



**Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku
Angielskim**

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

AGNIESZKA MUCHA

**OCENA STĘŻENIA IZOFORM TRANSFERYNY WE KRWI CHORYCH
NA PIERWOTNE ZAPALENIE DRÓG ŻÓŁCIOWYCH ORAZ
ZAPALENIA TRZUSTKI**

Rozprawa doktorska w oparciu o cykl publikacji naukowych

w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu

w dyscyplinie nauki medyczne

Zakład Diagnostyki Biochemicznej

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Promotor: Prof. dr hab. Lech Chrostek

Białystok 2022 r.

Składam podziękowania Panu Prof. dr hab. Lechowi Chrostkowi za poświęcony czas,
opiekę naukową i cenne wskazówki
oraz Wszystkim, którzy przyczynili się do powstania tej pracy.

SPIS TREŚCI

1. Wykaz dorobku naukowego.....	5
1.1. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską.....	6
1.2. Wykaz innych publikacji.....	7
1.3. Streszczenia zjazdowe.....	8
2. Wykaz skrótów.....	9
3. Wstęp.....	10
3.1. Pierwotne zapalenie dróg żółciowych.....	10
3.1.1. Diagnostyka pierwotnego zapalenia dróg żółciowych.....	11
3.2. Ostre zapalenie trzustki.....	12
3.2.1. Diagnostyka ostrego zapalenia trzustki.....	13
3.3. Przewlekłe zapalenie trzustki.....	13
3.3.1. Diagnostyka przewlekłego zapalenia trzustki.....	14
3.4. Glikozylacja białek.....	14
3.5. Transferyna.....	15
3.5.1. Izoformy transferyny.....	15
4. Cel pracy.....	17
5. Materiał i metody.....	18
5.1. Materiał.....	18
5.2. Grupa badana.....	18
5.3. Grupa kontrolna.....	19
5.4. Metody.....	19
5.5. Statystyka.....	20
6. Wyniki.....	21

6.1. Publikacja nr 1 – „Changed profile of serum transferrin isoforms in primary biliary cholangitis”.....	21
6.2. Publikacja nr 2 – „The serum profile of transferrin isoforms in pancreatitis”.....	22
7. Dyskusja.....	23
8. Wnioski.....	28
9. Piśmiennictwo.....	29
10. Streszczenie w języku polskim.....	34
11. Streszczenie w języku angielskim.....	36
12. Publikacja nr 1 - „Changed profile of serum transferrin isoforms in primary biliary cholangitis”.....	38
13. Publikacja nr 2 – „The serum profile of transferrin isoforms in pancreatitis”.....	48
14. Zgoda Komisji Bioetycznej.....	55
15. Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej.....	57
16. Oświadczenia współautorów publikacji.....	58
17. Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacjach wraz z szacunkowym określeniem procentowego wkładu.....	65

1. Wykaz dorobku naukowego

Rodzaj publikacji	Liczba	Impact Factor	Punktacja MNiSW
Publikacje włączone do rozprawy doktorskiej	2	9,206	280
Publikacje, które nie zostały włączone do rozprawy doktorskiej	2	9,081	240
Streszczenia zjazdowe			
Polskie	2	-	-
Zagraniczne	1		
Razem	7	18,287	520

1.1. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

Prace oryginalne

Grytczuk A. (obecnie Mucha A.), Bauer A., Gruszewska E., Cylwik B., Chrostek L.: Changed Profile of Serum Transferrin Isoforms in Primary Biliary Cholangitis. *Journal of Clinical Medicine*. 2020, 9(9), 2894.

IF: 4,242 MNiSW: 140,000

Mucha A., Żaczek M., Kralisz M., Gruszewska E., Cylwik B., Panasiuk A., Chrostek L.: The Serum Profile of Transferrin Isoforms in Pancreatitis. *Journal of Clinical Medicine*. 2022, 11(6), 1638.

IF: 4,964 MNiSW: 140,000

1.2. Wykaz innych publikacji

Praca oryginalna

Przekop D., Klapaczyński J., **Gryczuk A.**, Gruszewska E., Gietka A., Panasiuk A., Golaszewski S., Cylwik B., Chrostek L.: Non-Invasive Indirect Markers of Liver Fibrosis after Interferon-Free Treatment for Hepatitis C. *Journal of Clinical Medicine*, 2021, 10(17):3951.

Praca przeglądowa

Gruszewska E., **Gryczuk A.**, Chrostek L.: Glycosylation in viral hepatitis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2021, 1865(11), 129997.

1.3. Streszczenia zjazdowe

Grytczuk A., Surazyńska A., Drozdowska D.: Examination of the triazine nitrogen mustard analogues influence on DNA topoisomerase activity. VI International Students' Conference of Young Medical Researches, Wrocław, 31.03-2.04.2016. Book of Abstracts, s. 41.

VI International Students' Conference of Young Medical Researchers, Wrocław, 31.03-2.04.2016.

Surazyńska A., **Grytczuk A.**, Pućkowska A., Drozdowska D.: Investigation of interactions of new bis-benzamides analogues with DNA. VI International Students' Conference of Young Medical Researches, Wrocław, 31.03-2.04.2016. Book of Abstracts, s. 45.

VI International Students' Conference of Young Medical Researches, Wrocław, 31.03-2.04.2016.

Ławicki S., **Grytczuk A.**, Gruszewska E., Panasiuk A., Cylwik B., Chrostek L.: Serum profile of lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase in alcoholic liver disease. *Clinica Chimica Acta*, 2022: 530, Suppl. 1, s. S191-S192.

24th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 16th Asia-Pacific Federation of Clinical Chemistry, Seoul, Korea, 26-30.06.2022.

2. Wykaz skrótów

ALP – Fosfataza alkaliczna

ALT - Aminotransferaza alaninowa

AMA – Przeciwciała przeciwmitochondrialne

ANA – Przeciwciała przeciwjądrowe

AST – Aminotransferaza asparaginianowa

CDT - Ubogowęglowodanowe izoformy transferyny, transferyna desialowana

EASL - European Association for the Study of the Liver

ECPW - Endoskopowa cholangiopankreatografia wsteczna

EUS – Ultrasonografia endoskopowa

GGT - Gamma-glutamylotransferaza

LDH – Dehydrogenaza mleczanowa

MRCP - Cholangiopankreatografia rezonansu magnetycznego

OZT – Ostre zapalenie trzustki

PBC – Pierwotne zapalenie dróg żółciowych

PCT – Prokalcytonina

PZT – Przewlekłe zapalenie trzustki

Tf – Transferyna

TK – Tomografia komputerowa

3. Wstęp

Większość białek we krwi jest związanych z glikanami, tworząc glikoproteiny, różniące się strukturą zarówno części białkowej jak i węglowodanowej, co jest podstawą wyodrębnienia specyficznych izoform. Oznaczanie izoform białek w chorobach może przynieść więcej korzyści diagnostycznych niż oznaczanie całkowitych ich stężeń, poprzez ograniczenie konieczności wykonania badań inwazyjnych, zmniejszenie kosztów i przyspieszenie rozpoznania, co umożliwia wcześniejsze wdrożenie leczenia. Ponadto, oznaczanie stężeń izoform białek/glikoprotein może mieć znaczenie w diagnostyce różnicowej czy też ocenie stopnia zaawansowania choroby. Na przykładzie mikroheterogenności transferyny udowodniono już swoiste zmiany stężeń jej izoform we krwi m.in. w chorobach wątroby [1,2], w nowotworach trzustki [3], czy w chorobach reumatycznych [4-6]. Dodatkowo, w niektórych chorobach stężenia izoform zmieniały się w zależności od stopnia histologicznego zaawansowania choroby czy aktywności choroby. W tej pracy, stanowiącej cykl publikacji, skupiłam się na poznaniu profilu izoform transferyny w chorobie, której diagnostyka i/lub monitorowanie przysparza wielu trudności, czyli w pierwotnym zapaleniu dróg żółciowych oraz w ostrym i przewlekłym zapaleniu trzustki, którego diagnostyka kliniczna i laboratoryjna jest dobrze udokumentowana i stosowana w praktyce.

