04$ ).

Przy użyciu wielokrotnej regresji liniowej (zmienne niezależne: ALT, GGT, TC, TG, HDL, LDL, HOMA-IR, bilirubina całkowita, bilirubina pośrednia i bezpośrednia; zmienne

zależne: chemeryna, waspina, progranulina, RBP-4 i FGF21) wśród dzieci z kamicią żółciową zaobserwowano, że TG są istotną zmianą związaną ze stężeniem chemeryny (współczynnik beta = 0.49, p = 0.004). W grupie I zanotowano podobny związek chemeryny i TG z występowaniem kamicy żółciowej (współczynnik beta = 0.46, p = 0.04).

Powyższa analiza jest pierwszą opublikowaną pracą oceniającą stężenia wybranych adipokin i hepatokin u dzieci z kamicią żółciową. Ograniczeniem badania jest niska liczba pacjentów włączonych do badania, co mogło mieć wpływ na uzyskane wyniki. Ponadto w pracy nie uwzględniono stosowanej przez pacjentów diety i aktywności fizycznej, co również mogło mieć wpływ na przedstawione rezultaty.

Podsumowując, w powyższym badaniu wykazano, iż stężenia poszczególnych adipokin i FGF21 różnią się u pacjentów z kamicią żółciową w porównaniu ze zdrowymi kontrolami. Ponadto stwierdzono istotnie wyższe stężenie chemeryny u pacjentów z kamicią żółciową niezależnie od masy ciała. Dane te mogą wskazywać na potencjalną rolę tej adipokiny w rozwoju kamicy żółciowej u dzieci i młodzieży. Potrzeba jednak dalszych badań oceniających wpływ adipokin i hepatokin na formowanie się kamieni żółciowych w populacji pediatrycznej. Dalsze długofalowe badania przysłużą się do odpowiedzi na pytanie czy adipokiny i hepatokiny, zwłaszcza chemeryna, są czynnikami ryzyka wystąpienia kamicy żółciowej, a także czy będą pomocne w wyróżnieniu pacjentów predysponowanych do powikłań choroby. Zmniejszenie syntezy poszczególnych cytokin lub blokowanie ich receptorów przy użyciu środków farmakologicznych może stać się w przyszłości opcją terapeutyczną pacjentów z kamicią żółciową. Powyższa praca oryginalna stanowi badanie wstępne, które może być początkiem dalszych badań poświęconych stężeniom adipokin i hepatokin u pacjentów z kamicią żółciową.

### **5.3.2 Praca oryginalna nr 2**

W drugiej pracy oryginalnej wykonano analizę sfingolipidów (SPA, Sph, C16:0-LacCer, C18:0-LacCer, C18:1-LacCer, C24:0-LacCer, C24:1-LacCer, C14:0-Cer, C16:0-Cer, C18:0-Cer, C18:1-Cer, C20:0-Cer, C22:0-Cer, C24:0-Cer, C24:1-Cer) w surowicy 48 pacjentów pediatrycznych z kamicią żółciową (grupa badana). Grupa kontrolna obejmowała 38 dzieci, dopasowanych pod względem wieku, płci i BMI. Pomiędzy grupą badaną a kontrolną zaobserwowano różnice statystyczne w stężeniach: TC, SPA, C14:0-Cer, C16:0-Cer, C18:1-Cer, C18:0-Cer, C20:0-Cer, C24:1-Cer, C16:0-LacCer, C18:0-LacCer, C18:1-LacCer, C24:0-



LacCer i C24:1-LacCer (*Tabela 1 w artykule nr 2*). Następnie analizowano korelacje pomiędzy istotnymi statystycznie sfingolipidami a parametrami antropometrycznymi oraz TC i TG (*Tabela 2 w artykule nr 2*). Zaobserwowano następujące istotne dodatnie korelacje: BMI i C16:0-Cer ( $r = 0.28$ ;  $p = 0.01$ ), TG i C14:0-Cer ( $r = 0.29$ ;  $p = 0.01$ ), TG i C24:1-Cer ( $r = 0.37$ ;  $p < 0.001$ ), TG i C24:0-LacCer ( $r = 0.24$ ;  $p = 0.03$ ), TC i C14:0-Cer ( $r = 0.55$ ;  $p < 0.001$ ), TC i C16:0-Cer ( $r = 0.32$ ;  $p = 0.003$ ), TC i C24:1-LacCer ( $r = 0.24$ ;  $p = 0.03$ ), TC i C24:0-LacCer ( $r = 0.29$ ;  $p = 0.009$ ) oraz ujemne korelacje BMI i C20:0-Cer ( $r = -0.35$ ;  $p = 0.002$ ), BMI i C24:1-Cer ( $r = -0.3$ ;  $p = 0.007$ ), TC i C18:1-LacCer ( $r = -0.28$ ;  $p = 0.01$ ).

Do oceny wartości diagnostycznych sfingolipidów użyto krzywej ROC z określeniem pola pod krzywą (ang. Area under the curve, AUC) (*Tabela 3, Rycina S1 w artykule nr 2*). Najlepsze wartości diagnostyczne uzyskano dla C16:0-Cer, który pozwolił z 97.9% czułością oraz 100% swoistością odróżnić pacjentów z kamicią żółciową od zdrowych kontroli (AUC = 1.0,  $p < 0.001$ ). Oznaczenie stężenia C14:0-Cer również istotnie różnicowało grupę badaną od kontrolnej (AUC = 0.99, czułość 95.8%, swoistość 97.4%,  $p < 0.001$ ). Oznaczenia dla pozostałych sfingolipidów z mniejszą czułością i swoistością różnicowały grupę badaną od kontrolnej. W dokonanej analizie wieloczynnikowej wpływu stężenia sfingolipidów na obecność kamicy żółciowej u dzieci po uwzględnieniu wieku, płci, stwierdzonej otyłości oraz poziomów trójglicerydów i cholesterolu całkowitego, zanotowano najlepsze wartości różnicujące w postaci obniżonych poziomów SPA, C14:0-Cer, C16:0-Cer, C24:1-LacCer, C24:0-LacCer i zwiększonych wartości C20:0-Cer, C24:1-Cer, C16:0-LacCer, C18:1-LacCer (*Tabela 4 w artykule nr 2*).

Największym walorem tego badania jest opublikowanie po raz pierwszy na świecie wyników oznaczeń poziomów sfingolipidów u dzieci z kamicią żółciową. Według dostępnej literatury nie przeprowadzono jeszcze takich badań nawet u dorosłych z kamicią żółciową. Niestety praca ta nie jest pozbawiona ograniczeń. Ilość pacjentów włączonych do badania jest niska, co wynikało z faktycznej liczby dzieci z rozpoznaną kamicią żółciową w latach 2017-2018 w naszym regionie i co niestety mogło mieć wpływ na uzyskane wyniki.

Podsumowując, wyniki przedstawionego badania sugerują możliwość zastosowania sfingolipidów jako potencjalnych markerów kamicy żółciowej. Wśród analizowanych sfingolipidów, C14:0-Cer i C16:0-Cer najlepiej różnicował pacjentów z kamicią żółciową od zdrowych kontroli niezależnie od wieku, płci, otyłości, stężeń TG i TC. Potrzebne są dalsze badania aby ocenić użyteczność pomiarów sfingolipidów (SPA, C14:0-Cer, C16:0-Cer, C24:1-LacCer, C24:0-LacCer, C20:0-Cer, C24:1-Cer, C16:0-LacCer, C18:1-LacCer) jako markerów rozwoju kamicy żółciowej, zwłaszcza u zdrowych członków rodziny obciążonej rozwojem tej

choroby. Nadal też nie wiemy jaka jest rola sfingolipidów w patogenezie kamicy żółciowej. Na postawie dotychczasowych obserwacji nie jesteśmy w stanie określić czy zaburzenia w stężeniu tych substancji są przyczyną czy skutkiem formowania się kamieni w drogach żółciowych. Interesującym wydają się także badania długofalowe obejmujące pacjentów z nieprawidłowymi wartościami sfingolipidów i ich monitorowanie pod kątem rozwoju kamicy żółciowej. Biorąc pod uwagę nieprawidłowe wartości sfingolipidów w różnych jednostkach chorobowych (np. NAFLD) ciekawym wydaje się być pytanie czy wpływ na ich syntezę mógłby być kolejną opcją terapeutyczną również w tych jednostkach klinicznych.

### 5.3.3 Praca pogładowa

W pracy pogładowej wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej, opublikowanej w **International Journal of Molecular Sciences (2022; 23; 13376)**, zaprezentowano najnowsze doniesienia na temat etiologii kamicy żółciowej u dzieci. W artykule omówiono dotychczas scharakteryzowane czynniki genetyczne predysponujące do wystąpienia kamicy żółciowej. Zwrócono też uwagę na nowe hipotezy dotychczas opisywane tylko u osób dorosłych, a dotyczące udziału microbioty jelitowej w patogenezie kamicy. W kolejnej części artykułu podsumowano dane oceniające wpływ diety oraz żywienia pozajelitowego na formowanie się kamieni żółciowych u dzieci. W artykule wymieniono też przypadki kamicy żółciowej indukowane środkami farmakologicznymi. Podkreślono także negatywny wpływ otyłości na tworzenie się kamieni żółciowych w wyniku nieprawidłowej czynności motorycznej pęcherzyka żółciowego czy nadmiernej sekrecji cholesterolu do żółci. Przyczynami odpowiadającymi za wzrost częstości występowania kamicy żółciowej u dzieci mogą być między innymi modyfikacja stylu życia w postaci nieodpowiedniej diety czy brak aktywności fizycznej, co prowadzi do rozwoju otyłości. Zwrócono też uwagę na fakt, iż nie tylko nadwaga i otyłość, ale też gwałtowna utrata masy ciała jest czynnikiem predysponującym do wystąpienia kamicy żółciowej u dzieci. Ponadto wyróżniono jednostki chorobowe mogące predysponować do kamicy żółciowej takie jak pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych, niedoczynność tarczycy czy mukowiscydoza.

## 6. Piśmiennictwo

1. Socha P, Lebensztejn DM, Kamińska D. Gastroenterologia dziecięca - podręcznik do specjalizacji. Standardy Medyczne; Wydaw. Media-Press Sp. z o.o. 2016: 355-357.
2. Goldman DA. Gallbladder, Gallstones, and Diseases of the Gallbladder in Children. *Pediatr Rev.* 2020; 41: 623-629. doi: 10.1542/pir.2019-0077.
3. E S, Srikanth MS, Shreyas A, Desai S, Mehdi S, Gangadharappa HV, Suman, Krishna KL. Recent advances, novel targets and treatments for cholelithiasis; a narrative review. *Eur J Pharmacol.* 2021; 908:174376
4. Frybova B, Drabek J, Lochmannova J, Douda L, Hlava S, Zemkova D, et al. Cholelithiasis and choledocholithiasis in children; risk factors for development. *PLoS One.* 2018;13: e0196475. doi: 10.1371/journal.pone.0196475.
5. Cabrera Chamorro CC, Pabón Arteaga JS, Caicedo Paredes CA, Cabrera Bravo N, Villamil Giraldo CE, et al. Cholelithiasis and associated complications in pediatric patients. *Cir Pediatr.* 2020; 33: 172-6
6. Schwab ME, Braun HJ, Feldstein VA, Nijagal A. The natural history of fetal gallstones: a case series and updated literature review. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2020; 35: 1-8.
7. Katsika, D.; Grjibovski, A.; Einarsson, C.; Lammert, F.; Lichtenstein, P.; Marschall, H.U. Genetic and environmental influences on symptomatic gallstone disease: A Swedish study of 43,141 twin pairs. *Hepatology* 2005, 41, 1138–1143.
8. Zhao, F.; Ma, S.; Zhou, Y.; Wei, B.; Hao, Z.; Cui, X.; Xing, L.; Liu, G.; Jin, L.; Ma, T.; et al. miRNA-223 Suppresses Mouse Gallstone Formation by Targeting Key Transporters in Hepatobiliary Cholesterol Secretion Pathway. *Int. J. Biol. Sci.* 2021, 17, 4459–4473.
9. Krawczyk, M.; Niewiadomska, O.; Jankowska, I.; Jankowski, K.; Wiśniewski, S.; Lebensztejn, D.; Wiśniewski, S.; Gozdowska, J.; Kułaga, Z.; Weber, S.N.; et al. Common variant p.D19H of the hepatobiliary sterol transporter ABCG8 increases the risk of gallstones in children. *Liver Int.* 2022, 42, 1585–1592.
10. Di Ciaula, A.; Garruti, G.; Frühbeck, G.; De Angelis, M.; De Bari, O.; Wang, D.Q.H.; Lammert, F.; Portincasa, P. The Role of Diet in the Pathogenesis of Cholesterol Gallstones. *Curr. Med. Chem.* 2019, 26, 3620–3638.
11. Hu H, Shao W, Liu Q, Liu N, Wang Q, Xu J, Zhang X, Weng Z, Lu Q, Jiao L, et al. Gut microbiota promotes cholesterol gallstone formation by modulating bile acid composition and biliary cholesterol secretion. *Nat. Commun.* 2022, 13, 252.
12. Wu, T.; Zhang, Z.; Liu, B.; Hou, D.; Liang, Y.; Zhang, J.; Shi, P. Gut microbiota dysbiosis and bacterial community assembly associated with cholesterol gallstones in large-scale study. *BMC Genom.* 2013, 14, 669.
13. Baran, M.; Appak, Y.C.; Tumor, G.; Karakoyun, M.; Ozdemir, T.; Koyluoglu, G. Etiology and Outcome of Cholelithiasis in Turkish Children. *Indian Pediatr.* 2018, 55, 216–218.
14. Demirbilek, H.; Shah, P.; Arya, V.B.; Hinchey, L.; Flanagan, S.E.; Ellard, S.; Hussain, K. Long-term follow-up of children with congenital hyperinsulinism on octreotide therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014, 99, 3660–3667.

15. Serdaroglu, F.; Koca, Y.S.; Saltik, F.; Koca, T.; Dereci, S.; Akcam, M.; Akcam, F.Z. Gallstones in childhood: Etiology, clinical features, and prognosis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2016, 28, 1468–1472.
16. Wang SN, Yeh YT, Yu ML, Dai CY, Chi WC, Chung WL, Lee KT. Hyperleptinaemia and hypoadiponectinaemia are associated with gallstone disease. *Eur J Clin Invest.* 2006 Mar;36(3):176-80. doi: 10.1111/j.1365-2362.2006.01611.x.
17. Kim Y, Oh CM, Ha E, Park SK, Jung JY, Ryoo JH. Association between metabolic syndrome and incidence of cholelithiasis in the Korean population. *J Gastroenterol Hepatol.* 2021; 36: 3524-3531. doi: 10.1111/jgh.15568.
18. Arrese M, Cortés V, Barrera F, Nervi F. Nonalcoholic fatty liver disease, cholesterol gallstones, and cholecystectomy: new insights on a complex relationship. *Curr Opin Gastroenterol.* 2018;34:90-96.
19. Sun H, Warren J, Yip J, Ji Y, Hao S, Han W, Ding Y. Factors Influencing Gallstone Formation: A Review of the Literature. *Biomolecules.* 2022 Apr 6;12(4):550. doi: 10.3390/biom12040550.
20. US Preventive Services Task Force, Grossman DC, Bibbins-Domingo K, Curry SJ, Barry MJ, Davidson KW, Doubeni CA, Epling JW Jr, Kemper AR, Krist AH, Kurth AE, Landefeld CS, Mangione CM, Phipps MG, Silverstein M, Simon MA, Tseng CW. Screening for Obesity in Children and Adolescents: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA.* 2017 Jun 20;317(23):2417-2426. doi: 10.1001/jama.2017.6803.
21. Bojanic D, Ljubojevic M, Krivokapic D, Gontarev S. Waist circumference, waist-to-hip ratio, and waist-to-height ratio reference percentiles for abdominal obesity among Macedonian adolescents. *Nutr Hosp.* 2020 Aug 27;37(4):786-793.
22. Unamuno X, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Becerril S, Frühbeck G, Catalán V. Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in human obesity. *Eur J Clin Invest.* 2018; 48: e12997. doi: 10.1111/eci.12997
23. Breitfeld J, Sandvoss R, Schleinitz D, Böttcher Y, Fasshauer M, Blüher M, et al. Serum adiponectin and progranulin levels are associated with gallstone disease. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 2014; 122: 559–563.
24. Wang SN, Yeh YT, Wang ST, Chen YL, Chuang SC, Ker CG, et al. Decreased retinol binding protein 4 concentrations are associated with cholesterol gallstone disease. *J. Formos. Med. Assoc.* 2010; 109: 422–429.
25. Han T, Zhang D, Fu Z, Sun Y, Yang W, Yuan C. Retinol-binding protein 4 as a risk factor for cholesterol gallstone formation. *Mol. Cell. Biochem.* 2013; 377: 219–227
26. Wang SN, Yeh YT, Yu ML, Wang CL, Lee KT. Serum adiponectin levels in cholesterol and pigment cholelithiasis. *Br J Surg.* 2006 Aug;93(8):981-6. doi: 10.1002/bjs.5395.
27. Acewicz, M.; Kasacka, I. Chemerin activity in selected pathological states of human body—A systematic review. *Adv. Med. Sci.* 2021; 66: 2–8.
28. Ba HJ, Xu LL, Qin YZ, Chen HS. Serum chemerin levels correlate with determinants of metabolic syndrome in obese children and adolescents. *Clin. Med. Insights Pediatr.* 2019; 13: 1179556519853780. doi: 10.1177/1179556519853780.
29. Oświecimska JM, Ziora KT, Suwała A, Swietochowska E, Gorczyca P, Ziora-Jakutowicz K, et al. Chemerin serum levels in girls with anorexia nervosa. *Neuro Endocrinol. Lett.* 2014, 35, 6.

30. Niklowitz P, Rothermel J, Lass N, Barth A, Reinehr T. Link between chemerin, central obesity, and parameters of the Metabolic Syndrome: Findings from a longitudinal study in obese children participating in a lifestyle intervention. *Int. J. Obes.* 2018; 42: 10–52.
31. Kłusek-Oksiuta M, Białokoz-Kalinowska I, Tarasów E, Wojtkowska M, Werpachowska I, Lebensztejn DM. Chemerin as a novel non-invasive serum marker of intrahepatic lipid content in obese children. *Ital J Pediatr.* 2014 Nov 17;40:84. doi: 10.1186/s13052-014-0084-4.
32. Körner A, Neef M, Friebe D, Erbs S, Kratzsch J, Dittrich K, Blüher S, Kapellen TM, Kovacs P, Stumvoll M, Blüher M, Kiess W. Vaspin is related to gender, puberty and deteriorating insulin sensitivity in children. *Int J Obes (Lond).* 2011 Apr;35(4):578-86. doi: 10.1038/ijo.2010.196
33. Yin C, Hu W, Wang M, Xiao Y. The role of the adipocytokines vaspin and visfatin in vascular endothelial function and insulin resistance in obese children. *BMC Endocr Disord.* 2019 Nov 26;19(1):127. doi: 10.1186/s12902-019-0452-6.
34. Korolczuk A, Beltowski J. Progranulin, a New Adipokine at the Crossroads of Metabolic Syndrome, Diabetes, Dyslipidemia and Hypertension. *Curr Pharm Des.* 2017;23:1533-1539.
35. Niklowitz P, Rothermel J, Lass N, Barth A, Reinehr T. Is there a link between progranulin, obesity, and parameters of the metabolic syndrome in children? Findings from a longitudinal intervention study. *Pediatr Diabetes.* 2019 Dec;20(8):1047-1055. doi: 10.1111/peidi.12915. Epub 2019 Sep 18. PMID: 31469472.
36. Wang F, Chen T, Sun L, Lv H, Li X, Shen J, Chen L, Chu Z, Hou M. Circulating PGRN Levels Are Increased but Not Associated with Insulin Sensitivity or  $\beta$ -Cell Function in Chinese Obese Children. *Dis Markers.* 2018 Jul 29;2018:3729402. doi: 10.1155/2018/3729402..
37. Christou GA, Tselepis AD, Kiortsis DN. The metabolic role of retinol binding protein 4: an update. *Horm Metab Res.* 2012 Jan;44(1):6-14. doi: 10.1055/s-0031-1295491.
38. Lee BJ, Kim JS, Kim BK, Jung SJ, Joo MK, Hong SG, et al. Effects of sphingolipid synthesis inhibition on cholesterol gallstone formation in C57BL/6J mice. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2010; 25: 1105–1110.
39. Lebensztejn DM, Flisiak-Jackiewicz M, Białokoz-Kalinowska I, Bobrus-Chociej A, Kowalska I. Hepatokines and non-alcoholic fatty liver disease. *Acta Biochim Pol.* 2016; 63: 459-67. doi: 10.18388/abp.2016\_1252.
40. Baek J, Nam HK, Rhie YJ, Lee KH. Serum FGF21 Levels in Obese Korean Children and Adolescents. *J Obes Metab Syndr.* 2017 Sep;26(3):204-209. doi: 10.7570/jomes.2017.26.3.204.
41. Reinehr T. Inflammatory markers in children and adolescents with type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta.* 2019 Sep;496:100-107. doi: 10.1016/j.cca.2019.07.006.
42. Torretta E, Barbacini P, Al-Daghri NM, Gelfi C. Sphingolipids in Obesity and Correlated Co-Morbidities: The Contribution of Gender, Age and Environment. *Int J Mol Sci.* 2019; 20:5901.
43. Chatterjee S, Balram A, Li W. Convergence: Lactosylceramide-Centric Signaling Pathways Induce Inflammation, Oxidative Stress, and Other Phenotypic Outcomes. *Int J Mol Sci.* 2021 Feb 12;22(4):1816. doi: 10.3390/ijms22041816.