3.1. Pierwotne zapalenie dróg żółciowych

Pierwotne zapalenie dróg żółciowych (ang. primary biliary cholangitis, PBC), dawniej znane jako pierwotna marskość żółciowa wątroby, jest przewlekłą chorobą wewnątrzwątrobowych dróg żółciowych, o podłożu autoimmunologicznym, przebiegającą z zapaleniem, cholestazą i retencją kwasów żółciowych [7]. Wieloletni proces uszkodzenia drobnych przewodników żółciowych wewnątrzwątrobowych przez komórki zapalne, głównie limfocyty, prowadzi do upośledzenia wydzielania żółci z wątroby - cholestazy. Zatrzymywanie i akumulacja hydrofobowych kwasów żółciowych, takich jak kwas cholowy i kwas chenodeoksycholowy, prowadzi do uszkodzenia hepatocytów. W zaawansowanym etapie choroby u części pacjentów dochodzi do włóknienia i marskości wątroby [8,9]. Chorują głównie kobiety w 5. i 6. dekadzie życia [10]. Częstość występowania waha się od 1,91 do 40,2 na 100 000 osób [11]. Nawet do 50-60% pacjentów w momencie rozpoznania nie ma objawów klinicznych, co opóźnia rozpoznanie choroby [12]. Wśród symptomów tej choroby można wymienić przewlekłe zmęczenie (u ok. 80% pacjentów), świąd skóry (obecny

u 40-80% chorych) [13], ból w prawej okolicy podżebrowej, hepatomegalia, przebarwienia skórne, żółtaki (wynikające z zaburzeń gospodarki lipidowej), suchość spojówek i jamy ustnej, żółtaczka (w zaawansowanym etapie choroby) [14]. PBC często towarzyszą inne choroby autoimmunologiczne m.in. zespół Sjögrena, autoimmunologiczne choroby tarczycy, twardzina układowa czy reumatoidalne zapalenie stawów [13].

3.1.1. Diagnostyka pierwotnego zapalenia dróg żółciowych

Diagnostyka PBC często jest skomplikowana i wymaga różnicowania z innymi chorobami przebiegającymi z uszkodzeniem dróg żółciowych m.in. z pierwotnym stwardniającym zapaleniem dróg żółciowych (PSC) czy też obecnością przeszkód mechanicznych w drogach żółciowych. Do rozpoznania PBC niezbędne jest spełnienie minimum dwóch z trzech kryteriów diagnostycznych: podwyższona aktywność ALP; obecność autoprzeciwciał AMA (miano >1:40) i/lub innych specyficznych dla PBC przeciwciał ANA - anty-sp100, anty-gp210; obecność w badaniu wycinka biopsyjnego nieropnego, destrukcyjnego zapalenia dróg żółciowych oraz destrukcji małych i/lub średnich przewodów żółciowych [15]. Wśród badań biochemicznych najbardziej typową nieprawidłowością jest zwiększona aktywność ALP i GGT. Często również występuje zwiększona aktywność AST, ALT i podwyższone stężenia immunoglobulin – szczególnie klasy IgM. Hiperbilirubinemia pojawia się zwykle w zaawansowanej chorobie [10,14]. Do zróżnicowania cholestazy zewnątrzwątrobowej od wewnątrzwątrobowej zalecane jest badanie USG. W przypadku konieczności poszerzenia diagnostyki o inne badania obrazowe rekomendowane jest wykonanie m.in. cholangiopankreatografii rezonansu magnetycznego (MRCP) czy ultrasonografii endoskopowej (EUS). W ocenie stopnia włóknienia pomocne jest badanie elastograficzne [15]. Badanie histopatologiczne bioptatów wątroby w większości przypadków nie jest wymagane do postawienia rozpoznania u pacjentów z laboratoryjnymi cechami cholestazy oraz obecnością we krwi wysokospecyficznych autoprzeciwciał AMA, jednakże rozstrzyga o rozpoznaniu w przypadku osób bez autoprzeciwciał [12]. Pomimo wielu zalet biopsja wątroby jest badaniem inwazyjnym i wiąże się z ryzykiem wystąpienia powikłań takich jak m.in. ból, krwawienia, infekcje bakteryjne, odma, czy zapalenia otrzewnej [16]. Do oceny zaawansowania histologicznego PBC standardowo wykorzystywane są czterostopniowe skale, takie jak klasyfikacja Ludwiga.

Tabela 1. Skala zaawansowania włóknienia wątroby wg. Ludwiga [17].

Stopień	Skala wg. Ludwiga
I	Zapalenie przestrzeni wrotnych
II	Zapalenie wrotne oraz okołowrotne bez tworzenia przegród włóknistych i martwicy mostkującej
III	Włóknienie zrazików i/lub martwica mostkująca
IV	Marskość

3.2. Ostre zapalenie trzustki

Ostre zapalenie trzustki (ang. acute pancreatitis, OZT) jest ostrym stanem zapalnym trzustki. Pojawienie się reakcji zapalnej jest związane z przedwczesną aktywacją proenzymów trzustkowych. Pod wpływem aktywnych enzymów dochodzi do samotrąwienia trzustki i sąsiadujących tkanek. Różnego stopnia uszkodzenia powstają w okolicznych tkankach, a nieraz także i w odległych narządach. Roczna zachorowalność na OZT wg. różnych źródeł waha się od 13 do 56 na 100 000 osób [18-20]. W Polsce współczynnik zachorowalności jest nieco wyższy – 72,1 na 100 000 osób [21]. Śmiertelność wynosi 5-17% w ciężkiej postaci OZT, i 1,5% w łagodnej [18]. Za ok. 70-80% zachorowań odpowiadają łącznie kamica żółciowa (21-50%) [22,23] i alkohol (16-41%) [18,24,25]. Do rzadszych czynników etiologicznych OZT należą: hipertriglicerydemia, leki, urazy jamy brzusznej, dziedziczenie OZT, hiperkalcemia, infekcje, guzy i wrodzone wady trzustki, choroby autoimmunologiczne, jatrogenne (endoskopowa cholangiopankreatografia wsteczna ECPW) [18,22,24,25] oraz czynniki nieznane (idiopatyczne). Najczęstszym objawem jest pojawiający się nagle silny ból w górnej części brzucha, promieniujący do pleców, któremu towarzyszą nudności, wymioty i gorączka. U chorych może też wystąpić przyspieszony puls, napięcie i tkliwość brzucha przy dotyku, hipotensja, letarg, żółtaczka [24,26]. Występują 2 postaci OZT:

- śródmiąższowe obrzękowe OZT – występuje u 80-90% pacjentów i przebiega łagodniej. Charakteryzuje się powiększeniem trzustki w wyniku obrzęku zapalnego; obecne mogą być również ostre okołotrzustkowe zbiorniki płynu.
- martwicze OZT – w badaniach obecna martwica mięszu trzustki i/lub tkanek okołotrzustkowych; cechuje się ciężkim przebiegiem choroby [24,27].

3.2.1. Diagnostyka ostrego zapalenia trzustki

Podstawą diagnostyki laboratoryjnej przyczyniającą się do rozpoznania OZT jest 3-krotny wzrost powyżej górnej granicy wartości referencyjnych aktywności amylazy lub lipazy, przy czym lipaza jest bardziej swoistym markerem dla OZT i utrzymuje się we krwi przez dłuższy czas [23,25]. Wśród innych badań wykonywanych u pacjentów z podejrzeniem OZT można wymienić: amylazę w moczu, elastazę w kale, morfologię krwi. Stosowane są również wskaźniki oznaczane we krwi obrazujące ciężkość choroby lub ryzyko wystąpienia powikłań: próby wątrobowe (mogą świadczyć o etiologii żółciowej OZT): AST, ALT, ALP, GGT, bilirubina, LDH; wskaźniki stanu zapalnego (leukocytoza, CRP, PCT); czas protrombinowy, zwiększone stężenie mocznika, kreatyniny, glukozy, obniżone stężenie albuminy i wapnia [18,20,23,24]. Podstawowym nieinwazyjnym badaniem obrazowym wykonywanym u pacjentów z podejrzeniem OZT jest USG jamy brzusznej [26], ponieważ nawet do 50% przypadków OZT jest związana z obecnością kamieni żółciowych [20]. Tomografia komputerowa (TK) z kontrastem nie jest badaniem rutynowym, a wykonanie jej jest bezzasadne u osób z łagodnym OZT i bez powikłań. W przypadkach, gdy ustalenie czynnika etiologicznego OZT jest trudne i nie ma wyraźnego potwierdzenia obecności kamicy, zalecane jest wykonanie badania MRCP i EUS. Obie metody wykazują bardzo wysoką czułość i specyficzność w diagnozowaniu kamicy przewodu żółciowego. Metoda inwazyjna, jaką jest endoskopowa cholangiopankreatografia wsteczna (ECPW) nie jest standardowo stosowana w OZT [23].