44. Markowski AR, Błachnio-Zabielska AU, Guzińska-Ustymowicz, K, Markowska A, Pogodzińska K, et al. Ceramides Profile Identifies Patients with More Advanced Stages of Colorectal Cancer. *Biomolecules* 2020; 10: 632.
45. Wasilewska N, Bobrus-Chociej A, Harasim-Symbor E, Tarasów E, Wojtkowska M, Chabowski A, Lebensztejn DM. Increased serum concentration of ceramides in obese children with nonalcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis.* 2018 Sep 12;17(1):216. doi: 10.1186/s12944-018-0855-9.
46. Filimoniuk A, Blachnio-Zabielska A, Imierska M, Lebensztejn DM, Daniluk U. Sphingolipid Analysis Indicate Lactosylceramide as a Potential Biomarker of Inflammatory Bowel Disease in Children. *Biomolecules.* 2020 Jul 21;10(7):1083. doi: 10.3390/biom10071083.
47. Jang SI, Fang S, Kim KP, Ko Y, Kim H, Oh J, et al. Combination treatment with n-3 polyunsaturated fatty acids and ursodeoxycholic acid dissolves cholesterol gallstones in mice. *Sci Rep.* 2019; 9: 12740. doi: 10.1038/s41598-019-49095-z.
48. Pasternak A, Bugajska J, Szura M, Walocha JA, Matyja A, Gajda M, Sztefko K, Gil K. Biliary Polyunsaturated Fatty Acids and Telocytes in Gallstone Disease. *Cell Transplant.* 2017 Jan 24;26(1):125-133. doi: 10.3727/096368916X692717.
49. Lee BJ, Kim JS, Kim BK, Jung SJ, Joo MK, Hong SG, et al. Effects of sphingolipid synthesis inhibition on cholesterol gallstone formation in C57BL/6J mice. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2010; 25: 1105–1110.

# 7. Publikacje stanowiące rozprawę doktorską



## ORIGINAL ARTICLE

### The role of chemerin in the pathogenesis of cholelithiasis in children and adolescents

Katarzyna Zdanowicz<sup>1</sup>,<sup>✉</sup> Joanna Ryzko,<sup>1</sup> Anna Bobrus-Chociej,<sup>1</sup> Malgorzata Wojtkowska<sup>2</sup> and Dariusz Marek Lebensztejn<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Paediatrics, Gastroenterology, Hepatology, Nutrition and Allergology, Medical University of Białystok and <sup>2</sup>Department of Radiology, University Teaching Children's Hospital, Białystok, Poland

**Background and aim:** Adipokines and hepatokines are proteins secreted by adipose tissue and the liver. To date, the levels of adipokines and hepatokines in cholelithiasis have only been evaluated in studies in adult patients. The purpose of our research was to assess the levels of circulating adipokines: chemerin, vaspin, progranulin, retinol-binding protein 4 (RBP-4) and hepatokine: fibroblast growth factor 21 (FGF-21) and to compare their concentrations in paediatric patients with and without cholelithiasis.

**Methods:** The prospective study included 54 children and adolescents diagnosed with gallstones and 26 controls. Fasting serum levels of adipokines and hepatokine were determined by enzyme-linked immunosorbent assays.

**Results:** The serum levels of chemerin, FGF-21 and RBP-4 were significantly higher in children and adolescents with gallstones compared to the control group. Elevated levels of triglycerides, RBP-4, and a homeostatic model for assessing insulin resistance (HOMA-IR) were observed in overweight or obese patients compared to patients with normal weight and cholelithiasis. Chemerin concentrations were increased in the normal-weight children and adolescents with cholelithiasis compared to the control group. Children and adolescents with gallstones and abnormal weight had significantly higher levels of chemerin, FGF-21 and RBP-4 than healthy controls.

**Conclusion:** Elevated serum chemerin levels were significantly higher in non-obese patients with cholelithiasis than in non-obese controls, suggesting a potential role of chemerin in the development of cholelithiasis in children and adolescents.

**Key words:** adipokines; chemerin; gallstone; hepatokines.

#### What is already known on this topic

- The pathogenesis of cholelithiasis is not fully understood, especially in lean children and adolescents.
- The relationship between serum adipokines, hepatokines and gallstone disease has been described in a few studies in the adult population.

#### What this paper adds

- Elevated serum chemerin levels were significantly higher in non-obese patients with cholelithiasis.
- Chemerin may play a role in the development of cholelithiasis in children and adolescents, which requires further research.

Cholelithiasis is caused by the formation of stones in the gallbladder, intrahepatic or extrahepatic bile ducts and can be diagnosed at any age. In contrast to adults, gallstones in children and adolescents are less common. The prevalence of this disease in paediatric patients ranges from 0.13% to 1.9%. However, the incidence of gallstones is still raising in children and adolescents,

partly due to the increasing use of abdominal ultrasonography.<sup>1</sup> The obesity epidemic is an emerging risk factor for the development of cholelithiasis in childhood and adolescence. The pathogenesis of cholelithiasis is not fully understood. Mutations in the hepatic and intestinal cholesterol transporter ABCG5/G8 are associated with an increased risk of disease.<sup>2</sup> Based on the main chemical composition, gallstones are divided into pigment and cholesterol gallstones. Pigment stones are related to haemolysis, parenteral nutrition, bile duct defects or chronic bacterial infections. Cholesterol stones are associated with female sex, obesity, overnutrition and abnormal lipid metabolism.<sup>3</sup>

The role of adipose tissue is not only to store energy, but also to produce bioactive factors called adipokines, which can directly affect the homeostasis of the whole organism. Hepatokines secreted mainly by hepatocytes are also linked to abnormal lipid metabolism. These molecules play an important role in the occurrence of obesity-related metabolic diseases, for instance insulin

**Correspondence:** Dr Zdanowicz Katarzyna, Medical University of Białystok, Waszyngtona Street 17, 15-274 Białystok, Poland. Fax: +48 85 742 38 41; email: kazdanowicz@gmail.com

†These authors contributed equally to this study.

Grant: This study was financially supported by grants from the Medical University of Białystok, Poland. Grant No: N/ST/ZB/17/002/1143; N/ST/ZB/18/001/1143.

Conflict of interest: None.

Accepted for publication 26 September 2020.

resistance, type 2 diabetes, atherosclerosis, hypertension and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD).<sup>4,5</sup>

Abnormalities in lipid metabolism and the amount of adipose tissue are associated with the formation of cholesterol gallstones. The relationship between serum adipokines, hepatokines and gallstone disease has been described in only a few studies conducted on the adult population. Previous analyses suggest a potential role of these substances in the formation of gallstones. There is no information available on the association between serum concentrations of adipokines/hepatokines and the risk of gallstones in children and adolescents.

We aimed to examine the circulating levels of selected adipokines: chemerin, vaspin, progranulin, retinol-binding protein 4 (RBP-4) and hepatokine: fibroblast growth factor 21 (FGF-21) in paediatric patients and to compare their concentrations in children and adolescents with and without cholelithiasis. Moreover, we analysed the relationship between their concentrations and anthropometric measurement, biochemical indicators of liver damage, lipid profile parameters and insulin resistance.

## Methods

Written informed consent was obtained from all patients who participated in this study. The study was conducted in accordance with the ethical standards of the Helsinki Declaration on human experimentation. The study was conducted with approval from the Ethics Committee of our institute (approval number: R-I-002/393/2016). The aim of the study was explained to the parents of the subjects, and a written informed consent form was signed prior to enrolment.

We prospectively selected 54 paediatric patients (21 boys and 33 girls) with gallstones diagnosed by abdominal ultrasound. All subjects were admitted to our department from January 2018 to December 2018. Children and adolescents diagnosed with cholelithiasis were divided into two groups according to the measured Body Mass Index (BMI) based on the World Health Organisation: (I) normal weight group (BMI: 5th percentile to less than 85th percentile) and (II) overweight/obese group (BMI: at or above 85th percentile).

Subjects suffering from gallstone pancreatitis, haemolytic anaemia, bile duct defects, choledocholithiasis, diabetes and infectious diseases were excluded from the analysis. Children and adolescents taking drugs that affect lipid or carbohydrate metabolism were not enrolled in the study. The control group consisted of 26 patients with normal body weight referred to our department due to functional gastrointestinal disorders with confirmed lack of gallstones via ultrasound examination. Despite the lack of established pathology, there are no data indicating abnormal levels of adipokines and hepatokines in the group of patients with functional gastrointestinal disorders, therefore they were included in the control group.

All children and adolescents underwent a physical examination with anthropometric measurements including body weight, height and BMI, which was calculated as weight (kg) divided by the square of height (m<sup>2</sup>). Blood samples were collected after a 12-h fast, followed by immediately centrifugation and freezing at -80°C for further analysis. Routine biochemical analyses including serum glucose, insulin, triglycerides (TG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein

(LDL), alanine aminotransferase (ALT), gamma-glutamyl transferase (GGT), total bilirubin, direct and indirect bilirubin were measured by standard clinical laboratory techniques. The homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated using the following formula: fasting blood glucose (mg/dL) × fasting insulin (μU/mL) divided by 22.5. The serum levels of chemerin, vaspin, progranulin, RBP-4 and FGF-21 were determined using enzyme-linked immunosorbent assay systems. All analyses were conducted according to the manufacturer's instructions. The presence of gallstones has been confirmed by an abdominal ultrasonography performed by a qualified radiologist.

Statistical analysis was performed using the Statistica 12 package (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Data were expressed as median and 25–75 quartiles (Q1–Q3). The differences between the groups were assessed using the Mann–Whitney two-sample test for nonparametric data. The relationships between biochemical profiles were calculated by the Spearman rank-correlation test for nonparametric data. Multiple linear regressions were used to determine which parameters affect adipokines and hepatokine levels. A *P*-value less than 0.05 was considered statistically significant.

## Results

The clinical and laboratory characteristics of children and adolescents with cholelithiasis are summarised in Table 1. Due to the matching criteria, there were no significant differences in age and sex between the study and control groups. Patients with gallstones had significantly higher levels of chemerin (*P* < 0.001), FGF-21 (*P* = 0.02) and RBP-4 (*P* = 0.02) than the controls (Table 2).

Among the subjects in the study group, 35 children and adolescents had normal body weight (group I) and 19 children and adolescents were classified as overweight or obese (group II). Overweight and obese children and adolescents with gallstone disease had significantly higher values of TG (*P* = 0.04), HOMA-IR (*P* = 0.002) and RBP-4 (*P* = 0.02) compared to

**Table 1** Characteristics of the study group (*n* = 54)

Parameter	Median (Q1–Q3)
Age, years	12 (8–14)
ALT, U/L	15 (12–18)
GGT, U/L	12 (10–15)
Bilirubin total, μmol/L	9 (6–12)
Direct bilirubin, μmol/L	3 (3–4)
Indirect bilirubin, μmol/L	5 (4–7)
Cholesterol, mmol/L	3.9 (3.4–4.1)
HDL-cholesterol, mmol/L	1.4 (1.2–1.6)
LDL-cholesterol, mmol/L	2.3 (1.9–2.6)
TG, mmol/L	0.8 (0.6–1.2)
HOMA-IR	1.7 (0.6–2.5)

ALT, alanine transaminase; GGT, gamma-glutamyltransferase; HDL-cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance; LDL-cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol; TG, triglycerides.



**Table 2** Comparison of adipokines and hepatokine levels in children from the study and control group

Parameter	Study group (n = 54)	Control group (n = 26)	P
	Median (Q1–Q3)	Median (Q1–Q3)	
Chemerin, ng/mL	155.6 (134.1–185.4)	123.7 (99.2–139.6)	<0.001
FGF-21, ng/mL	32.8 (18.9–82.4)	17.1 (13.0–66.9)	0.02
Progranulin, ng/mL	61.8 (49.5–74.6)	58.5 (49.5–72.3)	NS
RBP-4, µg/mL	22.4 (19.4–23.8)	19.7 (17.0–21.1)	0.02
Vaspin, ng/mL	0.1 (0.1–0.2)	0.2 (0.1–0.2)	NS

FGF-21, fibroblast growth factor 21; NS, not significant; RBP-4, retinol-binding protein 4.

**Table 3** Comparative characteristics of normal-weight children with cholelithiasis (group I) and overweight/obese children with cholelithiasis (group II)

Parameter	Group I (n = 35)	Group II (n = 19)	P
	Median (Q1–Q3)	Median (Q1–Q3)	
ALT, U/L	16 (12–17)	13 (11–21)	NS
GGT, U/L	12 (10–14)	14 (12–20)	NS
Total bilirubin, µmol/L	9 (6–13)	8 (6–11)	NS
Direct bilirubin, µmol/L	3 (3–5)	3 (3–4)	NS
Indirect bilirubin, µmol/L	5 (4–7)	5 (4–6)	NS
Total cholesterol, mmol/L	3.8 (3.3–4.1)	3.9 (3.6–4.5)	NS
HDL-cholesterol, mmol/L	1.5 (1.3–1.6)	1.3 (1.2–1.5)	NS
LDL-cholesterol, mmol/L	2.3 (1.9–2.5)	2.6 (1.9–2.9)	NS
TG, mmol/L	0.7 (0.6–0.9)	1 (0.6–1.4)	0.04
HOMA-IR	1.2 (0.4–2.1)	2.4 (1.6–3.3)	0.002

ALT, alanine transaminase; GGT, gamma-glutamyltransferase; HDL-cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance; LDL-cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol; NS, not significant; TG, triglycerides.

**Table 4** Differences between serum adipokines and hepatokine concentrations in normal-weight children with cholelithiasis (group I), overweight/obese children with cholelithiasis (group II) and controls

Parameter	Group I (n = 35)	Group II (n = 19)	CON (n = 26)	P		
	Median (Q1–Q3)	Median (Q1–Q3)	Median (Q1–Q3)	I vs. II	I vs. CON	II vs. CON
Chemerin, ng/mL	151.8 (134.1–184.0)	170.0 (130.0–187.1)	123.65 (99.2–139.60)	NS	<0.001	0.001
FGF-21, ng/mL	25.7 (16.9–72.6)	64.9 (27.5–96.3)	17.13 (13.0–66.9)	NS	NS	0.01
Progranulin, ng/mL	64.6 (53.3–77.1)	55.1 (44.3–44.3)	58.5 (49.5–72.3)	NS	NS	NS
RBP-4, µg/mL	20.7 (18.2–23.5)	23.7 (22.2–25.2)	19.7 (17.0–21.1)	0.02	NS	0.004
Vaspin, ng/mL	0.1 (0.1–0.2)	0.1 (0.1–0.1)	0.2 (0.1–0.2)	NS	NS	NS

CON, control group; FGF-21, fibroblast growth factor 21; NS, not significant; RBP-4, retinol-binding protein 4.

normal-weight children and adolescents with cholelithiasis (Tables 3, 4).

Obesity is a known risk factor for the gallstone formation. To exclude the effect of this aspect, another statistical analysis was performed to compare subjects with normal body weight from the study and control groups. Serum chemerin levels ( $P < 0.001$ ) were significantly higher in the study, normal-weight group compared to the control group (Table 4). Children and adolescents with gallstones and abnormal weight had significantly higher

levels of chemerin ( $P = 0.001$ ), FGF-21 ( $P = 0.01$ ) and RBP-4 ( $P = 0.004$ ) than healthy controls (Table 4).

As shown in Table 5, Spearman's correlation analysis revealed a significant positive correlation between serum levels of chemerin and TG ( $r = 0.30$ ;  $P = 0.03$ ), HOMA-IR and FGF-21 ( $r = 0.42$ ;  $P = 0.002$ ), as well as vaspin and HDL ( $r = 0.28$ ;  $P = 0.04$ ) in patients with cholelithiasis. Stepwise multiple linear regression analysis was performed using adipokines and hepatokine as dependent variables. ALT, AST, GGT, TC, TG, HDL, LDL, HOMA-

**Table 5** Correlations of adipokines and hepatokines levels from gallstone patients with their biochemical characteristics

Parameter	Chemerin	FGF-21	Progranulin	RBP-4	Vaspin
ALT	NS	NS	NS	NS	NS
GGT	NS	NS	NS	NS	NS
Total bilirubin	NS	NS	NS	NS	NS
Direct bilirubin	NS	NS	NS	NS	NS
Indirect bilirubin	NS	NS	NS	NS	NS
Total cholesterol	NS	NS	NS	NS	NS
HDL-cholesterol	NS	NS	NS	NS	0.04
LDL-cholesterol	NS	NS	NS	NS	NS
TG	0.03	NS	NS	NS	NS
HOMA-IR	NS	0.002	NS	NS	NS

ALT, alanine transaminase; FGF-21, fibroblast growth factor 21; GGT, gamma-glutamyltransferase; HDL-cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance; LDL-cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol; NS, not significant; RBP-4, retinol-binding protein 4; TG, triglycerides.

IR, total bilirubin, direct and indirect bilirubin were selected as independent variables in all subjects. We also performed stepwise multiple linear regression analysis within patients with normal and abnormal body weights. In all subjects, TG (standardised coefficients  $\beta = 0.49$ ,  $P = 0.004$ ) was determined as a significant variable associated with chemerin. In children and adolescents with normal body weight, TG (standardised coefficients  $\beta = 0.46$ ,  $P = 0.04$ ) was also a significant variable associated with chemerin, which was not observed in obese and overweight patients.

## Discussion

The current research is the first report analysing the relationship between serum levels of chemerin, vaspin, progranulin, RBP-4, FGF-21 and gallstone disease in children and adolescents. Similar studies were conducted in adults, but none of them evaluated five such bioactive factors in patients with cholelithiasis concomitantly.

In our study, we found significantly higher levels of chemerin in children and adolescents with gallstones compared to healthy controls. Another important finding was significantly higher serum chemerin levels in both obese and normal-weight patients with gallstones than in controls. It is known that chemerin, adipokine produced mainly by adipocytes and the liver, has an effect on inflammation, adipogenesis, angiogenesis and energy metabolism.<sup>6</sup> There are only a few studies describing the concentration of chemerin in children and adolescents with various diseases. To date, no study evaluating circulating chemerin in children and adolescents with cholelithiasis has been published. A previously published study found a link between higher levels of chemerin and BMI in children.<sup>7</sup> The role of the molecular relationship of chemerin between obesity and vascular endothelial damage was confirmed in children. Chemerin was a predictor of ICAM-1 and E-selectin expression independently of BMI SD score, suggesting a putative role for chemerin in early vascular inflammation.<sup>8</sup> Some researchers have reported that chemerin levels are significantly increased in overweight and obese paediatric patients with NAFLD. Klusek-Oksitua *et al.*<sup>9</sup> not only noted

higher concentrations of chemerin in this group of patients, but also showed significant positive correlations between total liver lipids in <sup>1</sup>HMR spectroscopy and chemerin. According to this research, chemerin should be considered a non-invasive biomarker in predicting both intrahepatic lipid content in obese children and advanced liver steatosis in children with NAFLD. Similar results were obtained by Mohamed *et al.*,<sup>10</sup> who demonstrated the usefulness of chemerin as simple non-invasive diagnostic markers of NAFLD in non-diabetic obese children. Niklowitz *et al.*<sup>11</sup> showed a higher level of chemerin in obese children, but no differences in the concentrations of chemerin in patients due to gender or age were found. In addition, weight loss was an important factor in lowering chemerin level and improving the parameters of the metabolic syndrome in paediatric patients. On the other hand, girls with anorexia nervosa had lower chemerin levels than normal-weight girls.<sup>12</sup>

In our analysis, the concentration of chemerin was significantly higher not only in children and adolescents with obesity, but also among children and adolescents with normal body weight and gallstones compared to the control group. Moreover, chemerin was not a factor differentiating obese children and adolescents from non-obese children and adolescents with cholelithiasis. Therefore, the deregulation of chemerin seems to be an important factor in the occurrence of cholelithiasis in children and adolescents, not least because of excess adipose tissue. On the other hand, Breitfeld *et al.*<sup>13</sup> did not report a significant increase in chemerin in adult patients with gallstones compared to healthy controls. The positive correlation between chemerin and TG levels reported in this study is consistent with other researches performed on obese and non-obese children and adolescents.<sup>7,14</sup> This observation may be caused by the lipolytic effect of chemerin on differentiated 3T3-L1 adipocytes.<sup>15</sup>

Circulating RBP-4 is mainly produced in the liver, but visceral adipocytes and macrophages are minor sources of this adipokine. A recent literature review indicates that RBP-4 plays a role in insulin resistance and may be involved in the development of obesity-related disorders.<sup>16</sup> In our study, we found that RBP-4 levels are significantly elevated in individuals with abnormal weight and cholelithiasis compared to children and adolescents

with normal body weight and cholelithiasis as well as healthy controls. This is in line with the results of Han *et al.*<sup>17</sup> who found higher RBP-4 concentrations in animals and humans with cholesterol gallstones. The contrary outcome with lower RBP-4 levels in adults patients with cholelithiasis was demonstrated by Wang *et al.*<sup>18</sup>

In the study by Reinehr *et al.*,<sup>19</sup> higher levels of RBP-4 were found in obese children than in the lean controls. A significant decrease in RBP-4 concentration was observed in children and adolescents evaluated after 1-year life-style intervention and substantial weight loss. Nevertheless, RBP-4 may be a risk factor for subsequent progression of the metabolic syndrome regardless of childhood obesity.<sup>20</sup>

Compared to the control group, significantly elevated FGF-21 concentrations were noted in the study group. Also, among obese children and adolescents with cholelithiasis, FGF-21 levels were higher than in healthy children and adolescents. FGF-21 is produced mainly by the liver and has an effect on glucose and fat metabolism.<sup>5</sup> To date, the relationship between FGF-21 and cholelithiasis in children and adolescents has not been evaluated. Only a single study was performed in adults. Breitfeld *et al.*<sup>13</sup> did not show significant differences in FGF-21 levels between patients with gallstones and healthy controls. However, further research is needed to clarify the effects of FGF-21 on the development of cholelithiasis. Evidence from the study in the paediatric population showed an elevated concentration of FGF-21 in obese children.<sup>21</sup> Moreover, obese children without comorbidities compared to obese children and NAFLD had lower levels of FGF-21.<sup>22</sup> Previous data on the association of FGF-21 with insulin resistance was confirmed in obese children without cholelithiasis.<sup>23</sup> The increase in FGF-21 levels in obese patients may be associated with metabolic changes and FGF-21 resistance.<sup>24</sup> In our study, the relationship between FGF-21 and insulin resistance was observed in children and adolescents with gallstones, probably due to the presence of overweight and obese children and adolescents in the study group.

However, some limitations should be noted. First, the small number of participants and the relatively small group of obese children and adolescents do not allow generalise our results. Second, in the study and control groups, the eating habits and physical activity of the respondents were not defined, which may also affect the obtained results.

## Conclusion

Elevated serum chemerin levels were significantly higher in non-obese patients with cholelithiasis than in non-obese controls, suggesting their potential role in the pathogenesis of cholelithiasis in children and adolescents. More studies in a larger population are needed to investigate the role of other adipokines and hepatokines in gallstones formation, regardless of the amount of adipose tissue.

## References

- Serdaroglu F, Koca YS, Saltik F *et al.* Gallstones in childhood: Etiology, clinical features, and prognosis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2016; **28**: 1468–72.
- Rebholz C, Krawczyk M, Lammert F. Genetics of gallstone disease. *Eur. J. Clin. Invest.* 2018; **48**: e12935.
- Lammert F, Gurusamy K, Ko CW *et al.* Gallstones. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2016; **2**: 16024.
- Unamuno X, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Becerril S, Frühbeck G, Catalán V. Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in human obesity. *Eur. J. Clin. Invest.* 2018; **48**: e12997.
- Lebensztejn DM, Flisiak-Jackiewicz M, Białokoz-Kalinowska I, Bobrus-Chociej A, Kowalska I. Hepatokines and non-alcoholic fatty liver disease. *Acta Biochim. Pol.* 2016; **63**: 459–67.
- Helfer G, Wu QF. Chemerin: A multifaceted adipokine involved in metabolic disorders. *J. Endocrinol.* 2018; **238**: R79–94.
- Ba HJ, Xu LL, Qin YZ, Chen HS. Serum Chemerin levels correlate with determinants of metabolic syndrome in obese children and adolescents. *Clin. Med. Insights Pediatr.* 2019; **13**: 1179556519853780.
- Landgraf K, Friebe D, Ullrich T *et al.* Chemerin as a mediator between obesity and vascular inflammation in children. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012; **97**: E556–64.
- Klusek-Oksiuta M, Białokoz-Kalinowska I, Tarasów E, Wojtkowska M, Werpachowska I, Lebensztejn DM. Chemerin as a novel non-invasive serum marker of intrahepatic lipid content in obese children. *Ital. J. Pediatr.* 2014; **40**: 84.
- Mohamed AA, Sabry S, Abdallah AM *et al.* Circulating adipokines in children with nonalcoholic fatty liver disease: Possible noninvasive diagnostic markers. *Ann. Gastroenterol.* 2017; **30**: 457–63.
- Niklowitz P, Rothermel J, Lass N, Barth A, Reinehr T. Link between chemerin, central obesity, and parameters of the metabolic syndrome: Findings from a longitudinal study in obese children participating in a lifestyle intervention. *Int. J. Obes.* 2018; **42**: 1743–52.
- Oświecimska JM, Ziara KT, Suwala A *et al.* Chemerin serum levels in girls with anorexia nervosa. *Neuro Endocrinol. Lett.* 2014; **35**: 490–6.
- Breitfeld J, Sandvoss R, Schleinitz D *et al.* Serum adiponectin and progranulin levels are associated with gallstone disease. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 2014; **122**: 559–63.
- Maghsoudi Z, Kelishadi R, Hosseinzadeh-Attar MJ. The comparison of chemerin, adiponectin and lipid profile indices in obese and non-obese adolescents. *Diabetes Metab. Syndr.* 2016; **10**: 543–6.
- Roh SG, Song SH, Choi KC *et al.* Chemerin—A new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; **362**: 1013–8.
- Umano GR, Pistone C, Tondina E *et al.* Pediatric obesity and the immune system. *Front. Pediatr.* 2019; **7**: 487.
- Han T, Zhang D, Fu Z, Sun Y, Yang W, Yuan C. Retinol-binding protein 4 as a risk factor for cholesterol gallstone formation. *Mol. Cell. Biochem.* 2013; **377**: 219–27.
- Wang SN, Yeh YT, Wang ST *et al.* Decreased retinol binding protein 4 concentrations are associated with cholesterol gallstone disease. *J. Formos. Med. Assoc.* 2010; **109**: 422–9.
- Reinehr T, Stoffel-Wagner B, Roth CL. Retinol-binding protein 4 and its relation to insulin resistance in obese children before and after weight loss. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008; **93**: 2287–93.
- Li G, Esangbedo IC, Xu L *et al.* Childhood retinol-binding protein 4 (RBP4) levels predicting the 10-year risk of insulin resistance and metabolic syndrome: The BCAMS study. *Cardiovasc. Diabetol.* 2018; **17**: 69.
- Li G, Feng D, Qu X *et al.* Role of adipokines FGF21, leptin and adiponectin in self-concept of youths with obesity. *Eur. Neuro-psychopharmacol.* 2018; **28**: 892–902.
- Flisiak-Jackiewicz M, Bobrus-Chociej A, Wasilewska N, Tarasow E, Wojtkowska M, Lebensztejn DM. Can hepatokines be regarded as novel non-invasive serum biomarkers of intrahepatic lipid content in obese children? *Adv. Med. Sci.* 2019; **64**: 280–4.
- Baek J, Nam HK, Rhie YJ, Lee KH. Serum FGF21 levels in obese Korean children and adolescents. *J. Obes. Metab. Syndr.* 2017; **26**: 204–9.
- Martínez-Garza Ú, Torres-Oteros D, Yarritu-Gallego A, Marrero PF, Haro D, Relat J. Fibroblast growth factor 21 and the adaptive response to nutritional challenges. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; **20**(9): 4692. <https://doi.org/10.3390/ijms20194692>.

Article

# Analysis of Sphingolipids in Pediatric Patients with Cholelithiasis—A Preliminary Study

Katarzyna Zdanowicz <sup>1,\*</sup>, Anna Bobrus-Chociej <sup>1</sup>, Karolina Pogodzinska <sup>2</sup>, Agnieszka Blachnio-Zabielska <sup>2</sup>, Beata Zelazowska-Rutkowska <sup>3</sup>, Dariusz Marek Lebensztejn <sup>1</sup> and Urszula Daniluk <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Pediatrics, Gastroenterology, Hepatology, Nutrition and Allergology, Medical University of Bialystok, 15-274 Bialystok, Poland

<sup>2</sup> Department of Hygiene, Epidemiology and Metabolic Disorders, Medical University of Bialystok, 15-22 Bialystok, Poland

<sup>3</sup> Department of Pediatric Laboratory Diagnostics, Medical University of Bialystok, 15-274 Bialystok, Poland

\* Correspondence: kazdanowicz@gmail.com; Tel.: +48-857450710



**Citation:** Zdanowicz, K.; Bobrus-Chociej, A.; Pogodzinska, K.; Blachnio-Zabielska, A.; Zelazowska-Rutkowska, B.; Lebensztejn, D.M.; Daniluk, U. Analysis of Sphingolipids in Pediatric Patients with Cholelithiasis—A Preliminary Study. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 5613. <https://doi.org/10.3390/jcm11195613>

Academic Editors: Andrew Day and Claus Petersen

Received: 8 July 2022

Accepted: 20 September 2022

Published: 23 September 2022

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



**Copyright:** © 2022 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/>).

**Abstract:** (1) Background: Disturbances in the sphingolipid profile are observed in many diseases. There are currently no data available on the evaluation of sphingolipids and ceramides in cholelithiasis in children. The aim of this study was to evaluate the concentrations of sphingolipids in the sera of pediatric patients with gallstones. We determined their relationship with anthropometric and biochemical parameters. (2) Methods: The concentrations of sphingolipids in serum samples were evaluated using a quantitative method, ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. (3) Results: The prospective study included 48 children and adolescents diagnosed with gallstones and 38 controls. Serum concentrations of total cholesterol (TC); sphinganine (SPA); ceramides—C14:0-Cer, C16:0-Cer, C18:1-Cer, C18:0-Cer, C20:0-Cer and C24:1-Cer; and lactosylceramides—C16:0-LacCer, C18:0-LacCer, C18:1-LacCer, C24:0-LacCer and C24:1-LacCer differed significantly between patients with cholelithiasis and without cholelithiasis. After adjusting for age, gender, obesity and TC and TG levels, we found the best differentiating sphingolipids for cholelithiasis in the form of decreased SPA, C14:0-Cer, C16:0-Cer, C24:1-LacCer and C24:0-LacCer concentration and increased C20:0-Cer, C24:1-Cer, C16:0-LacCer and C18:1-LacCer. The highest area under the curve (AUC), specificity and sensitivity were determined for C16:0-Cer with cholelithiasis diagnosis. (4) Conclusions: Our results suggest that serum sphingolipids may be potential biomarkers in pediatric patients with cholelithiasis.

**Keywords:** cholelithiasis; gallstones; sphingolipids; children

## 1. Introduction

The incidence of cholelithiasis is constantly increasing in the pediatric population, ranging from 1.9% to 4% [1,2]. Factors that predispose to the development of cholelithiasis include hemolytic disorders, ceftriaxone therapy, total parenteral nutrition (TPN), cystic fibrosis, obesity, genetic predisposition and hipercholesterolemia [3]. However, obesity is not only a growing problem in the pediatric population worldwide, but is also the most common cause of cholelithiasis in children today [1,4]. Additionally, similarly to adults, a significantly greater incidence of gallstone disease is observed in girls than in boys [5]. The formation of cholesterol gallstones is connected with hypersecretion of cholesterol and supersaturated bile in the gallbladder. Despite the known predisposing factors, such as genes and lifestyle, the mechanism of this disease has not been clearly defined [6,7].

Novel omics techniques such as metabolomics and lipidomics are promising tools that allow the measurement of carbohydrates, lipids, amino acids, amines or steroids. Sphingolipids are a class of bioactive lipids that include, i.a., ceramides (CER), lactosylceramides (LacCer), sphingosine (Sph) and sphinganine (SPA). The roles of these lipids are complex and involve the inflammatory response and cellular metabolism, migration and signaling.

CER may also be involved in growth and apoptosis [8]. Several studies have found that sphingolipids may be associated with obesity, insulin resistance, inflammation-related illnesses and cancer [9,10]. To the best of our knowledge, there are currently no data available on the evaluation of sphingolipids and ceramides in cholelithiasis in both children and adults. Changes in the concentrations of adipokines may be indirect indicators of lipid disturbances. In the studies published so far in children, the effect of chemerin on the presence of cholelithiasis has been observed [11]. Chemerin, as an adipokine involved in adipogenesis, glucose homeostasis and energy metabolism [12], may be associated with lipid disturbances.

The aim of our study was to analyze the concentrations of sphingolipids, including C16:0-LacCer, C18:0-LacCer, C18:1-LacCer, C24:0-LacCer, C24:1-LacCer, C14:0-Cer, C14:0-Cer, C16:0-Cer, C18:0-Cer, C18:1-Cer, C20:0-Cer, C22:0-Cer, C24:0-Cer, C24:1-Cer, SPA and Sph, in the sera of pediatric patients with gallstones to broaden the knowledge of the pathogenesis of this disease. Moreover, we analyzed the relationships between the concentrations of the sphingolipids and anthropometric measurements and biochemical lipid profile parameters.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. The Study Groups

This prospective study involved children with an initial diagnosis of cholelithiasis who were admitted to our Department from January 2017 to December 2018. They were diagnosed by abdominal ultrasound. None of the patients were treated with ursodeoxycholic acid at study entry. Patients included in the study group had no stone formation in other organs confirmed by abdominal ultrasound or magnetic resonance cholangiopancreatography (MRCP). In their family histories there were no diseases predisposing to cholelithiasis (e.g., cystic fibrosis). The family history was irrelevant, since only a few patients reported a positive family history of cholelithiasis. All patients had body mass index (BMI) calculated based on the World Health Organization; children were overweight or obese if their BMIs were  $\geq 85$ th percentile. The control group included 38 children without any somatic organ pathology. Patients were excluded from the analysis if they were diagnosed with complications of cholelithiasis (for example, gallstone pancreatitis), bile duct defects, hemolytic or infectious diseases. None of the patients were taking medications that affect lipid or carbohydrate metabolism.

Written informed consent was obtained from the parents of all the study participants. The protocol was approved by the local Bioethics Committee prior to patient recruitment, and the study was in accordance with the Helsinki Accords (approval number: R-I-002/393/2016, APK.002.464.2020).

### 2.2. Collection of Samples for Analysis

All participants underwent a physical examination. Blood samples were taken from all participants after a 10 h overnight fast and were immediately centrifuged and frozen at  $-80$  °C for further analysis. Total cholesterol (TC) and triglycerides (TG) levels were measured by a homogenous enzymatic colorimetric method, and values  $< 5.17$  mmol/L for TC and  $0.4$ – $1.69$  mmol/L for TG were considered normal.

### 2.3. Measurement of Sphingolipids

The content of sphingolipids was measured using ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (UHPLC/MS/MS) according to Bielawski et al. [13]. An internal standard mixture (Sph-d7, SPA-d7, C15:0-d7-Cer, C16:0-d7-Cer, C18:1-d7-Cer, C18:0-d7-Cer, C20:0-d7-Cer, C24:1-d7-Cer, C24-d7-Cer, C16-LacCer, C17-LacCer, C18-LacCer) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) and an extraction mixture (isopropanol:ethyl acetate, 15:85; v:v) were added to each sample (100  $\mu$ L of serum). The mixture was vortexed, sonicated and then centrifuged for 5 min at  $3000 \times g$ ,  $4$  °C. The supernatant was transferred to a new tube, and the pellet was re-extracted. After centrifugation, the supernatants were

combined and evaporated under nitrogen. The dried sample was reconstituted in 100  $\mu$ L of LC Solvent B B (2 mM ammonium formate, 0.15% formic acid in methanol) or LC/MS/MS analysis. Sphingolipids were analyzed using a Sciex Qtrap 6500 + triple quadrupole mass spectrometer (SCIEX, Framingham, MA, USA) using a positive ion electrospray ionization (ESI) source (except SIP, which was analyzed in negative mode) with multiple reaction monitoring (MRM), against standard curves constructed for each analyzed compound. The chromatographic separation was performed on a reverse-phase Zorbax SB-C8 column, 2.1  $\times$  150 mm, 1.8  $\mu$ m (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), in a binary gradient using 1 mM ammonium formate and 0.1% formic acid in water as solvent A, and 2 mM ammonium formate and 0.1% formic acid in methanol as solvent B at the flow rate of 0.4 mL/min.

#### 2.4. Statistical Analysis

Comprehensive data were processed using IBM SPSS Statistics 25.0 (Chicago, IL, USA) and shown as the median, minimum and maximum values. Statistical analysis was performed using the Mann–Whitney test for quantities and the chi-square test for categorical variables. Spearman's correlation test was used to analyze the correlations between variables. A generalized multivariable linear model was created to determine the association between ceramides levels and the presence of cholelithiasis after adjusting for presence of age, obesity, sex and levels of TG and TC. Receiver operating characteristic (ROC) curves were generated by using the presence of cholelithiasis as a classification variable and concentrations of sphingolipids as prognostic variables (data were analyzed using Statistica 13.3 package, TIBCO Software Inc., Cracow, Poland). Statistical significance was considered to be met when the *p* value was less than 0.05.

### 3. Results

The prospective study included 48 children and adolescents diagnosed with gallstones and 38 controls. Among patients with cholelithiasis, 21 (43.75%) were overweight/obese, and 27 (56.25%) had normal BMIs, whereas 15 (39.47%) were overweight/obese and 23 (60.53%) had normal BMIs in the control group. The demographic data and laboratory results of each group are presented in Table 1. All subjects included in the study were Caucasian.

#### 3.1. Sphingolipid Concentration in Study Group and Control Group

Serum concentrations of TC, SPA, C14:0-Cer, C16:0-Cer, C18:1-Cer, C18:0-Cer, C20:0-Cer, C24:1-Cer, C16:0-LacCer, C18:0-LacCer, C18:1-LacCer, C24:0-LacCer and C24:1-LacCer differed significantly between patients with cholelithiasis and without cholelithiasis (Table 1).

#### 3.2. Correlation between Sphingolipids, Lipid Profile and BMI

The correlations between selected sphingolipids (with the greatest prognostic significance for cholelithiasis) and BMI, TC and TG are summarized in Table 2. The following significant correlations of ceramides with BMI were noted: C16:0-Cer, C12:0-Cer and C24:1-Cer; significant correlations with TG were found for C14:0-Cer, C24:1-Cer and C24:0-LacCer; and significant correlations for TG were determined for C14:0-Cer, C16:0-Cer, C18:1-LacCer, C24:1-LacCer and C24:0-LacCer.

**Table 1.** Comparative characteristics of patients with and without cholelithiasis.

Marker	Patients with Cholelithiasis	Patients without Cholelithiasis	<i>p</i>
Number of patients	48	38	NA
Age (median, range)	12 (1–17)	12 (4–17)	NS
Sex (male)	21	22	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	20.45 (13.3–29)	21.82 (13.3–39.54)	NS
BMI z-score (median, range)	0.98 (−1.73–2.59)	1.17 (−2.09–2.9)	NS
TC (mmol/L)	3.8 (2.41–6.54)	4.16 (3.21–7.71)	0.04
TG (mmol/L)	1.73 (0.37–1.96)	0.94 (0.43–2.07)	NS
Sph (ng/mL)	2.35 (1.44–3.21)	2.0 (1.37–3.23)	NS
SPA (ng/mL)	1.40 (1.11–2.23)	1.69 (1.03–2.66)	0.006
C14:0-Cer (ng/mL)	0.94 (0.44–1.51)	1.947 (1.01–2.52)	<0.001
C16:0-Cer (ng/mL)	42.48 (27.42–96.93)	85.24 (61.20–125.66)	<0.001
C18:1-Cer (ng/mL)	1.45 (1.04–2.18)	1.90 (0.92–4.44)	0.01
C18:0-Cer (ng/mL)	220.25 (125.50–318.55)	273.91 (162.28–438.99)	0.006
C20:0-Cer (ng/mL)	38.67 (23.47–58.97)	15.92 (10.73–39.07)	<0.001
C22:0-Cer (ng/mL)	221.48 (158.69–286.96)	235.12 (153.22–498.21)	NS
C24:1-Cer (ng/mL)	471.50 (335.72–651.07)	395.00 (245.40–641.9)	0.01
C24:0-Cer (ng/mL)	725.99 (556.03–941.12)	759.68 (469.39–1164.63)	NS
C16:0-LacCer (ng/mL)	1524.09 (901.77–2067.22)	1356.47 (876.70–1725.39)	<0.001
C18:0-LacCer (ng/mL)	77.16 (60.53–116.27)	85.04 (62.72–116.88)	0.01
C18:1-LacCer (ng/mL)	26.44 (19.00–39.96)	19.45 (12.88–28.10)	<0.001
C24:1-LacCer (ng/mL)	610.90 (423.31–827.57)	857.66 (552.53–1134.32)	<0.001
C24:0-LacCer (ng/mL)	188.33 (134.33–284.36)	277.38 (198.05–428.39)	<0.001

ALT—alanine transaminase; BMI—body mass index, GGT—gamma-glutamyltransferase; TC—total cholesterol; TG—triglycerides; Sph—sphingosine; SPA—sfinanine; Cer—ceramide; LacCer—lactosylceramide; NS—not significant.