3.3. Przewlekłe zapalenie trzustki

Przewlekłe zapalenie trzustki (ang. chronic pancreatitis, PZT) jest przewlekłą chorobą zapalną trzustki charakteryzującą się postępującym, nieodwracalnym włóknieniem mięszu trzustki, co prowadzi do niewydolności zewnątrz- i wewnątrzwydzielniczej trzustki. Częstość występowania PZT to około 0,2-0,6% populacji [28]. Roczna zachorowalność waha od 5 do 14 na 100 000 osób [19,29]. Na PZT chorują przeważnie osoby między 40 a 60 rokiem życia, przy czym choroba częściej występuje u mężczyzn [30]. Czynniki etiologiczne PZT wg. systemu TIGAR-O zostały podzielone na kilka grup: toksyczno-metaboliczne (alkohol, palenie tytoniu, hiperkalcemia, leki i toksyny, hiperlipidemia, przewlekła niewydolność nerek), idiopatyczne (o wczesnym i późnym początku, tropikalne), genetyczne (mutacje genów m.in. PRSS1, CFTR, SPINK1), autoimmunologiczne, nawracające i ciężkie OZT (ciężkie martwicze OZT, choroby naczyń, niedokrwienie, popromienne), zaporowe (trzustka

dwudzielną, niedrożność przewodu trzustkowego np. z powodu guza, zaburzenia zwieracza Oddiego) [29]. Nadużywanie alkoholu jest główną przyczyną PZT i stanowi ok. 70-80% wszystkich przypadków [30]. Najczęstszym objawem klinicznym (występuje u 85% pacjentów) jest ból w nadbrzuszu, nasilający się po posiłkach, promieniujący do pleców. Często towarzyszą mu nudności i wymioty. Kliniką oznaką niewydolności zewnątrzwydzielniczej trzustki jest biegunka tłuszczowa. U chorych pojawiają się też zaburzenia gospodarki węglowodanowej, w tym cukrzyca [31], a także nawracające epizody łagodnej żółtaczki [32].

3.3.1. Diagnostyka przewlekłego zapalenia trzustki

Nie ma uniwersalnego „złotego standardu” diagnostycznego dla PZT. Rozpoznanie PZT jest często oczywiste w zaawansowanym okresie choroby, jednak we wczesnym stadium diagnostyka jest trudna i oparta na połączeniu kilku metod diagnostycznych. Wśród badań laboratoryjnych obserwuje się umiarkowany wzrost aktywności amylazy i lipazy lub są one w normie. Badaniami obrazowymi wykonywanymi w pierwszej kolejności jest USG i TK, jednak USG ma dosyć niską czułość na poziomie 60-70% [33]. TK umożliwia uzyskanie informacji klinicznych dotyczących mięszu trzustki (np. wykrycia zwapnień), przewodu trzustkowego (poszerzenie lub zwężenie) czy też obecności pseudotorbieli [29]. MRCP obrazuje przewód trzustkowy, uwidacznia poszerzenia i zwężenia, a podanie dożylnie sekretyny zapewnia jeszcze lepszą wizualizację nieprawidłowości przewodu trzustkowego i jego gałęzi [32]. Do inwazyjnych metod obrazowych należą EUS i ECPW. EUS charakteryzuje się wysoką czułością w obrazowaniu mięszu i przewodów trzustkowych, w szczególności we wczesnych stadiach choroby [32,33]. ECPW umożliwia uwidocznienie poszerzenia lub zwężeń przewodu trzustkowego i jego odgałęzień oraz usunięcie kamieni i złogów, nie pozwala jednak na ocenę mięszu trzustki. [34]. W diagnostyce PZT stosowane są też testy czynnościowe. Bezpośrednim badaniem, oceniającym zewnątrzwydzielniczą zdolność trzustki jest test sekretynowo-cholecystokininowy. Częściej wykonywane są testy pośrednie np. oznaczanie stężenia elastazy 1 w kale. Innym testem jest ocena wydalania tłuszczu z kałem. Przyczynia się on do potwierdzenia zaburzeń wchłaniania tłuszczów, w tym do zdiagnozowania biegunki tłuszczowej [31,32].

3.4. Glikozylacja białek

Glikozylacja to ko- i potranslacyjna modyfikacja białek, ulega jej większość białek w organizmie. Polega na tworzeniu glikoprotein poprzez przyłączenie wiązaniem

kowalencyjnym (N-glikozydowym lub O-glikozydowym) łańcuchów cukrowych do polipeptydów [35]. Glikozylacja zachodzi przy udziale enzymów, które można podzielić na 2 grupy:

- glikozylotransferazy, których zadaniem jest przyłączanie nowych reszt cukrowych,
- glikozydazy, które hydrolizują wiązania glikozydowe oraz odłączają reszty cukrowe.

Enzymy te wykazują swoistość wobec przyłączanej reszty cukrowej, a także typu wiązania, które tworzą bądź hydrolizują. Budowa glikanów, łączących się z łańcuchem polipeptydowym, jest uwarunkowana współdziałaniem tych enzymów. Glikany składają się z kilku lub kilkudziesięciu reszt cukrowych takich jak: N-acetyloglukozamina, fukoza, galaktoza, mannoza i kwas sjałowy [36]. N-glikozylacja to proces kilkusetapowy zachodzący w cytoplazmie, siateczce endoplazmatycznej, a na końcu w aparacie Golgiego [36,37].

3.5. Transferyna

Transferyna (TF) to glikoproteina, o masie cząsteczkowej 79,6 kDa, transportująca jony żelaza w organizmie (posiada 2 miejsca wiązania żelaza). Jest syntetyzowana głównie w wątrobie [38]. Transferyna to białko ostrej fazy, którego stężenie zmniejsza się w stanach zapalnych [39]. W skład cząsteczki transferyny wchodzi 3 podjednostki strukturalne: pojedynczy łańcuch polipeptydowy (zbudowany z 679 aminokwasów) oraz 2, przyłączone do niego wiązaniem N-glikozydowym, boczne, rozgałęzione łańcuchy oligosacharydowe [38]. Każda z podjednostek charakteryzuje się zmiennością budowy, nawet w warunkach fizjologicznych. Heterogenność cząsteczki transferyny jest wyrażana na kilka sposobów: genetycznym polimorfizmem (występuje 38 wariantów genetycznych Tf), różnicą w ilości transportowanych jonów żelaza, a także zmiennością budowy łańcuchów oligosacharydowych, które w zależności od stopnia rozgałęzienia tworzą struktury 2-, 3-lub 4-antenarne. Każdy łańcuch oligosacharydowy zawiera N-acetyloglukozaminę, mannozę, galaktozę oraz kwas sjałowy [38,40].

3.5.1. Izofomy transferyny

W zależności od liczby reszt kwasu sjałowego, przyłączonych do łańcuchów oligosacharydowych, można wyróżnić 9 izoform Tf: od asjałotransferyny do oktasjałotransferyny. Dominującą izoformą Tf we krwi osób zdrowych jest tetrasjałotransferyna (64-80%) [41]. Izofomy Tf ze zmniejszoną ilością kwasu sjałowego (a-, mono- i disjałotransferyna) znane są jako transferyna desjałowana (CDT,

ubogowęglowodanowe izoformy transferyny). CDT jest uznanym markerem nadużywania alkoholu [42,43]. W różnych schorzeniach m.in. chorobach wątroby, rakach trzustki czy chorobach reumatycznych profil izoform transferyny może się zmieniać i przedstawiać charakterystyczne obrazy dla danych chorób [1-6].

4. Cel pracy

Wykorzystanie profili izoform glikoprotein, jako nieinwazyjnego biomarkera, może mieć potencjalne znaczenie w rozpoznawaniu chorób, diagnostyce różnicowej czy też ocenie stopnia zaawansowania i aktywności stanów chorobowych. Wiadomo, że zmiany w glikozylacji białek występują w różnych chorobach, w tym w stanach zapalnych, czego skutkiem są ilościowe zmiany izoform glikoprotein. Jedną z wysoce zmiennych glikoprotein, która cechuje się mikroheterogennością jest transferyna. Ta mikroheterogenność wynika z różnic w strukturze łańcuchów oligosacharydowych. Profil izoform transferyny został już poznany w wielu chorobach m.in. w chorobach wątroby [1,2], nowotworach trzustki [3] i chorobach reumatycznych [4-6].

Celem niniejszej pracy jest oznaczenie stężeń izoform transferyny w surowicy krwi w pierwotnym zapaleniu dróg żółciowych oraz ostrym i przewlekłym zapaleniu trzustki.

Cele szczegółowe:

1. Porównanie stężenia całkowitego transferyny oraz jej izoform w surowicy pomiędzy grupą osób z PBC, z cholestazą zewnątrzwątrobową oraz grupą kontrolną.
2. Ocena stężenia izoform transferyny w surowicy krwi pacjentów z PBC w zależności od stopnia histologicznego zaawansowania choroby w skali Ludwiga.
3. Porównanie stężenia całkowitego transferyny i jej izoform w surowicy pomiędzy grupą pacjentów z OZT, PZT i grupą kontrolną.
4. Porównanie stężenia izoform transferyny w surowicy krwi w zależności od postaci morfologicznej i etiologii OZT.
5. Porównanie profilu izoform transferyny w zapaleniach trzustki z profilami w innych chorobach na podstawie literatury: nowotworach trzustki, przewlekłych zapaleniach wątroby, chorobach reumatycznych.