**Table 2.** The correlations of sphingolipids with BMI, TC and TG in children with cholelithiasis.

	BMI	TG	TC
SPA	NS	NS	NS
C14:0-Cer	NS	R = 0.29; <i>p</i> = 0.01	R = 0.55; <i>p</i> < 0.001
C16:0-Cer	R = 0.28; <i>p</i> = 0.01	NS	R = 0.32; <i>p</i> = 0.003
C18:1-Cer	NS	NS	NS
C18:0-Cer	NS	NS	NS
C20:0-Cer	R = −0.35; <i>p</i> = 0.002	NS	NS
C24:1-Cer	R = −0.3; <i>p</i> = 0.007	R = 0.37; <i>p</i> < 0.001	NS
C16:0-LacCer	NS	NS	NS
C18:1-LacCer	NS	NS	R = −0.28; <i>p</i> = 0.01
C18:0-LacCer	NS	NS	NS
C24:1-LacCer	NS	NS	R = 0.24; <i>p</i> = 0.03
C24:0-LacCer	NS	R = 0.24; <i>p</i> = 0.03	R = 0.29; <i>p</i> = 0.009

SPA—sfinanine; BMI—body mass index, Cer—ceramide, LacCer—lactosylceramide, TG—triglycerides, TC—total cholesterol, NS—not significant.

The ROC analysis presented in Table 3 and Figure S1 Supplementary Materials was performed to determine which sphingolipids had the best predictive value for distinguishing children with cholelithiasis from those without gallstones. The best result was determined for C16:0-Cer. A cut-off value of 59.692 ng/mL discriminated children with cholelithiasis with 97.9% sensitivity and 100% specificity (AUC = 1.0). Additionally, a high AUC value (0.99) was obtained for C14:0-Cer at the cut-off value 1.363 ng/mL with 95.8% sensitivity and 97.4% specificity.

**Table 3.** Analysis of the diagnostic efficiency of selected sphingolipids that significantly differentiated patients with and without cholelithiasis.

Marker	AUC	95% C.I. AUC	p	Cut-Off	Sensit.	Spec.	ACC
SPA	0.326	(0.211–0.442)	0.003	1.107	100%	26%	57.0%
C14:0-Cer	0.99	(0.971–1.0)	<0.001	1.363	95.8%	97.4%	96.5%
C16:0-Cer	1	(1.0–1.0)	<0.001	59.692	97.9%	100%	98.8%
C20:0-Cer	0.914	(0.857–0.972)	<0.001	26.83	93.8%	73.7%	84.9%
C24:1-Cer	0.656	(0.533–0.778)	0.01	406.594	77.1%	60.5%	69.8%
C16:0-LacCer	0.721	(0.615–0.827)	<0.001	1536.383	50%	92.1%	68.6%
C18:1-LacCer	0.888	(0.819–0.957)	<0.001	21.977	89.6%	78.9%	84.9%
C24:1-LacCer	0.876	(0.804–0.948)	<0.001	749.27	65.8%	93.8%	81.4%
C24:0-LacCer	0.93	(0.88–0.979)	<0.001	250.785	73.7%	95.8%	86.0%

SPA—sphinganine; Cer—ceramide, LacCer—lactosylceramide AUC—area under the curve; C.I—confidence interval; Sensit.—sensitivity; Specific.—specificity; ACC—accuracy.

### 3.3. Generalized Multivariable Linear Model

After adjusting for age, gender, obesity and TC and TG levels, we found the best differentiating sphingolipids for cholelithiasis in the form of decreased SPA, C14:0-Cer, C16:0-Cer, C24:1-LacCer and C24:0-LacCer concentrations; and increased C20:0-Cer, C24:1-Cer, C16:0-LacCer and C18:1-LacCer (Table 4).

**Table 4.** Effects of cholelithiasis diagnosis on ceramide concentrations after adjusting for age, obesity, sex and levels of TG and TC (generalized multivariable linear model).

Dependent Variables	Model Coefficient ( $\beta$ )	p
Sph	0.001	NS
SPA	−0.373	<0.0001
C14:0-Cer	−1.014	<0.0001
C16:0-Cer	−52.120	<0.0001
C18:1-Cer	0.045	NS
C18:0-Cer	−2.545	NS
C20:0-Cer	19.839	<0.0001
C22:0-Cer	17.868	NS
C24:1-Cer	83.609	<0.0001
C24:0-Cer	55.559	NS
C16:0-LacCer	177.932	0.01
C18:0-LacCer	−7.504	NS
C18:1-LacCer	8.419	<0.0001
C24:1-LacCer	−252.245	<0.0001
C24:0-LacCer	−84.788	<0.0001

Sph—sphingosine, SPA—sphinganine; Cer—ceramide, LacCer—lactosylceramide, TG—triglycerides, TC—total cholesterol, NS—not significant.

## 4. Discussion

To our knowledge, this is the first report on sphingolipid analysis in pediatric patients with cholelithiasis. The available data on the role of ceramides in gallstone disease were obtained in animal models. In two animal studies, inhibition of ceramide biosynthesis by myriocin suppressed gallstone formation [14,15]. Myriocin is a natural inhibitor of serine palmitoyltransferase, an enzyme involved in the initial synthesis of sphingolipids [16]. This observation may suggest that sphingolipids are involved in gallstone pathogenesis. Unfortunately, the ceramide profile was not analyzed in this study. In another study in genetically



engineered mice on a lithogenic diet, cholesterol gallstone formation was observed in 70% of cases, as opposed to 40% of mice on the same diet with supplementation of myrocin. At the same time, significant increases in the serum and bile ceramide concentrations were observed in mice on a lithogenic diet. In the group additionally treated with myrocin, the levels of ceramides were lower [15]. According to the authors, it is not known whether increases in serum and bile ceramides were directly related to the formation of gallstones; unfortunately, the ceramide profile was not analyzed in this study. In addition, in the group without myrocin and with increased serum ceramides also showed increased liver and ileum expression of ABCG5 and ABCG8 mRNA—i.e., the ATP binding cassette (ABC) transporter was noted. The ABC polymorphism has been reported to increase the risk of gallstone formation through the efflux of cholesterol in the liver [17]. Another factor that may link sphingolipids with gallstone formation is the presence of alkaline sphingomyelinase in human bile and liver, an enzyme that hydrolyzes sphingomyelin to ceramide in a bile-salts-dependent manner [18].

In our study, in patients with cholelithiasis, regardless of age, body weight, gender and levels of TC and TG, significant differences were observed in concentrations of SPA, C14:0-Cer, C16:0-Cer, C20:0-Cer, C24:1-Cer, C16:0-LacCer, C18:1-LacCer, C24:1-LacCer and C24:0-LacCer compared with children without gallstones. Our analysis showed that the most sensitive and specific markers of cholelithiasis among ceramides were decreased C14:0-Cer and C16:0-Cer. Regarding results for other diseases in children, elevated levels of ceramides C14:0-Cer and C16:0-Cer have been observed in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [19]. Moreover, Chang et al. described a bidirectional association between occurrence of NAFLD and cholelithiasis [20]. However, the mechanism of the coexistence of these two diseases has not been clearly identified. It is likely that insulin resistance, which increases *de novo* lipogenesis and activation of bile acid signaling pathways, may be involved in this process [21]. Due to the possible influence of circulating sphingolipids, patients with NAFLD were not included in our study. Maldonado-Hernández et al. also found higher levels of C14:0-Cer in adolescents with hepatic steatosis (HS). C14:0-Cer significantly correlated with total cholesterol in obese patients with HS [22]. Impaired cholesterol metabolism plays an important role in gallstone formation. In children with cholesterol gallstones, low intestinal cholesterol absorption was measured by increased serum plant sterols [23]. The accumulation of cholesterol and plant sterols in gallstones mirrors increased liver secretion of cholesterol [24]. We observed a significantly lower concentration of TC in children with cholelithiasis, regardless of body weight. However, we did not determine cholesterol metabolites and phytosterols. In our study, the composition of gallstones was not specified.

We have also demonstrated that a decrease in C24:0-LacCer or C24:1-LacCer, or an increase in C18:1-LacCer, may predispose one to cholelithiasis. In pediatric patients with type 1 diabetes, lower levels of C18-LacCer and C24-LacCer were associated with an increased risk of progression in chronic kidney disease [25]. In other study conducted in adults, lactosylceramides were not associated with diabetes [26]. On the other hand, a higher amount of liver C24:0-LacCer was observed in patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH) than in the controls [27]. The above data may suggest that, depending on the disease, the concentrations of individual lactosylceramides may have protective or aggravating effects on the course of the disease.

Metabolic syndrome is a potential risk factor for the increased occurrence of gallstones [28]. However, it is not known whether gallstones are a determinant of the development of metabolic syndrome and insulin resistance. Type 2 diabetes is one of the important risk factors for the development of gallstone disease in adult patients [29]. In our study, we found elevated C20:0-Cer levels in patients with cholelithiasis, but none of our patients had been diagnosed with metabolic syndrome at the time of evaluation. In adult studies, C20:0-Cer levels were higher in obese patients with type 2 diabetes mellitus; unfortunately, in this study there were no data on the coexistence of gallstone disease [30]. The plasma level of C20:0-Cer was higher not only in patients with type 2 diabetes mellitus,

but also 3 years before diagnosis [31]. It would be interesting to see if patients already have abnormal level of C20:0-Cer or other ceramides prior to development of cholelithiasis. In an adult study it was reported that the risk of type 2 diabetes could be predicted using concentrations of C16:0-Cer, C18:0-Cer and C18:1-Cer. In addition, the loss of body weight is accompanied by significant reductions in the ceramide index and the risk of diabetes [32]. However, more research is needed to assess the effects of selected sphingolipid levels on the incidence of diabetes and gallstone development. Dietary fat consumption is also a risk factor for the development of cholesterol gallstones. In animal models, a high-fat diet was associated with increases in body weight, fasting glucose, and insulin levels. Moreover, the imbalance in glucose metabolism resulted in increased levels of C18:1-Cer, C18:0-Cer, C24:1-Cer and C24:0-Cer in submandibular gland cells [33]. In other studies, a relationship has also been observed between the increased dietary intake of saturated fats and the serum level of ceramides [34,35]. Ceramides are cholesterol-independent biomarkers of an overlapping but distinct spectrum of diseases [35]. Zabielski et al. also found higher concentrations of C20:0-Cer in serum and liver in rats on a high-fat diet [36].

Other studies also attempted to assess the usefulness of ceramides in the courses of various diseases. Interestingly, in our study we found increased serum C16:0-LacCer in children with cholelithiasis independently of the other risk factors, such as overweight/obesity and gender. The same lactosylceramide was found to be very specific to children with Crohn's disease, a type of inflammatory bowel disease [9]. It would be interesting to investigate whether the ileal expression of ABCG5 and ABCG8 is associated with this inflammatory bowel disease, which has as-yet-unknown pathogenesis, and to evaluate the effect of myrocin treatment on the course of intestinal inflammation in an animal model of inflammatory bowel disease.

This is the first study in pediatric patients with cholelithiasis to investigate serum sphingolipids. The novelty of these findings is the main strength of our study and may be an introduction to further analyses in this age group. However, our work has several potential limitations. First, the small number of participants did not allow us to generalize our results. Our study was designed as an explanatory study to generate only pathophysiological theories of disease. The number of patients enrolled in the study was low due to the time span and the monocentric nature of the study. We understand that our results may be subject to errors of omission (type II error), and we did not interpret non-significant statistical results as underlying a true lack of differences. We also did not analyze the eating habits, physical activity and insulin resistance, which may also impact the results.

## 5. Conclusions

Our results suggest that serum sphingolipids are potential biomarkers for patients with cholelithiasis. However, it is important to conduct further research and answer the question of whether sphingolipids are factors regulating the formation of gallstones, or changes in their concentration are only secondary effects of cholelithiasis. It would be interesting to see if patients already have abnormal level of ceramides prior to the development of cholelithiasis.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jcm11195613/s1>, Figure S1: The ROC analysis.

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

**Funding:** This study was financially supported by grants from the Medical University of Białystok, Poland, grant number: SUB/1/DN/21/004/1143.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Ethics Committee of Medical University of Białystok (approval number: R-I-002/393/2016, APK.002.464.2020).

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

**Data Availability Statement:** The datasets generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

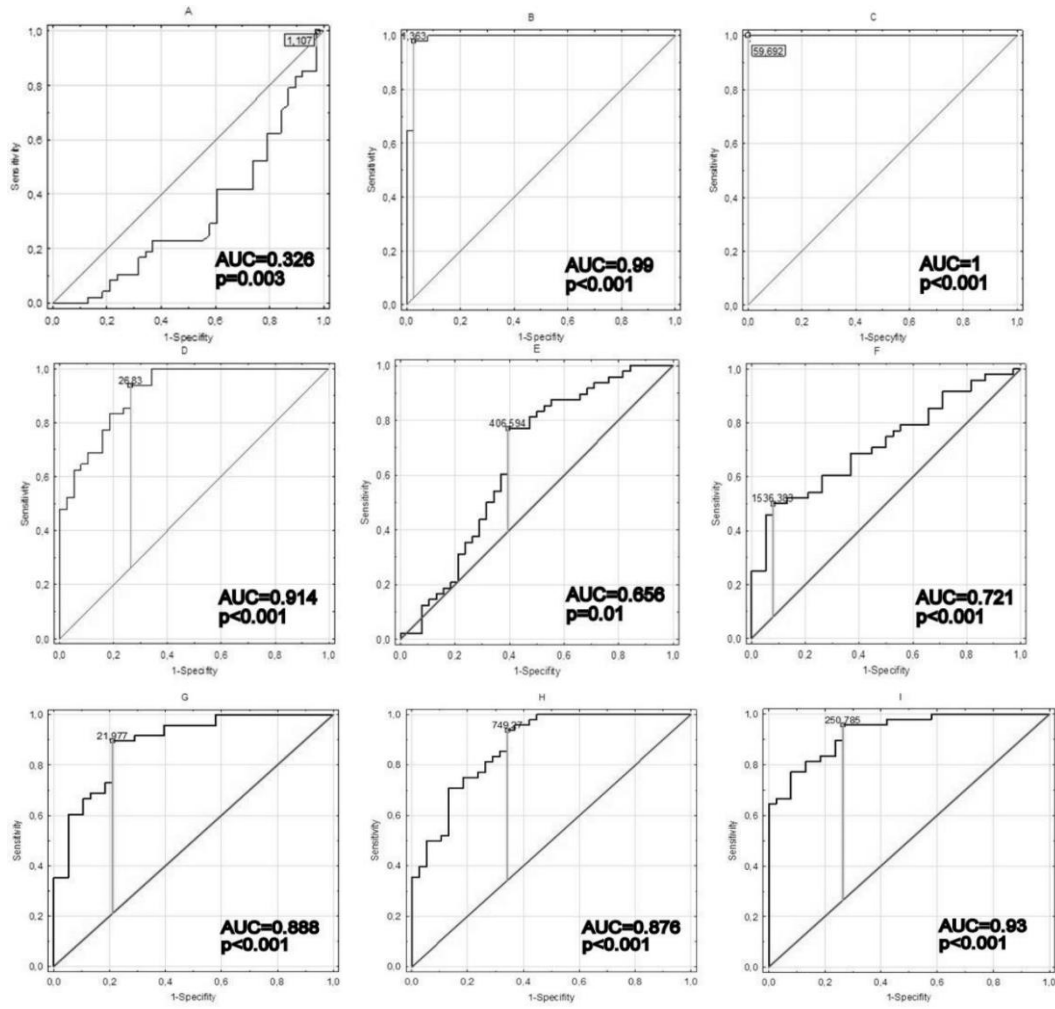
**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Chamorro, C.C.; Arteaga, P.; Paredes, C.; Bravo, N.C.; Giraldo, C.V.; Betancourt, G.C.; Márquez, Z.; Torres, C.R. Cholelithiasis and associated complications in pediatric patients. *Cir. Pediatr.* **2020**, *33*, 172–176.
- Murphy, P.B.; Vogt, K.N.; Winick-Ng, J.; McClure, J.A.; Welk, B.; Jones, S.A. The increasing incidence of gallbladder disease in children: A 20year perspective. *J. Pediatr. Surg.* **2016**, *51*, 748–752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Agrawal, V.; Tiwari, A.; Sharma, D.; Agrawal, R. Etiology-Based Decision-making Protocol for Pediatric Cholelithiasis. *Indian Pediatr.* **2021**, *58*, 729–732. [[CrossRef](#)]
- Zdanowicz, K.; Białokoz-Kalinowska, I.; Lebensztejn, D.M. Non-alcoholic fatty liver disease in non-obese children. *Hong Kong Med. J.* **2020**, *26*, 459–462. [[CrossRef](#)]
- Sarrami, M.; Ridley, W.; Nightingale, S.; Wright, T.; Kumar, R. Adolescent gallstones—Need for early intervention in symptomatic idiopathic gallstones. *Pediatr. Surg. Int.* **2019**, *35*, 569–574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hu, H.; Shao, W.; Liu, Q.; Liu, N.; Wang, Q.; Xu, J.; Zhang, X.; Weng, Z.; Lu, Q.; Jiao, L.; et al. Gut microbiota promotes cholesterol gallstone formation by modulating bile acid composition and biliary cholesterol secretion. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 252. [[CrossRef](#)]
- Krawczyk, M.; Niewiadomska, O.; Jankowska, I.; Jankowski, K.; Więckowski, S.; Lebensztejn, D.; Więcek, S.; Gozdowska, J.; Kułaga, Z.; Weber, S.N.; et al. Common variant p.D19H of the hepatobiliary sterol transporter ABCG8 increases the risk of gallstones in children. *Liver Int.* **2022**, *42*, 1585–1592. [[CrossRef](#)]
- Markowski, A.R.; Błachnio-Zabielska, A.U.; Guzińska-Ustymowicz, K.; Markowska, A.; Pogodzińska, K.; Roszczyc, K.; Zinczuk, J.; Zabielski, P. Ceramides Profile Identifies Patients with More Advanced Stages of Colorectal Cancer. *Biomolecules* **2020**, *10*, 632. [[CrossRef](#)]
- Filimoniuk, A.; Błachnio-Zabielska, A.; Imierska, M.; Lebensztejn, D.M.; Daniluk, U. Sphingolipid Analysis Indicate Lactosylceramide as a Potential Biomarker of Inflammatory Bowel Disease in Children. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1083. [[CrossRef](#)]
- Kurz, J.; Parnham, M.J.; Geisslinger, G.; Schiffmann, S. Ceramides as Novel Disease Biomarkers. *Trends Mol. Med.* **2019**, *25*, 20–32. [[CrossRef](#)]
- Zdanowicz, K.; Ryzko, J.; Bobrus-Chociej, A.; Wojtkowska, M.; Lebensztejn, D.M. The role of chemerin in the pathogenesis of cholelithiasis in children and adolescents. *J. Paediatr. Child Health* **2021**, *57*, 371–375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zdanowicz, K.; Bobrus-Chociej, A.; Lebensztejn, D.M. Chemerin as Potential Biomarker in Pediatric Diseases: A PRISMA-Compliant Study. *Biomedicine* **2022**, *10*, 591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bielawski, J.; Pierce, J.S.; Snider, J.; Rembiesa, B.; Szulc, Z.M.; Bielawska, A. Comprehensive Quantitative Analysis of Bioactive Sphingolipids by High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Methods Mol. Biol.* **2009**, *579*, 443–467. [[CrossRef](#)]
- Lee, B.J.; Kim, J.S.; Kim, B.K.; Jung, S.J.; Joo, M.K.; Hong, S.G.; Kim, J.S.; Kim, J.H.; Yeon, J.E.; Park, J.; et al. Effects of sphingolipid synthesis inhibition on cholesterol gallstone formation in C57BL/6j mice. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2010**, *25*, 1105–1110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kim, H.J.; Kim, J.S.; Oh, S.; Yoo, H.S. Inhibition of Ceramide Decreased the Expression of ATP-Binding Cassette Transporter G5/8 mRNA in an Animal Model of Cholesterol Gallstone. *Dig. Dis.* **2017**, *35*, 439–543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Platania, C.B.M.; Cas, M.D.; Cianciolo, S.; Fidilio, A.; Lazzara, F.; Paroni, R.; Pignatello, R.; Stretto, E.; Ghidoni, R.; Drago, F.; et al. Novel ophthalmic formulation of myriocin: Implications in retinitis pigmentosa. *Drug Deliv.* **2019**, *26*, 237–243. [[CrossRef](#)]
- Aye, I.L.; Singh, A.T.; Keelan, J.A. Transport of lipids by ABC proteins: Interactions and implications for cellular toxicity, viability and function. *Chem. Biol. Interact.* **2009**, *180*, 327–339. [[CrossRef](#)]
- Duan, R.D. Alkaline sphingomyelinase: An old enzyme with novel implications. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1761*, 281–291. [[CrossRef](#)]
- Wasilewska, N.; Bobrus-Chociej, A.; Harasim-Symbor, E.; Tarasów, E.; Wojtkowska, M.; Chabowski, A.; Lebensztejn, D.M. Increased serum concentration of ceramides in obese children with nonalcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis.* **2018**, *17*, 216. [[CrossRef](#)]
- Chang, Y.; Noh, Y.H.; Suh, B.S.; Kim, Y.; Sung, E.; Jung, H.S.; Kim, C.W.; Kwon, M.J.; Yun, K.E.; Noh, J.W.; et al. Bidirectional Association between Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Gallstone Disease: A Cohort Study. *J. Clin. Med.* **2018**, *7*, 458. [[CrossRef](#)]
- Arrese, M.; Cortés, V.; Barrera, F.; Nervi, F. Nonalcoholic fatty liver disease, cholesterol gallstones, and cholecystectomy: New insights on a complex relationship. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **2018**, *34*, 90–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. Maldonado-Hernández, J.; Saldaña-Dávila, G.E.; Piña-Aguero, M.I.; Núñez-García, B.A.; López-Alarcón, M.G. Association between Plasmatic Ceramides Profile and AST/ALT Ratio: C14:0 Ceramide as Predictor of Hepatic Steatosis in Adolescents Independently of Obesity. *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *2017*, 3689375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Koivusalo, A.; Pakarinen, M.; Gylling, H.; Nissinen, M.J. Relation of cholesterol metabolism to pediatric gallstone disease: A retrospective controlled study. *BMC Gastroenterol.* **2015**, *15*, 74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Koivusalo, A.I.; Pakarinen, M.P.; Sittiwet, C.; Gylling, H.; Miettinen, T.A.; Miettinen, T.E.; Nissinen, M. Cholesterol, non-cholesterol sterols and bile acids in paediatric gallstones. *Dig. Liver Dis.* **2010**, *42*, 61–66. [[CrossRef](#)]
25. Lopes-Virella, M.F.; Baker, N.L.; Hunt, K.J.; Hammad, S.M.; Arthur, J.; Virella, G.; Klein, R.L. Glycosylated sphingolipids and progression to kidney dysfunction in type 1 diabetes. *J. Clin. Lipidol.* **2019**, *13*, 481–491.e1. [[CrossRef](#)]
26. Chen, G.C.; Chai, J.C.; Yu, B.; Michelotti, G.A.; Grove, M.L.; Fretts, A.M.; Daviglius, M.L.; Garcia-Bedoya, O.L.; Thyagarajan, B.; Schneiderman, N.; et al. Serum sphingolipids and incident diabetes in a US population with high diabetes burden: The Hispanic Community Health Study/Study of Latinos (HCHS/SOL). *Am. J. Clin. Nutr.* **2020**, *112*, 57–65. [[CrossRef](#)]
27. Apostolopoulou, M.; Gordillo, R.; Koliaki, C.; Gancheva, S.; Jelenik, T.; De Filippo, E.; Herder, C.; Markgraf, D.; Jankowiak, F.; Esposito, I.; et al. Specific Hepatic Sphingolipids Relate to Insulin Resistance, Oxidative Stress, and Inflammation in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Diabetes Care* **2018**, *41*, 1235–1243. [[CrossRef](#)]
28. Kim, Y.; Oh, C.M.; Ha, E.; Park, S.K.; Jung, J.Y.; Ryoo, J.H. Association between metabolic syndrome and incidence of cholelithiasis in the Korean population. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2021**, *36*, 3524–3531. [[CrossRef](#)]
29. Lv, J.; Yu, C.; Guo, Y.; Bian, Z.; Yang, L.; Chen, Y.; Li, S.; Huang, Y.; Fu, Y.; He, P.; et al. Gallstone Disease and the Risk of Type 2 Diabetes. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 15853. [[CrossRef](#)]
30. Haus, J.M.; Kashyap, S.R.; Kasumov, T.; Zhang, R.; Kelly, K.R.; DeFronzo, R.A.; Kirwan, J.P. Plasma ceramides are elevated in obese subjects with type 2 diabetes and correlate with the severity of insulin resistance. *Diabetes* **2009**, *58*, 337–343. [[CrossRef](#)]
31. Wigger, L.; Cruciani-Guglielmacci, C.; Nicolas, A.; Denom, J.; Fernandez, N.; Fumeron, F.; Marques-Vidal, P.; Ktorza, A.; Kramer, W.; Schulte, A.; et al. Plasma Dihydroceramides Are Diabetes Susceptibility Biomarker Candidates in Mice and Humans. *Cell Rep.* **2017**, *18*, 2269–2279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Hilvo, M.; Salonurmi, T.; Havulinna, A.S.; Kauhanen, D.; Pedersen, E.R.; Tell, G.S.; Meyer, K.; Teeriniemi, A.-M.; Laatikainen, T.; Jousilahti, P.; et al. Ceramide stearic to palmitic acid ratio predicts incident diabetes. *Diabetologia* **2018**, *61*, 1424–1434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Zalewska, A.; Maciejczyk, M.; Szulimowska, J.; Imierska, M.; Błachnio-Zabielska, A. High-Fat Diet Affects Ceramide Content, Disturbs Mitochondrial Redox Balance, and Induces Apoptosis in the Submandibular Glands of Mice. *Biomolecules* **2019**, *9*, 877. [[CrossRef](#)]
34. Ichi, I.; Takashima, Y.; Adachi, N.; Nakahara, K.; Kamikawa, C.; Harada-Shiba, M.; Kojo, S. Effects of Dietary Cholesterol on Tissue Ceramides and Oxidation Products of Apolipoprotein B-100 in ApoE-Deficient Mice. *Lipids* **2007**, *42*, 893–900. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Tippetts, T.S.; Holland, W.L.; Summers, S.A. Cholesterol—the devil you know; ceramide—the devil you don’t. *Trends Pharmacol. Sci.* **2021**, *42*, 1082–1095. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Zabielski, P.; Daniluk, J.; Hady, H.R.; Markowski, A.R.; Imierska, M.; Górski, J.; Błachnio-Zabielska, A.U. The effect of high-fat diet and inhibition of ceramide production on insulin action in liver. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 1851–1861. [[CrossRef](#)]

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jcm11195613/s1>, Figure S1: The ROC analysis.





Review

# The Etiology of Cholelithiasis in Children and Adolescents—A Literature Review

Katarzyna Zdanowicz <sup>1,\*</sup>, Jaroslaw Daniluk <sup>2</sup>, Dariusz Marek Lebensztejn <sup>1</sup> and Urszula Daniluk <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Pediatrics, Gastroenterology, Hepatology, Nutrition and Allergology, Medical University of Białystok, 15-274 Białystok, Poland

<sup>2</sup> Department of Gastroenterology and Internal Medicine, Medical University of Białystok, 15-276 Białystok, Poland

\* Correspondence: kazdanowicz@gmail.com; Tel.: +48-857450710

**Abstract:** The incidence of gallstone disease has increased in recent years. The pathogenesis of cholelithiasis is not fully understood. The occurrence of the disease is influenced by both genetic and environmental factors. This article reviews the literature on cholelithiasis in children, with the exception of articles on hematological causes of cholelithiasis and cholelithiasis surgery. The aim of this review is to present the latest research on the pathogenesis of gallstone disease in children. The paper discusses the influence of all factors known so far, such as genetic predisposition, age, infections, medications used, parenteral nutrition, and comorbidities, on the development of gallstone disease. The course of cholelithiasis in the pediatric population is complex, ranging from asymptomatic to life-threatening. Understanding the course of the disease and predisposing factors can result in a faster diagnosis of the disease and administration of appropriate treatment.

**Keywords:** gallstones; cholelithiasis; children; pathogenesis



**Citation:** Zdanowicz, K.; Daniluk, J.; Lebensztejn, D.M.; Daniluk, U. The Etiology of Cholelithiasis in Children and Adolescents—A Literature Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 13376. <https://doi.org/10.3390/ijms232113376>

Academic Editor: Pavel Strnad

Received: 4 October 2022

Accepted: 31 October 2022

Published: 2 November 2022

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



**Copyright:** © 2022 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

The broad spectrum of biliary tract disease includes the most often diagnosed gallstone disease (cholelithiasis), cholecystitis, or biliary dyskinesia [1,2]. Gallstones are formed mainly in the gallbladder, less often in intrahepatic or extrahepatic bile ducts. More patients with cholelithiasis have no obvious symptoms. Symptomatic patients presented with dyspepsia and biliary colic caused mainly by obstruction of the cystic duct [3]. Gallstones may lead to serious complications such as cholecystitis, acute cholangitis, and pancreatitis [1]. In recent years, the prevalence of cholelithiasis has risen and ranges from 1.9% to 4% in children [4,5]. This increase may be caused by the worrying problem of childhood obesity and the widespread use of ultrasound [6–8]. Simultaneously, in pediatric patients, the number of performed cholecystectomies rose by 213% over a 9-year period [9]. Additionally, cases of fetal cholelithiasis were also described [10,11]. Schwab et al., in approximately 200,000 obstetric sonograms taken between 1996 and 2019, found 34 fetal cholelithiasis. The median gestational age at diagnosis was 34.7 weeks, and the majority of cases were female (56%) [10]. Troyano-Luque et al. reported two cases of fetal cholelithiasis. In one of them, cholelithiasis was diagnosed 6 weeks after 16 days of ceftriaxone therapy in maternal Lyme disease [11]. The presence of gallstones in fetuses may lead researchers to look for genetic causes of the disease.

Based on their composition, gallstones are classified into pigment stones, cholesterol stones, and mixed stones. Pigment stones are mainly observed in hemolytic diseases, and their incidence remains stable [9]. Cholesterol gallstones are caused by genetic and environmental factors leading to an elevated concentration of cholesterol in the bile.

Cholesterol plays a structural and metabolic role. It is a component of membrane cells, steroid hormones, and a bile acid precursor. The level of cholesterol in the human body depends on endogenous de novo synthesis, enterohepatic recirculation, and dietary

intake [12]. The liver is an organ that is significantly involved in cholesterol metabolism through its synthesis mediated by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR), cholesterol uptake by receptors (low-density lipoprotein receptors (LDLR), the prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1), the scavenger receptor class B member 1 (SRB1), release of lipoproteins into the bloodstream, conversion of cholesterol into bile acids or cholesterol excretion into bile. Cholesterol is secreted by adenosine triphosphate protein binding cassette transporters G5/G8 (ABC G5/G8) to the biliary tract [13]. As a hydrophilic substance, it is solubilized in mixed micelles and vesicles that consist of bile acids and phosphatidylcholine [14].

Intestinal absorption is relevant for maintaining cholesterol balance. Cholesterol is absorbed by the Niemann–Pick C1-like 1 (NPC1L1) transporter, which, together with ABCG5 / G8, is located in the enterocyte brush border membrane. Intracellular cholesterol is esterified by the acetyl-CoA cholesterol acyltransferase 2 (ACAT-2) and incorporated along with triglycerides, phospholipids, and apolipoprotein B-48 into chylomicrons. Next, through the lymphatic system and bloodstream, the chylomicron remnants may be absorbed by the liver. Additionally, ABCG5/G8 proteins promote the active efflux of non-esterified cholesterol and plant sterols from the enterocytes into the intestinal lumen for fecal excretion [15].

In hepatocytes, cholesterol is covered in bile acids through classical and alternative pathways. The first is the dominant one, mediated by  $7\alpha$ -hydroxylase (CYP21A1). The alternative pathway is controlled by sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) and is responsible for the production of 9% to 25% of bile acids. Chenodeoxycholic acid has produced both ways, and cholic acid is only synthesized in a classic way. Newly produced bile acids, in conjunction with glycine and taurine, are pumped out by the ATP-binding cassette, sub-family B member 11 (ABC B11) [16].

Bile-binding acids are reabsorbed by the apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT) in the terminal ileum and then secreted into the portal vein by the organic solute transporter  $\alpha/\beta$  (OST  $\alpha/\beta$ ). In the liver, conjugated bile acids return to the liver via Na<sup>+</sup>/taurocholic acid cotransport polypeptide (NTCP). Members of the Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP) family are responsible for the uptake of unconjugated or sulfated bile acids. Enterohepatic circulation provides approximately 95% of bile acid return [16,17].

In the human body, cholesterol synthesis equals its secretion as bile acid. However, it may be disturbed by food intake and diseases [17]. The state of homeostasis is regulated by the expression of genes responsible for cholesterol transport and metabolism, transcription factors, and posttranscriptional regulatory circuits. The farnesoid X receptor (FXR) and the liver X receptors (LXRs) are nuclear receptors that play an important role in the regulation of genes encoding ABC transporters [18]. Lowering cellular cholesterol activates the endoplasmic reticulum membrane-bound transcription factor, sterol regulatory element-binding protein isoform 2 (SREBP-2), leading to enhanced cholesterol uptake and biosynthesis through regulation of genes encoding low-density lipoprotein (LDL) receptor and HMGR. On the contrary, an increase in the level of cellular cholesterol promotes (LXRs) transcription factors to enhanced cholesterol efflux from the liver [19]. The expression of CYP7A1 in the liver is regulated by the fibroblast growth factor 19 (FGF19). FGF19 is activated by bile acid in the ileum mediated by the action of ASBT. The inhibition of ASBT causes an increase in FGF19 levels and the synthesis of bile acids [12].

The risk factors for the development of cholelithiasis include age, gender, body weight, comorbidities, diet, and physical activity [20]. Although these factors are recognized in the adult population, they are modified in children. The formation of cholesterol gallstones is triggered by excessive cholesterol concentration in bile. Defects responsible for this condition are genes, hypersecretion of liver cholesterol, rapid phase transitions of cholesterol in bile, dysmotility of the gallbladder, and intestinal factors [20].

The aim of the review is to present the latest research on the pathogenesis of cholelithiasis in children. To date, many studies on the development and incidence of gallstone disease in adults have been published. To the best of our knowledge, there are no reviews

of the pathomechanism of cholelithiasis development in children. A review of MEDLINE/PubMed data was carried out in August 2022, using the phrase 'cholelithiasis' or 'gallstones' in combination with 'children,' 'adolescents,' or 'pediatrics.' Screening of the titles and abstracts was independently performed by two investigators. The studies included in this analysis fulfilled the inclusion criteria: they explored the etiology of cholelithiasis in pediatric patients and had available full texts. We excluded from the analysis articles on hematological causes of gallstone disease and surgical procedures for cholelithiasis. The selected papers were discussed with all authors.

## 2. Review

### 2.1. Genes

A Swedish twin study showed that an inherited predisposition is responsible for 25% of the overall risk of developing gallstones [21]. Lithogenic genes 1 and 2 (*Lith1* and *Lith2*), playing a role in liver cholesterol secretion and regulating bile flow, have been described in murine models. Their human counterparts are *ABCG5* and *ABCG8* [17]. A recent study of 214 children with cholelithiasis showed the presence of the lithogenic *ABCG8* allele p.D19H in 14.9% of children, which was more frequently reported compared to children and adults without gallstones. Additionally, carriers of one copy of the lithogenic variant p.D19H were also at higher risk of the development of gallstones. Increased susceptibility to the formation of cholesterol stones is associated with abnormal cholesterol metabolism resulting from its increased transport or lower intestinal absorption in combination with increased cholesterol synthesis [22]. MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs that regulate gene expression. Recent studies have shown that miRNA-223, can prevent the development of gallstones in mice on a lithogenic diet by directly affecting the *ABCG5* and *ABCG8* transporters. To date, no studies have been published assessing the effect of miRNA-223 on the development of gallstone disease in humans [23].

Krawczyk et al. also found that *NPC1L1* rs217434 polymorphism also was connected with the occurrence of gallstones (only in comparison with healthy adults) and lower campesterol: desmosterol ratio. However, the *UGT1A1* genotype did not differ between children with and without cholelithiasis [22].

Nissinen et al. determined the D19H polymorphism of the *ABCG8* gene, serum cholesterol, non-cholesterol sterols, and lipids in 66 children affected by gallstones in later life and 126 children from the control group. In the first group, 22.7% of patients carried the *ABCG8* 19H allele, and in the control group, this percentage was 19.0%. A decrease in phytosterols was observed in patients with the lithogenic variant. According to this study, low phytosterols in childhood promoted the occurrence of cholelithiasis in adults in carriers of the risk variant 19H of the *ABCG8* gene. What is more, *NPC1L1* variants: -18C > A (rs41279633) and V1296V T > C (rs2174340) had a minor influence on non-cholesterol sterols [24].

In another genetic study, the *ABCB4* gene (encoding a multi-drug resistance protein 3 (MDR3)) was evaluated in the pathogenesis of idiopathic gallstones. The mutation of the *ABCB4* may lead to low-phospholipid associated cholelithiasis (LPAC) defined by the presence of symptomatic and recurrent cholelithiasis in young patients with abnormal ultrasound of the liver, progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC) type 3, low phospholipid-associated cholelithiasis, and intrahepatic cholestasis of pregnancy [25]. In a retrospective analysis of 26 pediatric patients with genetically proven mutations of the *ABCB4* gene, gallstone disease was diagnosed in 15% of patients, but in adults, this level was higher (67% of patients) [26]. In another study involving 35 children with idiopathic gallstones meeting the clinical criteria of LPAC, in only one case, a possibly pathogenic variant c.2318G > T of the *ABCB4* gene was found. This phenomenon may be explained by sexual immaturity, which may affect the course of LPAC [27]. In an analysis by Krawczyk et al., *ABCB4* c.504C > T and *ABCB4* c.711A > T alleles were not associated with the development of cholelithiasis [22].



The etiology of gallstones may include NTCP deficiency, which is encoded by the *SLC10A1* gene. Dong et al., in a group of 13 children with mutations of the *SLC10A1* gene, in one case (male, 10 months old) cholelithiasis was diagnosed [28]. Similarly, Mao et al. described in two infants with *NTCP* p.Ser267Phe variant the presence of cholelithiasis. Interestingly, *NTCP* knockout (*SLC10A1*<sup>-/-</sup>) mice develop multiple abnormal phenotypes of the gallbladder and hypercholanemia, but not cholelithiasis [29]. This data may suggest that abnormalities in bile acid metabolism caused by *NTCP* deficiency predispose to gallstone formation.

In a study of cryptogenic cholelithiasis, 17% of cases had juvenile cholelithiasis. Further genetic analyses revealed in two young adult's pathogenic mutations in the *ATP8B1* and *ABCB11* genes. However, multivariate analysis did not show that cholelithiasis was an independent factor associated with cholestasis-causing mutations [30].

In pediatric patients with cholesterol and pigment gallstones, RNA expression of *ABCG5* and *ABCG8* measured by quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) showed increased levels in patients with cholelithiasis than in healthy controls. This increase was similar in patients' cholesterol and pigment stones. However, RNA expression of *FXR*, ATP-binding cassette C2 (*ABCC2*), and *ABCB4* transporters did not differ significantly between the study and control groups. Moreover, patients with cholesterol stones had decreased plant sterols (campesterol and sitosterol), and increased cholesterol precursors compared not only to healthy controls but also to children with pigment stones. Both findings explain the higher content in cholesterol cholelithiasis [31]. Similarly, in another study, plant sterols, markers of cholesterol absorption, were lower than in patients with black pigment stones [32]. Comparatively low levels of plant sterols and cholestanol have been observed in children who developed gallstones in adulthood. This observation can be used as prognostic marker of the development of gallstone disease [33].