5. Materiał i metody

5.1. Materiał

Materiałem do badań była krew pobrana przez nakłucie żyły. Krew pobrano od pacjentów z pierwotnym zapaleniem dróg żółciowych, cholestazą zewnątrzwątrobową, ostrym i przewlekłym zapaleniem trzustki oraz od osób zdrowych. Próbki krwi (7 ml) zostały pobrane „na skrzep”, a następnie odwirowane przy 1500g przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Surowice przechowywano do czasu analizy w temperaturze -86 °C. Dodatkowo, w grupie pacjentów z OZT i PZT oraz w grupie kontrolnej zostały pobrane 2 próbki na antykoagulant: EDTA-K2 – do testów hematologicznych oraz na cytrynian sodu – do testów krzepnięcia.

5.2. Grupa badana

Do badań w kierunku PBC został wykorzystany materiał kolekcjonowany w Zakładzie Biochemii i Biologii Molekularnej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie. Materiał pochodził od pacjentów leczonych w Klinice Gastroenterologii, Hepatologii i Onkologii Klinicznej, CMKP w Warszawie. W grupie badanej znalazło się 76 pacjentów z pierwotnym zapaleniem dróg żółciowych. PBC zostało zdiagnozowane zgodnie z wytycznymi EASL – European Association for the Study of the Liver [7]. Każdemu pacjentowi wykonano badanie USG jamy brzusznej, badania biochemiczne, serologiczne w kierunku AMA-M2 i specyficznych dla PBC przeciwciał ANA oraz biopsję wątroby. Stopień zaawansowania histologicznego choroby oceniono za pomocą skali Ludwiga. Liczba pacjentów w poszczególnych stadiach wg. klasyfikacji Ludwiga: stopień 1 – 13 osób, stopień 2 – 36 osób, stopień 3-16 osób, stopień 4- 11 osób. Dodatkowo przebadano 44 pacjentów z rakiem brodawki Vatera jako przykład cholestazy zewnątrzwątrobowej.

Grupa badana w kierunku OZT i PZT to pacjenci hospitalizowani w Oddziale Gastroenterologii, Hepatologii i Chorób Wewnętrznych z Ośrodkiem Diagnostyki i Leczenia Endoskopowego Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego w Białymstoku – 84 pacjentów z OZT i 42 z PZT. Postać śródmiąższowo-obrzękową jak i postać martwiczą OZT rozpoznano u 42 osób. OZT o etiologii alkoholowej zdiagnozowano u 21 pacjentów. Inne przyczyny to: kamica żółciowa, hipertriglicydemia, leki lub nieznana przyczyna. Rozpoznanie postawiono na podstawie objawów klinicznych oraz szeregu analiz: badania krwi (enzymy wątrobowe,

trzustkowe, morfologia krwi), kału, USG jamy brzusznej, tomografii komputerowej, rezonansu magnetycznego, ultrasonografii endoskopowej i ECPW.

5.3. Grupa kontrolna

W badaniach dotyczących stężenia izoform transferyny w PBC, grupę kontrolną stworzono z 40 zdrowych, dorosłych dawców krwi z Warszawskiego Banku Krwi, natomiast w badaniach dotyczących zapaleń trzustki - 30 osób zgłaszających się na badania okresowe do Poradni Medycyny Pracy Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Białymstoku.

Badania te zostały zaakceptowane przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Zgoda Komisji Bioetycznej: APK.002.67.2020 oraz R-I-002/563/2019.

5.4. Metody

- Stężenie izoform transferyny zostało oznaczone za pomocą zestawu odczynników MINICAP CDT metodą elektroforezy kapilarnej na aparacie MINICAP firmy Sebia. Izoformy transferyny zostały rozdzielone na podstawie ich mobilności elektroforetycznej w buforze alkalicznym o pH 8,8 na 5 frakcji: asjalotransferyna, disjalotransferyna, trisjalotransferyna, tetrasjalotransferyna i pentasjalotransferyna.
- Stężenie całkowite transferyny zostało oznaczone na aparacie Architect ci8200 metodą immunoturbidymetryczną oraz na analizatorze Cobas c501.
- Stężenie kwasów żółciowych zostało oznaczone za pomocą zestawu odczynników Diazyme Total Bile Acids Assay, Diazyme Laboratories metodą cykli enzymatycznych na analizatorze Indiko Plus.
- Aktywność amylazy, lipazy, ALT, AST, ALP, GGT i stężenie glukozy, albuminy, bilirubiny, CRP, cholesterolu i triglicerydów zostało oznaczone na analizatorze Cobas c501.
- Liczbę płytek krwi (PLT) oznaczono na analizatorze Sysmex XS-800i.
- Czas protrombinowy (PT) oznaczono na analizatorze STA Compact MAX firmy Stago metodą wiskozymetryczną.
- Autoprzeciwciała zostały oznaczone metodą ELISA (anty-sp100 – zestaw IMTEC-Sp100-Antibodies, ITC 660040 IMTEC; anty-gp210 – zestaw QUANTA Lite gp210, Inova Diagnostics; anty-AMA-M2 – zestaw IMTEC-AMA M2, HUMAN-IMTEC; anty-Ro-52 – zestaw QUANTA Lite SS-A 52 ELISA, Inova Diagnostics; p/ciała anty-centromerowe – zestaw ACA-QUANTA Lite Centromere ELISA, Inova Diagnostics. Gęstość optyczna

została zmierzona na automatycznym czytniku płytek Multiscan RC, Labsystem. Oznaczenie anty-p62 zostało wykonane wg. procedury opisanej przez A. Bauer i A. Habior [44].

5.5. Statystyka

Wyniki zostały wyrażone jako średnie i odchylenia standardowe. Oceny statystycznej wyników dokonano za pomocą testów:

- Do oceny istotności różnic pomiędzy grupą badaną oraz grupą kontrolną został wykorzystany nieparametryczny test dla prób niezależnych U Manna-Whitneya,
- Do oceny istotności różnic wartości badanych parametrów w zależności od stopnia zaawansowania histologicznego PBC w skali Ludwiga zastosowano test ANOVA rang Kruskala-Wallisa,
- Do oceny korelacji pomiędzy izoformami transferyny a innymi testami laboratoryjnymi użyto współczynnika korelacji rang Spearmana.

Za poziom istotności statystycznej przyjęto wartość $p < 0,05$.

6. Wyniki

Wyniki badań, które wchodzą w skład rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w międzynarodowym czasopiśmie – Journal of Clinical Medicine.

6.1. Publikacja nr 1 - „Changed profile of serum transferrin isoforms in primary biliary cholangitis”

W pracy wykazano różnice stężeń izoform transferyny u chorych na PBC w porównaniu do osób zdrowych. Stężenia disjalotransferyny i trisjalotransferyny u pacjentów z PBC były istotnie niższe niż u osób zdrowych ($p < 0,000$ i $p = 0,011$), natomiast w stężeniach izoform wyżej usjalowanych: tetra- i pentasjalotransferyny nie wykazano istotnych różnic. W cholestazie pozawątrobowej stężenia disjalotransferyny i tetrasjalotransferyny były istotnie wyższe niż w grupie pacjentów z pierwotnym zapaleniem dróg żółciowych ($p < 0,001$ i $p < 0,001$), natomiast stężenie pentasjalotransferyny było istotnie niższe niż u osób z PBC ($p < 0,001$). Nie wykazano zmian izoform transferyny w zależności od histologicznego stopnia zaawansowania PBC w klasyfikacji Ludwiga ($p > 0,05$ dla wszystkich porównań). Ponadto, wykazano istotny wzrost stężenia transferyny całkowitej w surowicy pacjentów z PBC w porównaniu z grupą kontrolną ($p = 0,019$), ale nie zmieniało się ono w zależności od stopnia zaawansowania choroby ($p = 0,229$). Stężenie transferyny w cholestazie zewnątrzwątrobowej było istotnie niższe zarówno w stosunku do grupy kontrolnej jak i grupy osób z PBC (dla obu porównań $p < 0,001$).

Wykazano zmiany wartości testów charakteryzujących grupę badaną. Stężenie kwasów żółciowych w surowicy wzrosło istotnie w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,001$), lecz nie zmieniło się istotnie wraz z zaawansowaniem niewydolności histologicznej wątroby wg. skali Ludwiga ($p = 0,305$). Stężenie kwasów żółciowych u osób z rakiem brodawki Vatera było istotnie statystycznie wyższe niż u osób zdrowych (ok. 30 razy wyższe) i w grupie chorych na PBC (ok. 3 razy wyższe) (dla obu porównań $p < 0,001$). Ponadto wykazano, iż stopień zaawansowania choroby miał wpływ na aktywność ALP i GGT ($p = 0,002$ i $p = 0,013$) oraz na stężenie albumin ($p = 0,005$). Analiza post-hoc wykazała, że aktywność GGT i ALP w 3 stopniu zaawansowania choroby była istotnie wyższa niż w stopniu 1 ($p = 0,008$ i $p = 0,006$), aktywność ALP w stopniu 4 była istotnie wyższa niż w stopniu 1 ($p = 0,015$), natomiast stężenie albuminy w stopniu 3 było niższe niż w stopniu 2 ($p = 0,039$). Współczynnik korelacji

rang Spearmana nie wykazał istnienia współzależności stężenia kwasów żółciowych z transferyną i poszczególnymi frakcjami transferyny (dla wszystkich porównań $p > 0,05$).