The genetic factors that have been studied in pediatric patients with cholelithiasis are listed in Table 1.

**Table 1.** The genetic factors analyzed in the development of cholesterol gallstone disease were reported in children on the basis of the above-mentioned research.

Genetic Factor	Reference
<i>ABCG5</i>	[17,23,31]
<i>ABCG8</i>	[17,23,31]
<i>ABCG8</i> variant p.D19H	[17,22,24]
<i>NPC1L1</i> rs217434 polymorphism	[22]
<i>UGT1A1</i>	[22]
<i>ABCB4</i>	[26,31]
<i>ABCB4</i> variant c.2318G > T	[27]
<i>ABCB4</i> variant c.504C > T	[22]
<i>ABCB4</i> variant c.711A > T	[22]
<i>SLC10A1</i>	[28]
<i>SLC10A1</i> variant p.Ser267Phe	[29]
<i>ATP8B1</i>	[30]
<i>ABCB11</i>	[30]
<i>ABCC2</i>	[31]

## 2.2. Proteins and Lipids

There is evidence of the involvement of adipokines and hepatokines in the development of cholelithiasis in children. Higher levels of chemerin, retinol-binding protein

4 (RBP-4), and fibroblast growth factor 21 (FGF-21) have been observed in children with cholelithiasis. Taking into consideration the influence of adipose tissue in lean children, only chemerin was significantly increased in patients with cholelithiasis [34]. Based on the literature, chemerin may be both a pro-inflammatory and anti-inflammatory molecule [35]. The influence of other markers of inflammation was observed by Denisova et al. [36]. In this study, increased expression of various interleukins (IL-1, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, and IL-17A) was observed in calculous cholecystitis.

The first study on serum lipid profile in patients with gallstone disease was recently published. The authors showed that the serum values of total cholesterol (TC), sphinganine (SPA), ceramides: C14:0-Cer, C16:0-Cer, C18:1-Cer, C18:0-Cer, C20:0-Cer, C24:1-Cer and lactosylceramides: C16:0-LacCer, C18:0-LacCer, C18:1-LacCer, C24:0-LacCer, C24:1-LacCer differed significantly between patients with and without gallstones. In the generalized multivariate linear model, after taking into account age, sex, obesity, TC, and TG levels, the best differentiating sphingolipids for gallstone disease were the reduced values of SPA, C14:0-Cer, C16:0-Cer, C24:1-LacCer, C24:0-LacCer and elevated concentrations of C20:0-Cer, C24:1-Cer, C16:0-LacCer and C18:1-LacCer [37]. These results suggest that serum sphingolipids may be potential biomarkers in patients with gallstone disease.

### 2.3. Microbiome

The microbiome of the human digestive tract plays a relevant role in human health, such as nutrition and metabolism functions, preventing the invasion of infectious agents or enhancing intestinal integrity [38]. In the adult study, increment of the intestinal bacterial phylum Proteobacteria and decrement of *Faecalibacterium* spp., *Lachnospira* spp., and *Roseburia* spp. were observed in gallstone patients [39]. We did not find similar studies in the pediatric population. However, infection factors may be associated with the development of cholelithiasis. In a study of adults and children, the overall adjusted odds ratio of gallbladder stones for patients with cholelithiasis and *Clonorchis sinensis* infection compared to non-infected individuals was 2.2 (95% CI: 0.9–5.6) [40]. Another study suggests a potential connection between calcium carbonate gallbladder stones and *C. sinensis* infection [31].

### 2.4. Diet, Drugs, and Toxins

Food intake has been indicated as a potential risk factor for cholelithiasis. To the best of our knowledge, no studies describing the influence of diet on the occurrence of gallstone disease in children have been published so far. However, considering the effect of diet on the incidence of cholelithiasis in adults may be of similar importance, especially in Western countries. The increased fat intake with highly refined sugars, fructose, and low fiber contents predisposes to the development of gallstones. These eating habits lead to increased biliary cholesterol concentrations and hypertriglyceridemia-induced secretion of gallbladder mucin [41]. It is important to promote the principles of a balanced diet among children and adolescents. It seems likely that avoiding fast food and sugary drinks could help reduce the incidence of gallstone disease in children.

Parenteral nutrition is often associated with intestinal failure-associated liver disease (IFALD), including elevated markers of cholestasis, hepatic fibrosis, biliary cirrhosis, portal hypertension, and cholelithiasis. The pathogenesis of IFALD is complex and depends on components of parenteral nutrition solution and active factors absorbed from the intestine [42]. In pediatric studies, total parenteral nutrition was a risk factor in 10–17.6% of cholelithiasis cases [43,44]. According to Pichler et al., younger age at the beginning of parenteral nutrition and the primary diagnosis of motility disorder with ileostomy fashioned were predictors for gallstones. On the other hand, the lower incidence of gallstones was associated with modifications of lipid emulsions (containing less soya and added olive and/or medium-chain triglyceride (MCT) and fish oil when compared with the use of pure soya lipid) [45]. The total resolution of gallstones in one patient and a decrease in the size of gallstones in the other patient were observed during using SMOF lipid (a complex mixed emulsion of 20% lipid containing 30% soybean oil, 30% MCT, 25%

monounsaturated fatty acids, and 15% fish oil) [46]. The lithogenic role of a ketogenic diet, which is a high-fat, low-carbohydrate, and moderate-protein diet, has been described [47].

Moreover, abnormal drug concentration in the biliary tract may promote the development of cholelithiasis. Ceftriaxone, the third generation of cephalosporin, is excreted into the biliary tract, and due to the drug interaction with calcium, it may lead to calcium-ceftriaxone precipitation [48]. Ceftriaxone-associated cholelithiasis has been observed with varying frequency (4.1–27.3%) in different studies [11,43,44,49,50]. The mean time of dissolution of stone in this group of patients was 9–12 months [44].

Another group at risk of cholelithiasis are patients taking long-term octreotide, a somatostatin analog, which may increase the proportion of biliary deoxycholic acid and inhibit gallbladder emptying. Gallstones or biliary deposits have been observed in nearly 33% of children with congenital hyperinsulinism during octreotide therapy. The occurrence of gallbladder pathology was independent of the dose and median age of initiation of octreotide therapy [51]. A retrospective analysis of childhood cancer survivors found that exposure to high-dose (>750 mg/m<sup>2</sup>) platinum chemotherapy, vinca alkaloid chemotherapy, or total body irradiation increased the risk of cholecystectomy in later life. Moreover, compared with healthy siblings, patients after cancer treatment had an approximately 30% higher risk of cholecystectomy [52]. In addition, prenatal exposure to toxins or drugs may affect gallbladder disorders in the offspring. Troisi et al. showed prenatal diethylstilbestrol (DES) exposure, a non-steroidal estrogen analog, was not associated with the risk of gallbladder disease overall or in sex-specific groups [53]. Contrary to this observation, Le et al. observed an elevated risk of gallstones among participants who were prenatally exposed to maternal smoking, especially among females and populations with low BMI [54].

### 2.5. Gender

Epidemiological studies have found that cholelithiasis is more common in adult women than men. A female predominance was also evident in most pediatric studies [9,43,44,50,55–57]. In only one study conducted in northern Iran, the majority of patients were boys (59.1%) [49]. Serdaroglu et al. evaluated the sex distribution by age groups and noted a higher incidence of gallstones in boys under 2 years of age and in girls over 10 years of age [44]. Tuna et al. observed a significantly higher age of girls than boys with cholelithiasis [50]. In both studies [44,50], no differences were found in terms of sex in the occurrence of symptoms. The impact of the higher incidence of cholelithiasis among girls may be related to puberty and the production of hormones, especially estrogen. Estrogens bound to estrogen receptors (ERs) in the liver and increase the secretion of cholesterol into the bile, promoting the formation of gallstones. Moreover, oral contraceptive use by girls may predispose to a more frequent occurrence of cholelithiasis.

### 2.6. Obesity

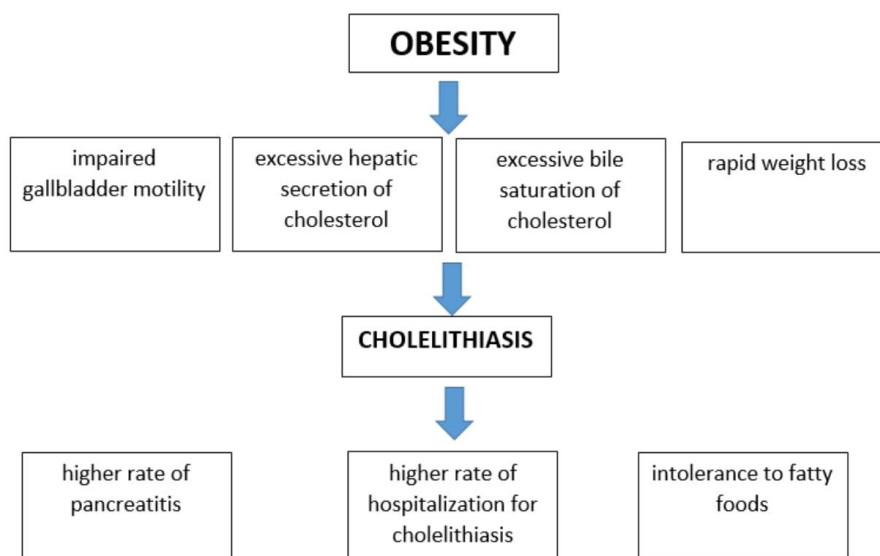
Obesity has been found to increase the risk of cholelithiasis development due to impaired gallbladder motility, excessive hepatic secretion, and bile saturation of cholesterol [58]. In the analysis of Frybova et al., among children hospitalized for laparoscopy, patients with cholelithiasis and choledocholithiasis, the mean BMI was significantly higher than in the control group without biliary stones on abdominal ultrasound [57]. Moreover, over a 9-year time period, the number of children with cholesterol cholelithiasis rose by 216%. Moreover, the mean BMI in children with cholesterol stones was higher than in children with hemolytic stones and biliary dyskinesia [9]. In the 20-year follow-up, there was an increase in the incidence of cholesterol gallstones in children from 27.3 to 70.6% and an increase in the mean BMI from 19.2 to 20.6 kg/m<sup>2</sup> [56].

In cross-sectional study, a stronger association between obesity and gallstones was observed in girls than in boys [59]. Nunes et al. noticed intolerance to fatty foods in obese and overweight children with cholelithiasis. Children with abnormal BMI without cholelithiasis were less likely to complain of intolerance to dietary fats [60]. In another

report of patients with symptomatic gallstone disease, an increase in obesity rate prevalence among children and adolescents, and there was an increase in hospitalization for cholelithiasis. Additionally, pediatric patients hospitalized with cholelithiasis were approximately six times more likely to be obese than children hospitalized with appendicitis [61].

Increased predisposition to the development of cholelithiasis in obese children may result from higher synthesis and excretion of cholesterol into the bile and impaired motility of the gallbladder [58,62]. Obesity in children also may predispose to the development of gallstone complications. A higher rate of pancreatitis in the pediatric population is associated with the more frequently observed obesity and cholelithiasis in children [63]. Based on the results of cross-sectional analysis, children with gallstone pancreatitis had statistically higher body weight percentile for age than patients with other causes of pancreatitis [64].

On the other hand, rapid weight loss (>1.5 kg/week) and a low-calorie diet may also predispose to gallstone formation due to the accelerated elimination of cholesterol, which over-saturates the bile [8]. In a study of obese children, 5.9% of children developed cholelithiasis after losing more than 10% of their body weight following a 6-month lifestyle change (physical activity, diet modification) [65]. In multivariate analysis, the decrease in BMI z-score and baseline BMI z-score correlated with the occurrence of gallstones. Interestingly, a rapid decrease in total cholesterol was associated with a higher risk of developing cholelithiasis. During an average of 4.8 years of follow-up, cholecystectomy was performed in 22% of children (two children with gallstones at baseline and three with gallstones developed during the program) with cholelithiasis, and no serious complications related to gallstone disease were observed [65]. Figure 1 presents the pathomechanism of the development of gallstone disease in obese pediatric patients and its influence on the course of cholelithiasis in obese children.



**Figure 1.** Influence of obesity on the development of gallstone disease and its complications in children.

### 3. Conclusions

The increasing prevalence of cholelithiasis in children contributes to the growing interest in this disease. The incidence of gallstone disease in children is influenced by both genetic and environmental factors, such as exposure to certain drugs, e.g., ceftriaxone

or octreotide. In addition, the presence of predisposing diseases can contribute to the formation of gallstones (such as primary sclerosing cholangitis [66], Wilson disease [67], renal stones [68], congenital nephrotic syndrome [69], hypothyroidism [70], Down syndrome [71,72], cystic fibrosis [73], Gaucher disease [74,75]). In recent years, there have been many studies on gallstone disease in children. There is still a lack of data on prophylaxis and treatment that would reduce the incidence of cholelithiasis in pediatric patients. It is important to take steps to reduce the incidence of obesity in children and adolescents. It is worth mentioning that the rapid reduction in BMI also promotes the formation of gallstones. Further studies are needed and may lead to the development of methods for the prevention of gallstones in pediatric patients.

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

**Funding:** This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

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

## References

- Rothstein, D.H.; Harmon, C.M. Gallbladder disease in children. *Semin. Pediatr. Surg.* **2016**, *25*, 225–231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zdanowicz, K.; Kowalczyk-Krystoń, M.; Wojtkowska, M.; Zalewska-Szajda, B.; Lebensztejn, D.M. Gallbladder duplication in a child—Case report. *Pediatr. Pol.—Pol. J. Paediatr.* **2019**, *94*, 263–265. [[CrossRef](#)]
- Campbell, S.; Richardson, B.; Mishra, P.; Wong, M.; Samarakkody, U.; Beasley, S.; Pringle, K.; Morreau, P. Childhood cholecystectomy in New Zealand: A multicenter national 10 year perspective. *J. Pediatr. Surg.* **2016**, *51*, 264–267. [[CrossRef](#)]
- Chamorro, C.C.; Arteaga, P.; Paredes, C.; Bravo, N.C.; Giraldo, C.V.; Betancourt, G.C.; Márquez, Z.; Torres, C.R. Cholelithiasis and associated complications in pediatric patients. *Cir. Pediatr.* **2020**, *33*, 172–176.
- Murphy, P.B.; Vogt, K.N.; Winick-Ng, J.; McClure, J.A.; Welk, B.; Jones, S.A. The increasing incidence of gallbladder disease in children: A 20year perspective. *J. Pediatr. Surg.* **2016**, *51*, 748–752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jeanty, C.; Derderian, S.C.; Courtier, J.; Hirose, S. Clinical management of infantile cholelithiasis. *J. Pediatr. Surg.* **2015**, *50*, 1289–1292. [[CrossRef](#)]
- Zdanowicz, K.; Białokoz-Kalinowska, I.; Lebensztejn, D.M. Non-alcoholic fatty liver disease in non-obese children. *Hong Kong Med. J.* **2020**, *26*, 459–462. [[CrossRef](#)]
- Parra-Landazury, N.M.; Cordova-Gallardo, J.; Méndez-Sánchez, N. Obesity and Gallstones. *Visc. Med.* **2021**, *37*, 394–402. [[CrossRef](#)]
- Walker, S.K.; Maki, A.C.; Cannon, R.M.; Foley, D.S.; Wilson, K.M.; Galganski, L.A.; Wiesenauer, C.A.; Bond, S.J. Etiology and incidence of pediatric gallbladder disease. *Surgery* **2013**, *154*, 927–931, discussion 31–33. [[CrossRef](#)]
- Schwab, M.E.; Braun, H.J.; Feldstein, V.A.; Nijagal, A. The natural history of fetal gallstones: A case series and updated literature review. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* **2020**, *35*, 4755–4762. [[CrossRef](#)]
- Troyano-Luque, J.; Padilla-Pérez, A.; Martínez-Wallín, I.; de la Rosa, M.; Mastroia, S.A.; Trujillo, J.L.; Pérez-Medina, T. Short and long term outcomes associated with fetal cholelithiasis: A report of two cases with antenatal diagnosis and postnatal follow-up. *Case Rep. Obstet. Gynecol.* **2014**, *2014*, 714271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Malhotra, P.; Gill, R.K.; Saksena, S.; Alrefai, W.A. Disturbances in Cholesterol Homeostasis and Non-alcoholic Fatty Liver Diseases. *Front. Med.* **2020**, *7*, 467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Di Ciaula, A.; Portincasa, P. Recent advances in understanding and managing cholesterol gallstones. *F1000Research* **2018**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cortés, V.A.; Barrera, F.; Nervi, F. Pathophysiological connections between gallstone disease, insulin resistance, and obesity. *Obes. Rev.* **2020**, *21*, e12983. [[CrossRef](#)]
- Alphonse, P.A.; Jones, P.J. Revisiting Human Cholesterol Synthesis and Absorption: The Reciprocity Paradigm and its Key Regulators. *Lipids* **2016**, *51*, 519–536. [[CrossRef](#)]