6.2. Publikacja nr 2 – „The Serum Profile of Transferrin Isoforms in Pancreatitis”

W pracy wykazano istotne zmniejszenie stężenia pentasjalotransferyny w grupie chorych na OZT jak i PZT w stosunku do grupy kontrolnej ($p=0,003$ i $p=0,026$). Stężenie tetrasjalotransferyny było istotnie wyższe w grupie osób z OZT niż w grupie kontrolnej ($p=0,011$), natomiast stężenie trisjalotransferyny nie zmieniło się istotnie w żadnej z badanych grup (OZT i PZT) w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio $p=0,722$ i $p=0,273$). W pracy nie wykazano istotnych statystycznie różnic w stężeniach izoform transferyny pomiędzy grupami z OZT i PZT. Stężenie transferyny całkowitej było istotnie niższe w grupach z ostrym i przewlekłym zapaleniem trzustki w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio $p < 0,001$ i $p=0,002$). Ponadto, w grupie pacjentów z OZT stężenie transferyny było istotnie niższe niż w grupie pacjentów z PZT ($p=0,028$).

Nie stwierdzono obecności istotnych statystycznie różnic w zakresie wszystkich badanych parametrów (w tym izoform transferyny) pomiędzy śródmiąższową obrzękową oraz martwiczą postacią OZT. Biorąc pod uwagę etiologię OZT, zaobserwowano istotnie wyższe stężenie kwasów żółciowych ($p=0,036$) i aktywność GGT ($p=0,017$) w etiologii alkoholowej niż w ostrym zapaleniu trzustki o innych etiologiach.

Wykazano zmiany wartości testów charakteryzujących pacjentów. W grupie chorych na ostre zapalenie trzustki wartości takich parametrów jak: MCV, INR, AST, ALT, ALP, GGT, amylaza, lipaza, CRP, CDT były istotnie wyższe, natomiast stężenie cholesterolu było istotnie niższe niż w grupie osób zdrowych. W grupie pacjentów z przewlekłym zapaleniem trzustki aktywność GGT, ALP i stężenie CRP były istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej.

7. Dyskusja

W niniejszej pracy celem było oznaczenie stężeń izoform transferyny w surowicy krwi w pierwotnym zapaleniu dróg żółciowych oraz ostrym i przewlekłym zapaleniu trzustki. Przesłanką tych badań były liczne dowody naukowe potwierdzające zmiany w procesie glikozylacji białek, w tym transferyny, w zapaleniach o różnej etiologii. Analiza profili glikozylacji glikoprotein w poszczególnych chorobach daje nadzieję na znalezienie prostego i łatwo dostępnego nieinwazyjnego wskaźnika o znaczeniu biomarkera, który oznaczany we krwi mógłby być wykorzystany zarówno w diagnostyce podstawowej jak i różnicowej schorzeń, a także w ocenie stopnia zaawansowania chorób, ich aktywności czy też w monitorowaniu leczenia. Niektóre choroby wątroby czy trzustki przez pewien okres czasu mogą rozwijać się bezobjawowo, pomimo trwającego już w ich obrębie stanu zapalnego, przez co są wykrywane w zaawansowanym stadium. W PBC u 50-60% osób w chwili rozpoznania nie występują żadne objawy kliniczne [12]. W przypadku PZT średni okres czasu od wystąpienia objawów do diagnozy w etiologii alkoholowej to 30-55 miesięcy, natomiast w innej etiologii - 81 miesięcy, więc rozpoznanie jest często ustalane już po wystąpieniu powikłań [29].

W PBC, podobnie jak w innych chorobach wątroby przebiegających z cholestazą, dochodzi do zatrzymania i akumulacji kwasów żółciowych. W związku z tym, że synteza oligosacharydów, dołączanych w procesie glikozylacji do łańcuchów polipeptydowych, zachodzi w siateczce endoplazmatycznej szorstkiej, uszkodzenia błon komórkowych i błon organelli komórkowych spowodowane kwasami żółciowymi, mogą zaburzać syntezę oligosacharydów, a następnie glikoprotein w hepatocytach. Choć mechanizm toksycznego wpływu kwasów żółciowych na wątrobę nie został jeszcze do końca poznany, wiadomo, iż kwasy żółciowe mogą uszkadzać hepatocyty na różne sposoby. Jednym z nich jest indukcja wytwarzania reaktywnych form tlenu. Prowadzi to do oksydacyjnego uszkodzenia komórek, dysfunkcji mitochondium i siateczki endoplazmatycznej [45,46]. Inną drogą jest indukcja apoptozy poprzez aktywację receptora Fas [47]. Ponadto, kwasy żółciowe mogą zaburzać integralność błony komórkowej, poprzez tworzenie agregatów złożonych z kwasów żółciowych i lipidów w zewnętrznej warstwie błony, czego efektem jest powstawanie przejściowych otworów w błonie [48]. Na skutek tych działań rozwija się stan zapalny i zmieniają się stężenia białek ostrej fazy. Ujemnym białkiem ostrej fazy, którego stężenie we krwi w zapaleniach zmniejsza się, jest transferyna [39]. W tym badaniu zaobserwowałam wzrost całkowitego stężenia transferyny w surowicy pacjentów z PBC. Może to wynikać z

bardziej efektywnego uszkodzenia błony komórkowej niż błon organelli, w których dochodzi do syntezy glikoprotein. Poza tym, wpływ transferyny przez przejściowe otwory w błonie utworzone przez agregaty kwasów żółciowych i lipidów może być skuteczniejszy niż zaburzona synteza transferyny w organellach.

Analiza profilu izoform transferyny w PBC wykazała, że zmiany wystąpiły jedynie w izoformach o niższej zawartości kwasu sjałowego (di- i trisjałotransferyna), przy braku zmian w izoformach z większą ilością kwasu sjałowego (tetra- i pentasjałotransferyna). Największy spadek stężenia w porównaniu z grupą osób zdrowych zaobserwowałam w przypadku disjałotransferyny (prawie 3-krotna różnica), znacznie mniejszy w przypadku trisjałotransferyny (o ok. 25%). Nie uzyskałam zmiany stężenia izoform transferyny w zależności od zaawansowania histologicznego według skali Ludwiga. Jedynymi parametrami zależnymi od stopnia zaawansowania choroby były ALP, GGT oraz albumina. Może to być spowodowane faktem, że ALP i GGT to enzymy błonowe, (znajdują się w grupie enzymów ekskrecyjnych), których stężenie/aktywność we krwi jest zależna od drożności dróg żółciowych. W przypadku albuminy należy uwzględnić fakt, iż w jej syntezę zaangażowane są różne organelle w hepatocytach (rybosomy, siateczka endoplazmatyczna i aparat Golgiego). Di- i trisjałotransferyna stanowią mały odsetek całkowitego stężenia transferyny, w związku z czym zmiany odsetkowe ich stężenia nie wpłynęły na zmianę stężenia całkowitego transferyny w surowicy osób z PBC. Zmniejszeniu stężeń di- i trisjałotransferyny nie towarzyszyły zmiany stężeń izoform z większą ilością reszt kwasu sjałowego (tetra-i pentasjałotransferyny). W badaniach wykonanych w Zakładzie Diagnostyki Biochemicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku w przebiegu innych chorób przesunięciu w jednej izoformie towarzyszyło przesunięcie w innej np. przy zwiększonym stężeniu tetrasjałotransferyny występowało obniżone stężenie pentasjałotransferyny u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby [2] i rakiem trzustki [3], z kolei w młodzieńczym idiopatycznym zapaleniu stawów odwrotnie – obniżonemu poziomowi tetrasjałotransferyny towarzyszył podwyższony poziom pentasjałotransferyny [6]. W reumatoidalnym zapaleniu stawów, toczeniu rumieniowatym układowym, twardzinie układowej obniżeniu stężenia tri- i pentasjałotransferyny towarzyszył wzrost tetrasjałotransferyny [4,5]. We wszystkich etapach syntezy i glikozylacji białek biorą udział enzymy. Specyficzne w danej chorobie zmiany aktywności enzymów odpowiadają za charakterystyczny profil izoform transferyny w tym schorzeniu. W związku z tym powstają unikalne dla konkretnej choroby profile izoform transferyny. W celu zweryfikowania

hipotezy, czy w przebiegu PBC zmiany w izoformach transferyny nie są związane z cholestazą, przeprowadzono badania porównawcze z cholestazą zewnątrzwątrobową. Zaobserwowałam statystycznie istotne różnice w profilach izoform transferyny pomiędzy pacjentami z PBC a grupą z cholestazą zewnątrzwątrobową, szczególnie dotyczące izoform o większej zawartości kwasu sjałowego. Stężenie tetrasjałotransferyny w cholestazie zewnątrzwątrobowej były istotnie wyższe niż w grupie z PBC i u osób zdrowych, zaś stężenie pentasjałotransferyny było istotnie niższe niż u pacjentów z PBC i w grupie kontrolnej. Świadczy to o tym, że profil izoform transferyny w PBC jest różny od profilu w cholestazie zewnątrzwątrobowej.

OZT i PZT są to choroby zapalne trzustki. W zapaleniach na skutek zadziałania bodźca zapalnego uruchamiana jest w organizmie nieswoista odpowiedź immunologiczna – reakcja ostrej fazy. Komórki zapalne, takie jak granulocyty i makrofagi, uwalniają cytokiny prozapalne (IL-1, IL-6, TNF- α), które odpowiadają za uruchomienie syntezy białek ostrej fazy. Można je podzielić na dodatnie i ujemne białka ostrej fazy. W stanach zapalnych stężenie dodatnich białek ostrej fazy rośnie, natomiast stężenie ujemnych (w tym transferyny) zmniejsza się [39]. W zapaleniach trzustki zaobserwowałam obniżone stężenie całkowitej transferyny, przy czym w OZT było niższe niż w PZT. Wśród izoform transferyny zmiany dotyczyły głównie izoform z większą ilością kwasu sjałowego. Zarówno w OZT jak i w PZT stężenie pentasjałotransferyny było obniżone w porównaniu z grupą kontrolną zaś stężenie tetrasjałotransferyny było podwyższone tylko w OZT. Stężenie trisjałotransferyny nie zmieniło się w stosunku do grupy kontrolnej. Analizując zmiany profilu izoform transferyny w zapaleniach trzustki powstało pytanie czy są one narządowo swoiste, czy też zależne od patogenezы schorzenia. Dlatego korzystając w opublikowanych już wyników (z Zakładu Diagnostyki Biochemicznej) porównałam profile izoform transferyny w zapaleniach trzustki z profilami tych izoform w innych chorobach: w nowotworach trzustki, przewlekłych zapaleniach wątroby oraz w chorobach reumatycznych. Opisane powyżej profile izoform transferyny we krwi w reumatoidalnym zapaleniu stawów [4], toczniu rumieniowatym układowym, twardzinie układowej [5], młodzieńczym idiopatycznym zapaleniu stawów [6] i w rakach trzustki [3] różniły się od profilu izoform transferyny w zapaleniach trzustki, który wykazuje podobieństwo do profilu izoform transferyny w zapaleniu wątroby [2]. To porównanie dostarczyło wstępnego dowodu naukowego, że zmiany profilu izoform transferyny nie są specyficzne dla narządów, ale raczej są charakterystyczne dla patogenezы choroby, w tym przypadku zapalenia.

W tym badaniu, pomimo oczekiwań, nie wykazano istotnych statystycznie różnic stężeń izoform transferyny pomiędzy obrzękową i martwiczą postacią OZT. Przyczyną może być fakt, że transferyna jest syntetyzowana głównie w wątrobie, a wpływ zapaleń trzustki na wątrobę jest niezależny od obrazu histologicznego chorób trzustki [41]. Przesłanką, w oparciu o którą spodziewałam się uzyskać różnice, jest odmienny obraz histopatologiczny obrzękowej i martwiczej postaci OZT. W obrzękowej postaci OZT tworzy się obrzęk zapalny i dochodzi do zaburzeń organelli w komórkach groniastych, zaś w martwicznym OZT obecna jest martwica okołoprzewodowa lub okołozrazikowa [49], której powinno towarzyszyć uwolnienie zawartości organelli komórkowych m.in. białek, glikoprotein i enzymów. Nie wykazano również różnic w stężeniu izoform transferyny w zależności od etiologii OZT. Zaobserwowano jedynie istotnie wyższe stężenie kwasów żółciowych i aktywność GGT w etiologii alkoholowej OZT niż w chorobie o innych etiologiach (grupa mieszana: etiologia kamicza, leki, triglicydemia). Przesłanką potwierdzającą moje wyniki jest fakt, iż w alkoholowych chorobach wątroby występuje podwyższony poziom kwasów żółciowych [50,51], natomiast GGT jest udowodnionym, laboratoryjnym wskaźnikiem nadużywania alkoholu [52,53].

W wielu sytuacjach klinicznych oznaczenie stężenia całkowitego badanego parametru nie jest wystarczające, więcej informacji może dostarczyć oznaczenie poszczególnych jego składowych np. izoenzymów czy izoform białek. Dzięki temu można zaobserwować przesunięcia w poszczególnych składnikach badanego związku, niezależnie od kierunku przesunięcia całego układu (enzymu, białka). Za charakterystyczne profile izoform transferyny w poszczególnych chorobach odpowiada zmieniająca się aktywność enzymów, z jednej strony glikozylotransferaz (sjalilotransferaz) przyłączających reszty kwasu sjałowego, a z drugiej, glikozydaz (w tym sjalilaz) odcinających reszty cukrowe, a także enzymów odpowiedzialnych za rozgałęzianie glikanów, czy przyłączanie fukozy. Enzymy biorą udział we wszystkich etapach syntezy i glikozylacji białek, co przekłada się na różnorodność profili glikoprotein w zdrowiu i w różnych patologiach [36,54].

Podsumowując, oznaczenie stężeń izoform transferyny we krwi w chorobach wątroby i trzustki może dostarczyć więcej konkretnych informacji o danej chorobie. Profil izoform transferyny w pierwotnym zapaleniu dróg żółciowych jest charakterystyczny dla tej choroby, lecz nie zmienia się wraz z zaawansowaniem schorzenia. Z kolei zmiany profilu izoform transferyny w zapaleniach trzustki nie są specyficzne dla tego narządu, lecz dla patogenezы choroby i nie są zależne od jej postaci morfologicznej czy etiologii. Oznaczając stężenia

izoform transferyny w większej liczbie chorób i porównując je ze sobą, można uzyskać interesujące wyniki, które mogą mieć znaczenie w diagnostyce podstawowej, różnicowej czy monitorowaniu postępu i aktywności choroby.

8. Wnioski

1. Profil izoform transferyny w surowicy krwi chorych na pierwotne zapalenie dróg żółciowych jest specyficzny i różni się od cholestazy zewnątrzwątrobowej.
2. Stężenia izoform transferyny w PBC są niezależne od stopnia histologicznego zaawansowania choroby w skali Ludwiga.
3. Stężenie całkowite transferyny, jako ujemnego białka ostrej fazy, zmniejsza się w zapaleniach trzustki, przy czym w OZT było niższe niż w PZT.
4. Stężenie izoform transferyny nie nadaje się do różnicowania OZT i PZT, jak postaci morfologicznej oraz nie wykazuje związku z etiologią OZT.
5. Zmiany profilu izoform transferyny w zapaleniach trzustki nie są specyficzne dla narządu, lecz wykazują związek z zapalną etiologią choroby.

9. Piśmiennictwo

1. Gudowska M., Gruszewska E., Panasiuk A., Cylwik B., Swiderska M., Flisiak R., Szmitkowski M., Chrostek L.: Changed profile of serum transferrin isoforms in liver diseases. *Clinical Laboratory*, 2017, 63(2), 349-35.
2. Gruszewska E., Wrona A., Gudowska M., Panasiuk A., Cylwik B., Lipartowska-Klimuk K., Flisiak R., Chrostek L.: The transferrin isoforms in chronic hepatitis. *Clinical Biochemistry*, 2017, 50(18), 1131-1135.
3. Gruszewska E., Cylwik B., Gudowska M., Kędra B., Szmitkowski M., Chrostek L.: Changes in transferrin isoforms in pancreatic cancer. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 2016, 46(3), 286-290.
4. Gudowska M., Gruszewska E., Wrona A., Gindzińska-Sieskiewicz E., Domysławska I., Lipartowska-Klimuk K., Cylwik B., Sierakowski S., Chrostek, L.: The profile of serum transferrin isoforms in rheumatoid arthritis. *JCR: Journal of Clinical Rheumatology*, 2019, 25(4), 159-162.
5. Chrostek L., Gindzińska-Sieskiewicz E., Gruszewska E., Kowal-Bielecka O., Cylwik B.: Transferrin isoforms analysis by capillary electrophoresis in systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 2020, 80(7), 567-570.
6. Gruszewska E., Sienkiewicz M., Abramowicz P., Konstantynowicz J., Gudowska-Sawczuk M., Chrostek L., Cylwik B.: Serum profile of transferrin isoforms in juvenile idiopathic arthritis: a preliminary study. *Rheumatology International*, 2018, 38(7), 1235-1240.
7. European Association for the Study of the Liver: EASL Clinical Practice Guidelines: The diagnosis and management of patients with primary biliary cholangitis. *Journal of Hepatology*, 2017, 67(1), 145-172.
8. Tsuneyama K., Baba H., Morimoto Y., Tsunematsu T., Ogawa H.: Primary biliary cholangitis: its pathological characteristics and immunopathological mechanisms. *The Journal of Medical Investigation*, 2017, 64(1.2), 7-13.
9. Attili A. F., Angelico M., Cantafora A., Alvaro D., Capocaccia L.: Bile acid-induced liver toxicity: relation to the hydrophobic-hydrophilic balance of bile acids. *Medical Hypotheses*, 1986, 19(1), 57-69.