16. Chambers, K.F.; Day, P.E.; Aboufarrag, H.T.; Kroon, P.A. Polyphenol Effects on Cholesterol Metabolism via Bile Acid Biosynthesis, CYP7A1: A Review. *Nutrients* **2019**, *11*, 2588. [\[CrossRef\]](#)
17. Sun, H.; Warren, J.; Yip, J.; Ji, Y.; Hao, S.; Han, W.; Ding, Y. Factors Influencing Gallstone Formation: A Review of the Literature. *Biomolecules* **2022**, *12*, 550. [\[CrossRef\]](#)
18. Portincasa, P.; Moschetta, A.; Palasciano, G. Cholesterol gallstone disease. *Lancet* **2006**, *368*, 230–239. [\[CrossRef\]](#)
19. Luo, J.; Yang, H.; Song, B.L. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, *21*, 225–245. [\[CrossRef\]](#)
20. Di Ciaula, A.; Wang, D.Q.; Portincasa, P. An update on the pathogenesis of cholesterol gallstone disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **2018**, *34*, 71–80. [\[CrossRef\]](#)
21. Katsika, D.; Grijibovski, A.; Einarsson, C.; Lammert, F.; Lichtenstein, P.; Marschall, H.U. Genetic and environmental influences on symptomatic gallstone disease: A Swedish study of 43,141 twin pairs. *Hepatology* **2005**, *41*, 1138–1143. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Krawczyk, M.; Niewiadomska, O.; Jankowska, L.; Jankowski, K.; Więckowski, S.; Lebensztejn, D.; Więcek, S.; Gozdowska, J.; Kulaga, Z.; Weber, S.N.; et al. Common variant p.D19H of the hepatobiliary sterol transporter ABCG8 increases the risk of gallstones in children. *Liver Int.* **2022**, *42*, 1585–1592. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Zhao, F.; Ma, S.; Zhou, Y.; Wei, B.; Hao, Z.; Cui, X.; Xing, L.; Liu, G.; Jin, L.; Ma, T.; et al. miRNA-223 Suppresses Mouse Gallstone Formation by Targeting Key Transporters in Hepatobiliary Cholesterol Secretion Pathway. *Int. J. Biol. Sci.* **2021**, *17*, 4459–4473. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Nissinen, M.J.; Pitkänen, N.; Simonen, P.; Gylling, H.; Viikari, J.; Raitakari, O.; Lehtimäki, T.; Juonala, M.; Pakarinen, M.P. Genetic polymorphism of sterol transporters in children with future gallstones. *Dig. Liver Dis.* **2018**, *50*, 954–960. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Dong, C.; Condat, B.; Picon-Coste, M.; Chrétien, Y.; Potier, P.; Noblinski, B.; Arrivé, L.; Hauuy, M.P.; Barbu, V.; Maftouh, A.; et al. Low-phospholipid-associated cholelithiasis syndrome: Prevalence, clinical features, and comorbidities. *JHEP Rep.* **2021**, *3*, 100201. [\[CrossRef\]](#)
26. Schatz, S.B.; Jünger, C.; Keitel-Anselmo, V.; Kubitz, R.; Becker, C.; Gerner, P.; Pfister, E.-D.; Goldschmidt, I.; Junge, N.; Wenning, D.; et al. Phenotypic spectrum and diagnostic pitfalls of ABCB4 deficiency depending on age of onset. *Hepatol. Commun.* **2018**, *2*, 504–514. [\[CrossRef\]](#)
27. Jirsa, M.; Bronský, J.; Dvořáková, L.; Šperl, J.; Šmajstrla, V.; Horák, J.; Nevorál, J.; Hřebíček, M. ABCB4 mutations underlie hormonal cholestasis but not pediatric idiopathic gallstones. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 5867–5874. [\[CrossRef\]](#)
28. Dong, C.; Zhang, B.-P.; Wang, H.; Xu, H.; Zhang, C.; Cai, Z.-S.; Wang, D.-W.; Shu, S.-N.; Huang, Z.-H.; Luo, X.-P. Clinical and histopathologic features of sodium taurocholate cotransporting polypeptide deficiency in pediatric patients. *Medicine* **2019**, *98*, e17305. [\[CrossRef\]](#)
29. Mao, F.; Wang, M.-X.; Hou, X.; Zhou, Z.; Yan, Y.-Y.; Fang, L.-J.; Tan, Z.; Fang, W.-Y.; Liu, T.; He, W.; et al. NTCP Deficiency Causes Gallbladder Abnormalities in Mice and Human Beings. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2021**, *11*, 831–839. [\[CrossRef\]](#)
30. Vitale, G.; Gitto, S.; Raimondi, F.; Mattiaccio, A.; Mantovani, V.; Vukotic, R.; D’Errico, A.; Seri, M.; Russell, R.B.; Andreone, P. Cryptogenic cholestasis in young and adults: ATP8B1, ABCB11, ABCB4, and TJP2 gene variants analysis by high-throughput sequencing. *J. Gastroenterol.* **2018**, *53*, 945–958. [\[CrossRef\]](#)
31. Qiao, T.; Ma, R.H.; Luo, Z.L.; Yang, L.Q.; Luo, X.B.; Zheng, P.M. Clonorchis sinensis eggs are associated with calcium carbonate gallbladder stones. *Acta Trop.* **2014**, *138*, 28–37. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Koivusalo, A.; Pakarinen, M.; Gylling, H.; Nissinen, M.J. Relation of cholesterol metabolism to pediatric gallstone disease: A retrospective controlled study. *BMC Gastroenterol.* **2015**, *15*, 74. [\[CrossRef\]](#)
33. Nissinen, M.J.; Simonen, P.; Gylling, H.; Viikari, J.; Hutri-Kähönen, N.; Jokinen, E.; Tossavainen, P.; Laitinen, T.; Raitakari, O.; Juonala, M.; et al. Low Childhood Cholesterol Absorption Predisposes to Gallstone Disease: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2017**, *64*, 418–424. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Zdanowicz, K.; Ryzko, J.; Bobrus-Chociej, A.; Wojtkowska, M.; Lebensztejn, D.M. The role of chemerin in the pathogenesis of cholelithiasis in children and adolescents. *J. Paediatr. Child Health* **2021**, *57*, 371–375. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Zdanowicz, K.; Bobrus-Chociej, A.; Lebensztejn, D.M. Chemerin as Potential Biomarker in Pediatric Diseases: A PRISMA-Compliant Study. *Biomedicines* **2022**, *10*, 591. [\[CrossRef\]](#)
36. Denisova, A.; Pilmane, M.; Engelis, A.; Petersons, A. Gallbladder Interleukins in Children with Calculous Cholecystitis. *Pediatr. Rep.* **2021**, *13*, 470–482. [\[CrossRef\]](#)
37. Zdanowicz, K.; Bobrus-Chociej, A.; Pogodzinska, K.; Blachnio-Zabielska, A.; Zelazowska-Rutkowska, B.; Lebensztejn, D.M.; Daniluk, U. Analysis of Sphingolipids in Pediatric Patients with Cholelithiasis—A Preliminary Study. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 5613. [\[CrossRef\]](#)
38. Thursby, E.; Juge, N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem. J.* **2017**, *474*, 1823–1836. [\[CrossRef\]](#)
39. Wu, T.; Zhang, Z.; Liu, B.; Hou, D.; Liang, Y.; Zhang, J.; Shi, P. Gut microbiota dysbiosis and bacterial community assembly associated with cholesterol gallstones in large-scale study. *BMC Genom.* **2013**, *14*, 669. [\[CrossRef\]](#)
40. Qian, M.-B.; Li, H.-M.; Jiang, Z.-H.; Yang, Y.-C.; Lu, M.-F.; Wei, K.; Wei, S.-L.; Chen, Y.; Zhou, C.-H.; Chen, Y.-D.; et al. Severe hepatobiliary morbidity is associated with Clonorchis sinensis infection: The evidence from a cross-sectional community study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2021**, *15*, e0009116. [\[CrossRef\]](#)
41. Di Ciaula, A.; Garruti, G.; Frühbeck, G.; De Angelis, M.; De Bari, O.; Wang, D.Q.H.; Lammert, F.; Portincasa, P. The Role of Diet in the Pathogenesis of Cholesterol Gallstones. *Curr. Med. Chem.* **2019**, *26*, 3620–3638. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

42. Khalaf, R.T.; Sokol, R.J. New Insights into Intestinal Failure-Associated Liver Disease in Children. *Hepatology* **2020**, *71*, 1486–1498. [[CrossRef](#)]
43. Baran, M.; Appak, Y.C.; Tumor, G.; Karakoyun, M.; Ozdemir, T.; Koyluoglu, G. Etiology and Outcome of Cholelithiasis in Turkish Children. *Indian Pediatr.* **2018**, *55*, 216–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Serdaroglu, F.; Koca, Y.S.; Saltik, F.; Koca, T.; Dereci, S.; Akcam, M.; Akcam, F.Z. Gallstones in childhood: Etiology, clinical features, and prognosis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, *28*, 1468–1472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Pichler, J.; Watson, T.; McHugh, K.; Hill, S. Prevalence of Gallstones Compared in Children with Different Intravenous Lipids. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2015**, *61*, 253–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Diamanti, A.; Papa, R.E.; Panetta, F. Disappearance of the gallstones under SMOFlipid: True or coincidental association? *Clin. Nutr.* **2013**, *32*, 150–151. [[CrossRef](#)]
47. Desai, A.A.; Thompson, L.M.; Abdelmoity, A.T.; Kayyali, H.; St Peter, S.D. Management of symptomatic cholelithiasis while on ketogenic diet: A case report. *Pediatr. Neurol.* **2014**, *51*, 439–440. [[CrossRef](#)]
48. Cuzzolin, L.; Oggiano, A.M.; Clemente, M.G.; Locci, C.; Antonucci, L.; Antonucci, R. Ceftriaxone-associated biliary pseudolithiasis in children: Do we know enough? *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2021**, *35*, 40–52. [[CrossRef](#)]
49. Dooki, M.R.; Norouzi, A. Cholelithiasis in childhood: A cohort study in north of Iran. *Iran. J. Pediatr.* **2013**, *23*, 588–592.
50. Tuna Kirsaciloglu, C.; Çuhacı Çakır, B.; Bayram, G.; Akbıyık, F.; Işık, P.; Tunç, B. Risk factors, complications and outcome of cholelithiasis in children: A retrospective, single-centre review. *J. Paediatr. Child Health* **2016**, *52*, 944–949. [[CrossRef](#)]
51. Demirbilek, H.; Shah, P.; Arya, V.B.; Hinchey, L.; Flanagan, S.E.; Ellard, S.; Hussain, K. Long-term follow-up of children with congenital hyperinsulinism on octreotide therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2014**, *99*, 3660–3667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Dieffenbach, B.V.; Li, N.; Madenci, A.L.; Murphy, A.J.; Barnea, D.; Gibson, T.M.; Tonorezos, E.S.; Leisenring, W.M.; Howell, R.M.; Diller, L.R.; et al. Incidence of and risk factors for late cholecystectomy in survivors of childhood cancer: A report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Eur. J. Cancer* **2020**, *133*, 4–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Troisi, R.; Hyer, M.; Titus, L.; Palmer, J.R.; Hatch, E.E.; Huo, D.; Aagaard, K.M.; Strohsnitter, W.C.; Hoover, R.N. Prenatal diethylstilbestrol exposure and risk of diabetes, gallbladder disease, and pancreatic disorders and malignancies. *J. Dev. Orig. Health Dis.* **2021**, *12*, 619–626. [[CrossRef](#)]
54. Li, W.; Liang, J.; Shao, W.; Xu, C.; Xu, J.; Jiang, Z.; Gu, A. Maternal smoking during pregnancy is risk factor for gallbladder disease in offspring during adulthood: A prospective study from UK Biobank. *Ann. Hepatol.* **2021**, *26*, 100558. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Greer, D.; Heywood, S.; Croaker, D.; Gananadha, S. Is 14 the new 40: Trends in gallstone disease and cholecystectomy in Australian children. *Pediatr. Surg. Int.* **2018**, *34*, 845–849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Pogorelić, Z.; Aralica, M.; Jukić, M.; Žitko, V.; Despot, R.; Jurić, I. Gallbladder Disease in Children: A 20-year Single-center Experience. *Indian Pediatr.* **2019**, *56*, 384–386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Frybova, B.; Drabek, J.; Lochmannova, J.; Douda, L.; Hlava, S.; Zemkova, D.; Mixa, V.; Kyncl, M.; Zeman, L.; Rygl, M.; et al. Cholelithiasis and choledocholithiasis in children; risk factors for development. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0196475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Bonfrate, L.; Wang, D.Q.; Garruti, G.; Portincasa, P. Obesity and the risk and prognosis of gallstone disease and pancreatitis. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **2014**, *28*, 623–635. [[CrossRef](#)]
59. Koebnick, C.; Smith, N.; Black, M.H.; Porter, A.H.; Richie, B.A.; Hudson, S.; Gililand, D.; Jacobsen, S.J.; Longstreth, G.F. Pediatric obesity and gallstone disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2012**, *55*, 328–333. [[CrossRef](#)]
60. Nunes, M.M.; Medeiros, C.C.; Silva, L.R. Cholelithiasis in obese adolescents treated at an outpatient clinic. *J. Pediatr.* **2014**, *90*, 203–238. [[CrossRef](#)]
61. Fradin, K.; Racine, A.D.; Belamarich, P.F. Obesity and symptomatic cholelithiasis in childhood: Epidemiologic and case-control evidence for a strong relation. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2014**, *58*, 102–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Di Ciaula, A.; Wang, D.Q.; Portincasa, P. Gallbladder and gastric motility in obese newborns, pre-adolescents and adults. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2012**, *27*, 1298–1305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Sellers, Z.M.; MacIsaac, D.; Yu, H.; Dehghan, M.; Zhang, K.Y.; Bensen, R.; Wong, J.J.; Kin, C.; Park, K.T. Nationwide Trends in Acute and Chronic Pancreatitis Among Privately Insured Children and Non-Elderly Adults in the United States, 2007–2014. *Gastroenterology* **2018**, *155*, 469–478.e1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Abu-El-Haija, M.; Lin, T.K.; Khan, S.; Fei, L.; Thompson, T.; Nathan, J.D. Predictive biomarkers for acute gallstone pancreatitis in the pediatric population. *Pancreatol.* **2018**, *18*, 482–485. [[CrossRef](#)]
65. Heida, A.; Koot, B.G.P.; Baan-Slootweg, O.H.V.; Rijcken, T.H.P.; Seidell, J.; Makkes, S.; Jansen, P.L.M.; A Benninga, M. Gallstone disease in severely obese children participating in a lifestyle intervention program: Incidence and risk factors. *Int. J. Obes.* **2014**, *38*, 950–953. [[CrossRef](#)]
66. Alvarenga, L.R.; Sandy, N.S.; Gomez, G.S.; Hessel, G.; DETommaso, A.M.A.; Bellomo-Brandão, M. Symptomatic cholelithiasis as the presentation of pediatric primary sclerosing cholangitis—Case series and literature review. *Arq. Gastroenterol.* **2021**, *58*, 227–233. [[CrossRef](#)]
67. Jafari, S.H.; Haseli, S.; Kaffashan, S.; Saeedi-Moghadam, M.; Iranpour, P.; Zeinali-Rafsanjani, B. Assessment of the Hallmarks of Wilson Disease in CT Scan Imaging. *J. Med. Imaging Radiat. Sci.* **2020**, *51*, 145–153. [[CrossRef](#)]
68. Kim, S.Y.; Song, C.M.; Lim, H.; Lim, M.S.; Bang, W.; Choi, H.G. Bidirectional association between gallstones and renal stones: Two longitudinal follow-up studies using a national sample cohort. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 2620. [[CrossRef](#)]

69. Nada, T.; Sato, M.; Yoshikawa, T.; Ogura, M.; Kamei, K. Cholelithiasis in infants with congenital nephrotic syndrome of the Finnish type. *Pediatr. Nephrol.* **2021**, *36*, 3795–3798. [[CrossRef](#)]
70. Ricci, F.; Stagi, S.; Messa, F.; de Martino, M. Neonatal cholelithiasis in Down syndrome: Is hypothyroidism involved? A case-report. *J. Neonatal Perinatal Med.* **2018**, *11*, 423–425. [[CrossRef](#)]
71. Toscano, E.; Trivellini, V.; Andria, G. Cholelithiasis in Down's syndrome. *Arch. Dis. Child.* **2001**, *85*, 242–243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Taşdemir, H.A.; Cetinkaya, M.C.; Polat, C.; Belet, U.; Kalayci, A.G.; Akbaş, S. Gallbladder motility in children with Down syndrome. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2004**, *39*, 187–191. [[PubMed](#)]
73. Chaudry, G.; Navarro, O.M.; Levine, D.S.; Oudjhane, K. Abdominal manifestations of cystic fibrosis in children. *Pediatr. Radiol.* **2006**, *36*, 233–240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Stirnemann, J.; Belmatoug, N.; Camou, F.; Serratrice, C.; Froissart, R.; Caillaud, C.; Levade, T.; Astudillo, L.; Serratrice, J.; Brassier, A.; et al. A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 441. [[CrossRef](#)]
75. Zimmermann, A.; Popp, R.A.; Al-Khzouz, C.; Bucerzan, S.; Naşcu, I.; Leucuta, D.; Galle, P.R.; Grigorescu-Sido, P. Cholelithiasis in Patients with Gaucher Disease type 1: Risk Factors and the Role of ABCG5/ABCG8 Gene Variants. *J. Gastrointest. Liver Dis.* **2016**, *25*, 447–455. [[CrossRef](#)]



## 8. Streszczenie w języku polskim

W ostatnich latach obserwuje się stały wzrost częstości występowania kamicy żółciowej u dzieci. Do znanych przyczyn formowania kamieni cholesterolowych należą czynniki genetyczne, płeć żeńska, starszy wiek czy otyłość. Mimo znanych czynników ryzyka wystąpienia kamieni cholesterolowych, patomechanizm choroby jest złożony i wciąż nie został dogłębnie wyjaśniony, zwłaszcza w populacji pediatrycznej.

Obecnie tkanka tłuszczowa postrzegana jest nie tylko jako źródło substancji zapasowych, ale także jako narząd dokrewny produkujący liczne substancje białkowe, adipokiny. Wątroba również wpływa na metabolizm lipidów i węglowodanów poprzez uwalnianie do krążenia hepatokin. Zmiany w ich stężeniu opisano w otyłości, niealkoholowej stłuszczeniowej chorobie wątroby, miażdżycy czy cukrzycy typu 2. Do tej pory nie analizowano stężeń adipokin i hepatokin u dzieci z kamicią żółciową. Lipidomika to dział nauki zajmujący się badaniem lipidów w różnych materiałach biologicznych. Do chwili obecnej nie ma danych dotyczących profilu sfingolipidów u pacjentów z kamicią żółciową.

Celem prac badawczych były pomiary stężeń: chemeryny, waspiny, progranuliny, białka wiążącego retinol-4 (RBP-4), czynnika wzrostu fibroblastów 21 (FGF21) oraz wybranych sfingolipidów (C16:0-Laktosylceramid (C16:0-LacCer), C18:0-Laktosylceramid (C18:0-LacCer), C18:1-Laktosylceramid (C18:1-LacCer), C24:0-Laktosylceramid (C24:0-LacCer), C24:1-Laktosylceramid (C24:1-LacCer), C14:0-Ceramid (C14:0-Cer), C16:0-Ceramid (C16:0-Cer), C18:0-Ceramid (C18:0-Cer), C18:1-Ceramid (C18:1-Cer), C20:0-Ceramid (C20:0-Cer), C22:0-Ceramid (C22:0-Cer), C24:0-Ceramid (C24:0-Cer), C24:1-Ceramid (C24:1-Cer), sfingozyna (Sph) oraz sfinganina (SPA)) u dzieci z kamicią żółciową w porównaniu do rówieśników bez kamicy żółciowej, ocena korelacji badanych markerów z parametrami antropometrycznymi oraz wynikami badań biochemicznych krwi oraz analiza wieloczynnikowa wpływu stężenia sfingolipidów przy pomocy uogólnionego modelu liniowego.

Do badań włączono dzieci z kamicią żółciową rozpoznaną w badaniu ultrasonograficznym (USG) lub rezonansie magnetycznym (MRI) jamy brzusznej. Pacjenci byli hospitalizowani w Klinice Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii, Żywienia, Alergologii i Pulmonologii Uniwersyteckiego Dziecięcego Szpitala Klinicznego w Białymstoku. Grupę kontrolną stanowiły zdrowe dzieci, z wykluczoną kamicią żółciową. Przeprowadzenie badań zostało poprzedzone uzyskaniem zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku i pisemnej zgody rodzica na udział w badaniu. U wszystkich dzieci

przeprowadzono pomiary antropometryczne (BMI) oraz oznaczono wybrane parametry biochemiczne. Pomiar stężenia chemeryny, waspiny, progranulin, RBP-4 i FGF21 w surowicy wykonano za pomocą metody immunoenzymatycznej. Ocenę stężenia sfingolipidów wykonano za pomocą ultrawysokosprawnej chromatografii cieczerwowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas.

W pierwszej publikacji wykazano znamienne wyższe stężenie chemeryny, FGF21 i RBP-4 u pacjentów z kamicą żółciową w porównaniu z grupą kontrolną. Następnie grupę badaną podzielono ze względu na BMI na grupę I z prawidłowym BMI oraz grupę II z nadwagą i otyłością. W grupie II zaobserwowano istotnie wyższe wartości trójglicerydów (TG), wskaźnik insulinooporności (HOMA-IR) oraz RBP-4 w porównaniu z grupą I, jednakże stężenie chemeryny było porównywalne w obu grupach. Natomiast znamienne wyższe stężenie tej adipokiny zanotowano wśród pacjentów z grupy I w odniesieniu do grupy kontrolnej, co wskazuje większe stężenie chemeryny u dzieci z kamicą żółciową niezależnie od masy ciała. Dane te mogą wskazywać na potencjalną rolę tej adipokiny w rozwoju kamicy żółciowej u dzieci i młodzieży. Dodatkowo w grupie z kamicą żółciową zaobserwowano dodatnie korelacje pomiędzy: chemeryną i TG, HOMA-IR i FGF21, jak również waspiną i lipoproteina wysokiej gęstości (HDL).

W kolejnej pracy stwierdzono istotne statystyczne różnice w stężeniach całkowitego cholesterolu (TC), SPA, C14:0-Cer, C16:0-Cer, C18:1-Cer, C18:0-Cer, C20:0-Cer, C24:1-Cer, C16:0-LacCer, C18:0-LacCer, C18:1-LacCer, C24:0-LacCer i C24:1-LacCer u dzieci z kamicą żółciową w porównaniu z kontrolą. W grupie badanej zaobserwowano następujące istotne dodatnie korelacje: BMI i C16:0-Cer, TG i C14:0-Cer, TG i C24:1-Cer, TG i C24:0-LacCer, TC i C14:0-Cer, TC i C16:0-Cer, TC i C24:1-LacCer, TC i C24:0-LacCer oraz ujemne korelacje: BMI i C20:0-Cer, BMI i C24:1-Cer, TC i C18:1-LacCer. Najlepsze wartości diagnostyczne w różnicowaniu pacjentów z kamicą żółciową od kontroli uzyskano dla C16:0-Cer i C14:0-Cer. W dokonanej analizie wieloczynnikowej wpływu stężenia sfingolipidów po uwzględnieniu wieku, płci, obecności otyłości oraz poziomów trójglicerydów i cholesterolu całkowitego na obecność kamicy żółciowej u dzieci, najlepsze wartości różnicujące zanotowano dla obniżonych poziomów SPA, C14:0-Cer, C16:0-Cer, C24:1-LacCer, C24:0-LacCer i zwiększonych wartości C20:0-Cer, C24:1-Cer, C16:0-LacCer, C18:1-LacCer.

W pracy pogładowej przeanalizowano wyniki dotychczasowych badań przeprowadzonych w grupie pediatrycznej dotyczących etiologii kamicy żółciowej.

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski:

- Stężenia poszczególnych adipokin, FGF21 i sfingolipidów różnią się u

pacjentów z kamicą żółciową w porównaniu ze zdrowymi kontrolami.

- Wśród analizowanych adipokin wykazano istotnie wyższe stężenie chemeryny u pacjentów z kamicą żółciową niezależnie od BMI.
- Wśród analizowanych sfingolipidów, C16:0-Cer i C14:0-Cer najlepiej różnicował pacjentów z kamicą żółciową od zdrowych kontroli niezależnie od wieku, płci, otyłości, stężeń TG i TC.