10. Younossi Z. M., Bernstein D., Shiffman M. L., Kwo P., Kim W. R., Kowdley K. V., Jacobson I. M.: Diagnosis and management of primary biliary cholangitis. *American Journal of Gastroenterology*, 2019, 114(1), 48-63.
11. Kouroumalis E., Samonakis D., Voumvouraki A.: Biomarkers for primary biliary cholangitis: current perspectives. *Hepatic Medicine: Evidence and Research*, 2018, 10, 43.
12. Galoosian A., Hanlon C., Zhang J., Holt E. W., Yimam K. K.: Clinical updates in primary biliary cholangitis: trends, epidemiology, diagnostics, and new therapeutic approaches. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 2020, 8(1), 49.
13. Chalifoux S. L., Konyn P. G., Choi G., Saab S.: Extrahepatic manifestations of primary biliary cholangitis. *Gut and Liver*, 2017, 11(6), 771.
14. Onofrio F. Q., Hirschfield G. M., Gulamhusein A. F.: A practical review of primary biliary cholangitis for the gastroenterologist. *Gastroenterology & Hepatology*, 2019, 15(3), 145.
15. Lindor K. D., Bowlus C. L., Boyer J., Levy C., Mayo M.: Primary biliary cholangitis: 2018 practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Clinical Liver Disease*, 2020, 15(1), 1.
16. Hartleb M., Habior A., Cichoż-Lach H., Wosiewicz P., Mach T., Milkiewicz P., Gutkowski K., Gabriel A., Górnicka B., Walewska-Zielecka B., Wiercińska-Drapało A., Socha P., Ferenc M., Grzymisławski M., Kukla M., Musialik J., Krawczyk M., Ciećko-Michalska I., Raszeja-Wyszomirska J., Prystupa A., Jarosławski J., Bobiński T., Wasilewicz M.: Znaczenie biopsji wątroby w praktyce klinicznej - rekomendacje Sekcji Hepatologicznej Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii. *Gastroenterologia Kliniczna. Postępy i Standardy*, 2014, 6(2), 50-84.
17. Ludwig J., Dickson E. R., McDonald G. A.: Staging of chronic nonsuppurative destructive cholangitis (syndrome of primary biliary cirrhosis). *Virchows Archiv A*, 1978, 379(2), 103-112.
18. Chatila A. T., Bilal M., Guturu P.: Evaluation and management of acute pancreatitis. *World Journal of Clinical Cases*, 2019, 7(9), 1006.
19. Yadav D., Lowenfels A. B.: The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 2013, 144(6), 1252-1261.
20. Shah A. P., Mourad M. M., Bramhall S. R.: Acute pancreatitis: current perspectives on diagnosis and management. *Journal of Inflammation Research*, 2018, 11, 77.

21. Koziel D., Głuszek S.: Epidemiology of acute pancreatitis in Poland – selected problems. *Medical Studies/Studia Medyczne*, 2016, 32(1), 1-3.
22. Rogowska, A.: Ostre zapalenie trzustki. *Postępy Nauk Medycznych*, 2014, 27(1), 17-23.
23. Greenberg J. A., Hsu J., Bawazeer M., Marshall J., Friedrich J. O., Nathens A., Coburn N., May G.R., Pearsall E., McLeod R. S.: Clinical practice guideline: management of acute pancreatitis. *Canadian Journal of Surgery*, 2016, 59(2), 128.
24. Mederos M. A., Reber H. A., Girgis M. D.: Acute pancreatitis: a review. *JAMA*, 2021, 325(4), 382-390.
25. Johnson C. D., Besselink M. G., Carter R.: Acute pancreatitis. *BMJ*, 2014, 349:g4859.
26. Suzuki M., Sai J. K., Shimizu T.: Acute pancreatitis in children and adolescents. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 2014, 5(4), 416.
27. Chua T. Y., Walsh R. M., Baker M. E., Stevens T.: Necrotizing pancreatitis: diagnose, treat, consult. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 2017, 84(8), 639-648.
28. Brock C., Nielsen L. M., Lelic D., Drewes A. M.: Pathophysiology of chronic pancreatitis. *World Journal of Gastroenterology*, 2013, 19(42):7231-7240.
29. Kleeff J., Whitcomb D. C., Shimosegawa T., Esposito I., Lerch M. M., Gress T., Mayerle J., Drewes A. M., Rebours V., Akisik F., Muñoz J. E. D, Neoptolemos J. P.: Chronic pancreatitis. *Nature Reviews Disease Primers*, 2017, 3:17060.
30. Banks P. A., Conwell D. L., Toskes P. P.: The management of acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology & Hepatology*, 2010, 6(2 Suppl 5), 1-16.
31. Majumder S., Chari S. T.: Chronic pancreatitis. *The Lancet*, 2016, 387(10031), 1957-1966.
32. Duggan S. N., Chonchubhair H. M. N., Lawal O., O'Connor D. B., Conlon K. C.: Chronic pancreatitis: A diagnostic dilemma. *World Journal of Gastroenterology*, 2016, 22(7), 2304.
33. Gupte A., Goede D., Tuite R., Forsmark C. E.: Chronic pancreatitis.: *BMJ*, 2018, 361.
34. Buscail L., Escourrou J., Moreau J., Delvaux M., Louvel D., Lapeyre F., Tregant P., Frexinos J.: Endoscopic ultrasonography in chronic pancreatitis: a comparative prospective study with conventional ultrasonography, computed tomography, and ERCP. *Pancreas*, 1995, 10(3), 251-257.
35. Gruszewska E., Grytczuk A., Chrostek L.: Glycosylation in viral hepatitis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2021, 1865(11), 129997.

36. Reily C., Stewart T. J., Renfrow M. B., Novak J.: Glycosylation in health and disease. *Nature Reviews Nephrology*, 2019, 15(6), 346-366.
37. Roth Z., Yehezkel G., Khalaila I.: Identification and quantification of protein glycosylation. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2012, 2012.
38. De Jong G., Van Dijk J. P., Van Eijk H. G.: The biology of transferrin. *Clinica Chimica Acta*, 1990, 190(1-2), 1-46.
39. Gabay C, Kushner I.: Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *The New England Journal of Medicine*, 1999, 340(6):448-54.
40. Kamboh M. I., Ferrell R. E.: Human transferrin polymorphism. *Human Heredity*, 1987, 37(2), 65-81.
41. Van Eijk H. G., Van Noort W. L., De Jong G., Koster J. F.: Human serum sialo transferrins in diseases. *Clinica Chimica Acta*, 1987, 165(2-3), 141-145.
42. Helander A., Wienders J., Anton R., Arndt T., Bianchi V., Deenmamode J., Jeppsson J. O., Whitfield J. B., Weykamp C., Schellenberg F.: International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Working Group on Standardisation of Carbohydrate-Deficient Transferrin (IFCC WG-CDT). Standardisation and use of the alcohol biomarker carbohydrate-deficient transferrin (CDT). *Clinica Chimica Acta*, 2016, 459:19-24.
43. Suzuki T., Eguchi A., Shigefuku R., Nagao S., Morikawa M., Sugimoto K., Iwasa M., Takei Y.: Accuracy of carbohydrate-deficient transferrin as a biomarker of chronic alcohol abuse during treatment for alcoholism. *Hepatology Research*, 2022, 52(1):120-127.
44. Bauer A., Habior A.: Detection of Autoantibodies Against Nucleoporin p62 in Sera of Patients With Primary Biliary Cholangitis. *Annals of Laboratory Medicine*, 2019, 39(3):291-298.
45. Togashi H., Shinzawa H., Wakabayashi H., Nakamura T., Yamada N., Takahashi T., Ishikawa M.: Activities of free oxygen radical scavenger enzymes in human liver. *Journal of Hepatology*, 1990, 11(2):200-205.
46. Sokol R. J., Dahl R., Devereaux M. W., Yerushalmi B., Kobak G. E., Gumprecht E.: Human hepatic mitochondria generate reactive oxygen species and undergo the permeability transition in response to hydrophobic bile acids. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2005, 41(2):235-243.