## 9. Streszczenie w języku angielskim

In recent years, there has been a steady increase in the incidence of gallstones in children. Known causes of cholesterol stone formation include genetic factors, female gender, older age or obesity. Despite the known risk factors for cholesterol stones, the pathomechanism of the disease is complex and has still not been thoroughly elucidated, especially in the pediatric population.

It is now believed that adipose tissue is not only a source of spare substances, but is also an endocrine organ that produces numerous protein substances, such as: adipokines. The liver also influences lipid and carbohydrate metabolism by releasing hepatokines into the circulation. Changes in their concentration have been described in obesity, non-alcoholic fatty liver disease, atherosclerosis or type 2 diabetes. To date, the concentrations of adipokines and hepatokines have not been analyzed in children with gallstones. Lipidomics is a branch of science that deals with the study of lipids in various biological materials. To date, there are no data on the profile of sphingolipids in patients with gallstones.

The aims of the studies included measuring the concentrations of: chemerin, vaspin, progranulin, fibroblast growth factor 21 (FGF21) and selected sphingolipids (C16:0-Lactosylceramide (C16:0-LacCer), C18:0-lactosylceramide (C18:0-LacCer), C18:1-lactosylceramide (C18:1-LacCer), C24:0-lactosylceramide (C24:0-LacCer), C24:1-lactosylceramide (C24:1-LacCer) , C14:0-Ceramide (C14:0-Cer), C16:0-Ceramide (C16:0-Cer), C18:0-Ceramide (C18:0-Cer), C18:1-Ceramide (C18:1-Cer) , C20:0-Ceramide (C20:0-Cer), C22:0-Ceramide (C22:0-Cer), C24:0-Ceramide (C24:0-Cer), C24:1-Ceramide (C24:1-Cer), sphingosine (Sph) and sphinganine (SPA)) in the serum of children with cholelithiasis compared to a control group without gallstones, then evaluating the correlation of the markers with anthropometric parameters and laboratory results. A generalized multivariable linear model was created to determine the association between sphingolipid levels and the presence of cholelithiasis.

The study included children who were admitted to Department of Paediatrics, Gastroenterology, Hepatology, Nutrition, Allergology and Pulmonology of the University Children's Clinical Hospital in Białystok. The control group included children without any somatic organ. The protocol was approved by the Bioethics Committee of the Medical University of Białystok prior to patient recruitment. All patients had body mass index (BMI) calculated based on the World Health Organization (WHO). The measurements of chemerin, vaspin, progranulin, RBP-4 and FGF-21 were determined using enzyme-linked immunosorbent

assay systems. The content of sphingolipids was measured using ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry.

The first publication showed significantly higher concentrations of chemerin, FGF21 and RBP-4 in patients with gallstones compared to the control group. Then, the study group was divided according to BMI into group I with normal BMI and group II with overweight and obesity. Significantly higher values of triglycerides (TG), insulin resistance index (HOMA-IR) and RBP-4 were observed in group II compared to group I, however, the concentration of chemerin was comparable in both groups. On the other hand, significantly higher concentrations of chemerin were recorded among patients in group I with respect to the control group, indicating higher levels of chemerin in children with cholelithiasis regardless of body weight. These data may indicate a potential role for this adipokine in the development of cholelithiasis in children and adolescents. Moreover, in the group with gallstones, positive correlations were observed between: chemerin and TG, HOMA-IR and FGF21, and vaspin and high-density lipoprotein (HDL).

Another study found significant differences in total cholesterol (TC), SPA, C14:0-Cer, C16:0-Cer, C18:1-Cer, C18:0-Cer, C18:0-Cer, C20:0-Cer, C24:1-Cer, C16:0-LacCer, C18:0-LacCer, C18:1-LacCer, C24:0-LacCer and C24:1-LacCer in children with cholelithiasis compared to controls. The following significant positive correlations were observed in the study group: BMI and C16:0-Cer, TG and C14:0-Cer, TG and C24:1-Cer, TG and C24:0-LacCer, TC and C14:0-Cer, TC and C16:0-Cer, TC and C24:1-LacCer, TC and C24:0-LacCer, and negative correlations: BMI and C20:0-Cer, BMI and C24:1-Cer, TC and C18:1-LacCer. The best diagnostic values in differentiating patients with cholelithiasis from controls were obtained for C16:0-Cer and C14:0-Cer. In a multivariate analysis of the effect of sphingolipid levels after accounting for age, gender, presence of obesity, and levels of triglycerides and total cholesterol on the presence of cholelithiasis in children, the best differential values were recorded for reduced levels of SPA, C14: 0-Cer, C16:0-Cer, C24:1-LacCer, C24:0-LacCer and increased values of C20:0-Cer, C24:1-Cer, C16:0-LacCer, C18:1-LacCer.

The aim of the review is to present the latest research on the etiology of gallstone disease in children.

Based on the conducted research, the following conclusions were drawn:

- The concentrations of selected adipokines, FGF21 and sphingolipids differ in patients with gallstones compared to healthy controls.
- Among the analyzed adipokines, significantly higher chemerin concentrations were found in patients with gallstones, regardless of BMI.

- The best diagnostic values in differentiating patients with gallstones from healthy controls were obtained for C16:0-Cer and C14:0-Cer.

## 10. Informacje o charakterze udziału współautorów w publikacjach

### Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacjach wraz z szacunkowym określeniem procentowego wkładu

*„The role of chemerin in the pathogenesis of cholelithiasis in children and adolescents”*

Autorzy: Katarzyna Zdanowicz, Joanna Ryżko, Anna Bobrus-Chociej, Małgorzata Wojtkowska i Dariusz Marek Lebensztejn

Journal of Paediatric and Child Health 2021: 57:371-375.

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału	Procentowy wkład
Lek. Katarzyna Zdanowicz	-tworzenie baz danych -analiza wyników -wybór piśmiennictwa -współtworzenie manuskryptu -przygotowanie pracy do publikacji	55%
Dr n. med. Joanna Ryżko	-kwalifikacja pacjentów -tworzenie baz danych	25%
Dr n. med. Anna Bobrus-Chociej	-kwalifikacja pacjentów	5%
Dr n.med. Małgorzata Wojtkowska	-wykonanie i ocena badań radiologicznych	5%
Prof. dr hab. n. med. Dariusz Marek Lebensztejn	-koncepcja pracy -ocena merytoryczna i edycja manuskryptu	10%

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej lek. Katarzyny Zdanowicz.

*Katarzyna Zdanowicz*

## Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacjach wraz z szacunkowym określeniem procentowego wkładu

„Analysis of Sphingolipids in Pediatric Patients with Cholelithiasis—A Preliminary Study.”

Autorzy: Katarzyna Zdanowicz, Anna Bobrus-Chociej, Karolina Pogodzińska, Agnieszka Błachnio-Zabielska, Beata Żelazowska-Rutkowska, Dariusz Marek Lebensztejn, Urszula Daniluk. Analysis of Sphingolipids in Pediatric Patients with Cholelithiasis—A Preliminary Study.

Journal of Clinical Medicine. 2022; 11:5613.

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału	Procentowy wkład
Lek. Katarzyna Zdanowicz	-tworzenie baz danych -analiza wyników -wybór piśmiennictwa -współtworzenie manuskryptu -przygotowanie pracy do publikacji	60%
Dr n. med. Anna Bobrus-Chociej	-kwalifikacja pacjentów	2%
Karolina Pogodzińska	-wykonanie i ocena badań laboratoryjnych	5%
Prof. dr hab. n. med. Agnieszka Błachnio-Zabielska	-wykonanie i ocena badań laboratoryjnych	5%
Dr hab. n. med. Beata Żelazowska-Rutkowska	-wykonanie i ocena badań laboratoryjnych	3%
Prof. dr hab. n. med. Dariusz Marek Lebensztejn	-ocena merytoryczna i edycja manuskryptu	5%
Dr hab. n. med. Urszula Daniluk	-koncepcja pracy -ocena merytoryczna i edycja manuskryptu	20 %

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej lek. Katarzyny Zdanowicz.

*Katarzyna Zdanowicz*



## Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacjach wraz z szacunkowym określeniem procentowego wkładu

„The Etiology of Cholelithiasis in Children and Adolescents-A Literature Review. ”

Autorzy: Katarzyna Zdanowicz, Jarosław Daniluk, Dariusz Marek Lebensztejn, Urszula Daniluk

International Journal of Molecular Sciences. 2022;23:13376

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału	Procentowy wkład
Lek. Katarzyna Zdanowicz	- koncepcja pracy - wybór i analiza piśmiennictwa - współtworzenie manuskryptu - przygotowanie pracy do publikacji	80%
Dr hab. n. med. Jarosław Daniluk	- analiza piśmiennictwa	5%
Prof. dr hab. n. med. Dariusz Marek Lebensztejn	- ocena merytoryczna i edycja manuskryptu	5%
Dr hab. n. med. Urszula Daniluk	- współtworzenie manuskryptu - przygotowanie pracy do publikacji - ocena merytoryczna i edycja manuskryptu	10%

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej lek. Katarzyny Zdanowicz.

*Katarzyna Zdanowicz*

# 11. Oświadczenia współautorów

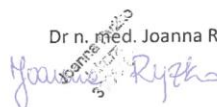
Białystok, dnia 7 grudnia 2022

## Oświadczenie współautorów

Oświadczam, iż mój współudział w przygotowaniu publikacji: *Katarzyna Zdanowicz, Joanna Ryżko, Anna Bobrus-Chociej, Małgorzata Wojtkowska, Dariusz Marek Lebensztein. „The role of chemerin in the pathogenesis of cholelithiasis in children and adolescents”. Journal of Paediatric and Child Health 2021: 57:371-375*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Zdanowicz, wynoszący 25% polegał na kwalifikacji pacjentów i tworzeniu baz danych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Katarzynę Zdanowicz publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.

Dr n. med. Joanna Ryżko



Białystok, dnia 7 grudnia 2022

### Oświadczenie współautorów

Oświadczam, iż mój współudział w przygotowaniu publikacji: *Katarzyna Zdanowicz, Joanna Ryżko, Anna Bobrus-Chociej, Małgorzata Wojtkowska, Dariusz Marek Lebensztejn. „The role of chemerin in the pathogenesis of cholelithiasis in children and adolescents”. Journal of Paediatric and Child Health 2021: 57:371-375*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Zdanowicz, wynoszący 5% polegał na kwalifikacji pacjentów.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Katarzynę Zdanowicz publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.

Dr n. med. Anna Bobrus-Chociej

*Anna Bobrus - Chociej*

Białystok, dnia 7 grudnia 2022

### Oświadczenie współautorów

Oświadczam, iż mój współudział w przygotowaniu publikacji: *Katarzyna Zdanowicz, Joanna Ryżko, Anna Bobrus-Chociej, Małgorzata Wojtkowska, Dariusz Marek Lebensztejn. „The role of chemerin in the pathogenesis of cholelithiasis in children and adolescents”. Journal of Paediatric and Child Health 2021: 57:371-375*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Zdanowicz, wynoszący 5% polegał na wykonaniu i ocenie badań radiologicznych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Katarzynę Zdanowicz publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.

Dr n. med. Małgorzata Wojtkowska

dr n. med.  
**Małgorzata Wojtkowska**  
specjalista radiodiagnostyki  
1318319

Białystok, dnia 7 grudnia 2022

## Oświadczenie współautorów

Oświadczam, iż mój współudział w przygotowaniu publikacji: *Katarzyna Zdanowicz, Joanna Ryżko, Anna Bobrus-Chociej, Małgorzata Wojtkowska, Dariusz Marek Lebensztejn. „The role of chemerin in the pathogenesis of cholelithiasis in children and adolescents”. Journal of Paediatric and Child Health 2021: 57:371-375*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Zdanowicz, wynoszący 10% polegał na koncepcji pracy, ocenie merytorycznej i edycji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Katarzynę Zdanowicz publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.

  
Prof. dr hab. n. med. Dariusz Marek Lebensztejn

Białystok, dnia 7 grudnia 2022

## Oświadczenie współautorów

Oświadczam, iż mój współudział w przygotowaniu publikacji *Katarzyna Zdanowicz, Anna Bobrus-Chociej, Karolina Pogodzińska, Agnieszka Błachnio-Zabielska, Beata Żelazowska-Rutkowska, Dariusz Marek Lebensztejn, Urszula Daniluk. „Analysis of Sphingolipids in Pediatric Patients with Cholelithiasis—A Preliminary Study.” Journal of Clinical Medicine. 2022; 11:5613*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Zdanowicz, wynoszący 2% polegał na kwalifikacji pacjentów.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Katarzynę Zdanowicz publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.

Dr n. med. Anna Bobrus-Chociej


*Anna Bobrus-Chociej*

Białystok, dnia 7 grudnia 2022

## Oświadczenie współautorów

Oświadczam, iż mój współtuział w przygotowaniu publikacji *Katarzyna Zdanowicz, Anna Bobrus-Chociej, Karolina Pogodzińska, Agnieszka Błachnio-Zabielska, Beata Żelazowska-Rutkowska, Dariusz Marek Lebensztejn, Urszula Daniluk. „Analysis of Sphingolipids in Pediatric Patients with Cholelithiasis—A Preliminary Study.” Journal of Clinical Medicine. 2022; 11:5613*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Zdanowicz, wynoszący 5% polegał na wykonaniu i ocenie badań laboratoryjnych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Katarzynę Zdanowicz publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.



Karolina Pogodzińska

Białystok, dnia 7 grudnia 2022

## Oświadczenie współautorów

Oświadczam, iż mój współudział w przygotowaniu publikacji Katarzyna Zdanowicz, Anna Bobrus-Chociej, Karolina Pogodzińska, Agnieszka Błachnio-Zabielska, Beata Żelazowska-Rutkowska, Dariusz Marek Lebsztein, Urszula Daniluk. „Analysis of Sphingolipids in Pediatric Patients with Cholelithiasis—A Preliminary Study.” *Journal of Clinical Medicine*. 2022; 11:5613, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Zdanowicz, wynoszący 5% polegał na wykonaniu i ocenie badań laboratoryjnych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Katarzynę Zdanowicz publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.



Prof. dr hab. n. med. Agnieszka Błachnio-Zabielska



Białystok, dnia 7 grudnia 2022

## Oświadczenie współautorów

Oświadczam, iż mój współudział w przygotowaniu publikacji *Katarzyna Zdanowicz, Anna Bobrus-Chociej, Karolina Pogodzińska, Agnieszka Błachnio-Zabielska, Beata Żelazowska-Rutkowska, Dariusz Marek Lebensztejn, Urszula Daniluk. „Analysis of Sphingolipids in Pediatric Patients with Cholelithiasis—A Preliminary Study.” Journal of Clinical Medicine. 2022; 11:5613,* wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Zdanowicz, wynoszący 3% polegał na wykonaniu i ocenie badań laboratoryjnych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Katarzynę Zdanowicz publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.

Dr hab. n. med. Beata Żelazowska-Rutkowska

05893  
Dr hab. n. med. Beata Żelazowska-Rutkowska  
DIAGNOSTA LABORATORYJNY  
Specjalista laboratoryjnej  
diagnostyki medycznej

Białystok, dnia 7 grudnia 2022

## Oświadczenie współautorów

Oświadczam, iż mój współudział w przygotowaniu publikacji *Katarzyna Zdanowicz, Anna Bobrus-Chociej, Karolina Pogodzińska, Agnieszka Błachnio-Zabielska, Beata Żelazowska-Rutkowska, Dariusz Marek Lebensztejn, Urszula Daniluk. „Analysis of Sphingolipids in Pediatric Patients with Cholelithiasis—A Preliminary Study.” Journal of Clinical Medicine. 2022; 11:5613*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Zdanowicz, wynoszący 5% polegał na ocenie merytorycznej i edycji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Katarzynę Zdanowicz publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.



Prof. dr hab. n. med. Dariusz Marek Lebensztejn

Białystok, dnia 7 grudnia 2022

## Oświadczenie współautorów

Oświadczam, iż mój współudział w przygotowaniu publikacji *Katarzyna Zdanowicz, Anna Bobrus-Chociej, Karolina Pogodzińska, Agnieszka Błachnio-Zabielska, Beata Żelazowska-Rutkowska, Dariusz Marek Lebensztejn, Urszula Daniluk. „Analysis of Sphingolipids in Pediatric Patients with Cholelithiasis—A Preliminary Study.” Journal of Clinical Medicine. 2022; 11:5613*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Zdanowicz, wynoszący 20% polegał na koncepcji pracy, ocenie merytorycznej i edycji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Katarzynę Zdanowicz publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.



Dr hab. n. med. Urszula Daniluk

Białystok, dnia 7 grudnia 2022

## Oświadczenie współautorów

Oświadczam, iż mój współudział w przygotowaniu publikacji *Katarzyna Zdanowicz, Jarosław Daniluk, Dariusz Marek Lebensztejn, Urszula Daniluk „The Etiology of Cholelithiasis in Children and Adolescents-A Literature Review. ” International Journal of Molecular Sciences. 2022;23:13376* wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Zdanowicz, wynoszący 5% polegał na analizie piśmiennictwa.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Katarzynę Zdanowicz publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.



Dr hab. n. med. Jarosław Daniluk

Białystok, dnia 7 grudnia 2022

## Oświadczenie współautorów

Oświadczam, iż mój współudział w przygotowaniu publikacji *Katarzyna Zdanowicz, Jarosław Daniluk, Dariusz Marek Lebensztejn, Urszula Daniluk „The Etiology of Cholelithiasis in Children and Adolescents-A Literature Review.” International Journal of Molecular Sciences. 2022;23:13376* wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Zdanowicz, wynoszący 5% polegał na ocenie merytorycznej i edycji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Katarzynę Zdanowicz publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.



Prof. dr hab. n. med. Dariusz Marek Lebensztejn

Białystok, dnia 7 grudnia 2022

## Oświadczenie współautorów

Oświadczam, iż mój współudział w przygotowaniu publikacji *Katarzyna Zdanowicz, Jarosław Daniluk, Dariusz Marek Lebensztejn, Urszula Daniluk „The Etiology of Cholelithiasis in Children and Adolescents-A Literature Review. ” International Journal of Molecular Sciences. 2022;23:13376* wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Zdanowicz, wynoszący 10% polegał na współtworzeniu manuskryptu, przygotowaniu pracy do publikacji, ocenie merytorycznej i edycji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez lek. Katarzynę Zdanowicz publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.



Dr hab. n. med. Urszula Daniluk

## 12. Uchwała Komisji Bioetycznej

Białystok, 24-11-2016

Uchwała nr: R-I-002/393/2016

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: „Ocena stężenia wybranych adipokin u dzieci z kamicą żółciową” przez prof. dr hab. Dariusza Lebensztejna wraz z zespołem badawczym z UMB.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej UMB

  
prof. dr hab. Elżbieta Hassman-Poznańska

---

UNIwersYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU  
KLINIKa PEDIATRii, GASTROENTEROLOGii,  
HEPATOLOGii, ŻYWIENIA, ALERGOLOGii  
I PULMONOLOGii  
15-274 Białystok, ul. Waszyngtona 17  
tel. 85 74-50-710

ZGODA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie materiału biologicznego pozyskanego w Klinice Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii, Żywienia, Alergologii i Pulmonologii Uniwersyteckiego Dziecięcego Szpitala Klinicznego w Białymstoku.



(podpis)  
**KIEROWNIK**  
Kliniki Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii,  
Żywienia, Alergologii i Pulmonologii

*prof. dr hab. n. med. Dariusz M. Lebensztejn*



**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

---

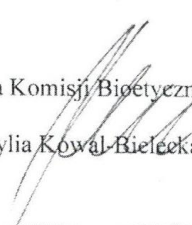
Białystok, 17.12.2020 r.

Uchwała nr: APK.002.464.2020

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 stężenia wybranych lipidów (ceramidów i sfingolipidów) u dzieci z kamicą żółciową” przez dr n. med. Urszulę Daniluk wraz z zespołem badawczym z UMB.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej przy UMB

prof. dr hab. Otylia Kowal-Bielecka



Białystok 02.05.2022

dr hab. n. med. Urszula Daniluk

Klinika Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii, Żywienia i Alergologii

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Ja, Urszula Daniluk, jako Kierownik projektu, na który została wydana zgoda Komisji Bioetycznej w Białymstoku w dniu 17.12.2020 (nr zgody: APK.002.464.2020) wyrażam zgodę na wykorzystanie materiału badawczego w toku mojego projektu przez lek. Katarzynę Zdanowicz. Materiał badawczy zostanie wykorzystany do realizacji badań niezbędnych do przeprowadzenia postępowania o nadanie stopnia doktora lek. Katarzyny Zdanowicz.