47. Faubion W. A., Guicciardi M. E., Miyoshi H., Bronk S. F., Roberts P. J., Svingen P. A., Kaufmann S. H., Gores G. J.: Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *Journal of Clinical Investigation*, 1999, 103(1):137-145.
48. Schubert R., Schmidt K. H.: Structural changes in vesicle membranes and mixed micelles of various lipid compositions after binding of different bile salts. *Biochemistry*, 1988, 27(24): 8787-8794.
49. Sarner M., Cotton P. B. Classification of pancreatitis. *Gut*, 1984, 25(7), 756-759.
50. Trinchet J. C., Gerhardt M. F., Balkau B., Munz C., Poupon R. E.: Serum bile acids and cholestasis in alcoholic hepatitis. Relationship with usual liver tests and histological features. *Journal of Hepatology*, 1994, 21(2), 235-240.
51. Milstein H. J., Bloomer J. R., Klatskin G.: Serum bile acids in alcoholic liver disease. *The American Journal of Digestive Diseases*, 1976, 21(4), 281-285.
52. Ivanov E., Adjarov D., Etarska M., Stankushev T., Brumbarov K., Kerimova M.: Elevated liver gamma-glutamyl transferase in chronic alcoholics. *Enzyme*, 1980, 25, 304-308.
53. Ghosh S., Jain R., Jhanjee S., Rao R., Mishra A. K.: Alcohol biomarkers and their relevance in detection of alcohol consumption in clinical settings. *International Archives of Substance Abuse and Rehabilitation*, 2019, 1(002).
54. Groux-Degroote S., Cavdarli S., Uchimura K., Allain F., Delannoy P.: Glycosylation changes in inflammatory diseases. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 2020, 119:111-156.

10. Streszczenie w języku polskim

Glikozylacja jest jedną z najczęściej występujących ko- i potranslacyjnych modyfikacji białek. Większość białek krwi jest glikozylowana. Produktem glikozylacji białek są glikoproteiny. Różnią się one strukturą białkową i węglowodanową, co jest podstawą występowania specyficznych izoform. Istnieją liczne dowody naukowe potwierdzające zmiany w glikozylacji białek w stanach zapalnych o różnej etiologii, czego skutkiem są ilościowe zmiany izoform glikoprotein. Jedną z wysoce zmiennych glikoprotein jest ujemne białko ostrej fazy, jakim jest transferyna. Charakteryzuje się ona mikroheterogennością, która wynika z różnic w glikozylacji łańcuchów oligosacharydowych. W zależności od liczby przyłączonych reszt kwasu sialowego występuje 9 izoform transferyny, których profil zmienia się w chorobach o podłożu zapalnym a także innym niż zapalny.

Celem badań było oznaczenie stężeń izoform transferyny w surowicy krwi w pierwotnym zapaleniu dróg żółciowych (PBC) oraz ostrym (OZT) i przewlekłym (PZT) zapaleniu trzustki. W pierwszym badaniu porównano stężenia całkowite transferyny i jej izoform pomiędzy grupą osób z PBC, z cholestazą zewnątrzwątrobową (w celu wyeliminowania wpływu cholestazy na zmianę profilu izoform transferyny) oraz grupą osób zdrowych. Oceniono również stężenia izoform transferyny w zależności od stopnia histologicznego zaawansowania choroby wątroby w skali Ludwiga. W drugim badaniu porównano stężenie całkowite transferyny i jej izoform w surowicy pomiędzy grupami pacjentów z zapaleniami trzustki i grupą kontrolną. Dodatkowo, w OZT oceniono stężenia izoform transferyny w zależności od postaci morfologicznej i etiologii. Na podstawie literatury profile izoform transferyny w zapaleniach trzustki porównano z profilami w innych schorzeniach: nowotworach trzustki, chorobach reumatycznych oraz przewlekłych zapaleniach wątroby.

Materiałem do badań była surowica krwi żyłnej. Stężenia izoform transferyny oznaczono metodą elektroforezy kapilarnej w systemie MINICAP firmy Sebia. Do pierwszego badania zakwalifikowano 76 pacjentów z PBC. Pierwotne zapalenie dróg żółciowych zostało zdiagnozowane zgodnie z wytycznymi European Association for the Study of the Liver (EASL). Ponadto, przebadano 44 osoby z cholestazą zewnątrzwątrobową (rak brodawki Vatera) i 40 zdrowych osób. W drugim badaniu wzięło udział 84 pacjentów z ostrym zapaleniem trzustki oraz 42 z przewlekłym zapaleniem trzustki. Grupa kontrolna składała się z 30 zdrowych osób.

W surowicy krwi pacjentów z PBC zaobserwowano wzrost całkowitego stężenia transferyny. Wśród izoform transferyny u chorych z PBC stężenia di- i trisjalotransferyny były niższe niż u osób zdrowych, przy jednoczesnym braku zmian w stężeniach tetra- i pentasjalotransferyny. W cholestazie zewnątrzwątrobowej profil izoform transferyny był inny: stężenia disjalotransferyny oraz tetrasjalotransferyny były wyższe niż w PBC, natomiast stężenie pentasjalotransferyny było istotnie niższe. Nie wykazano istotnych zmian w stężeniach izoform transferyny w zależności od histologicznego stopnia zaawansowania PBC w skali Ludwiga.

W OZT i PZT stężenie całkowite transferyny w surowicy było istotnie niższe niż w grupie osób zdrowych. Ponadto, w OZT było niższe niż w PZT. Analiza profili izoform transferyny wykazała niższe stężenie pentasjalotransferyny u osób z OZT i PZT niż w grupie kontrolnej. Dodatkowo, u osób z OZT stężenie tetrasjalotransferyny było istotnie wyższe niż u osób zdrowych. Pomiędzy grupami z OZT i PZT nie wykazano istotnych różnic stężeń izoform transferyny.

Podsumowując, oznaczenie stężeń izoform transferyny w chorobach wątroby i trzustki może dostarczyć dodatkowych informacji o badanych chorobach. Profil izoform transferyny w PBC jest charakterystyczny dla tego schorzenia, lecz nie zmienia się wraz ze stopniem zaawansowania choroby. Zmiany profilu izoform transferyny w ostrym i przewlekłym zapaleniu trzustki nie są swoiste dla tego narządu, lecz są związane z patogenezą choroby. Poza tym, są niezależne od postaci morfologicznej i etiologii OZT. Analiza porównawcza profili izoform transferyny w różnych chorobach może mieć znaczenie w diagnostyce podstawowej i różnicowej tych schorzeń.

11. Streszczenie w języku angielskim

Glycosylation is one of the most common co- and posttranslational modifications of proteins. The majority of blood proteins are glycosylated. The products of protein glycosylation are glycoproteins. They differ in their protein and carbohydrate structure, which is the basis for the occurrence of specific isoforms. There is abundant scientific evidence supporting changes in protein glycosylation in inflammatory conditions of various etiologies, resulting in quantitative alterations in glycoprotein isoforms. One of the highly variable glycoproteins is the negative acute phase protein - transferrin. It is characterized by microheterogeneity, which results from differences in the glycosylation of oligosaccharide chains. Depending on the number of attached sialic acid residues, there are 9 transferrin isoforms, the profile of which changes in inflammatory and non-inflammatory diseases.

The aim of the study was to determine the serum concentrations of transferrin isoforms in primary cholangitis (PBC) and acute (AP) and chronic (CP) pancreatitis. In the first study, we compared the concentration of total transferrin and its isoforms between a group of people with PBC, with extrahepatic cholestasis (to eliminate the effect of cholestasis on the change the profile of transferrin isoforms) and a group of healthy people. The concentrations of transferrin isoforms in patients with PBC were also assessed depending on the histological stage of the liver disease according to the Ludwig scale. In the second study, we compared the serum total concentration of transferrin and its isoforms between the groups of patients with pancreatitis and the control group. Additionally, the concentrations of transferrin isoforms depending on the morphological form and etiology of acute pancreatitis were assessed. Based on the literature, the profiles of transferrin isoforms in pancreatitis were compared with those in other diseases: pancreatic cancers, rheumatic diseases and chronic hepatitis.

The material for the studies was venous blood serum. The concentrations of transferrin isoforms were analyzed by capillary electrophoresis on the Sebia MINICAP system. The first study included 76 patients with PBC. Primary biliary cholangitis was diagnosed according to the guidelines of the European Association for the Study of the Liver (EASL). In addition, 44 people with extrahepatic cholestasis (Vater papilla cancer) and 40 healthy people were studied. The second study involved 84 patients with acute pancreatitis and 42 patients with chronic pancreatitis. The control group consisted of 30 healthy people

An increase in the total concentration of transferrin was observed in the serum of patients with PBC. Among the transferrin isoforms, di- and trisialotransferrin concentrations

in patients with PBC were lower than in healthy people. There were no changes in the concentrations of tetra- and pentasialotransferrin. The profile of transferrin isoforms in extrahepatic cholestasis was different: the concentrations of disialotransferrin and tetrasialotransferrin were higher than in PBC, whereas the concentration of pentasialotransferrin was not changed. There were no significant changes in the concentrations of transferrin isoforms depending on the histological stage of PBC as measured by the Ludwig scale.

In AP and CP, the concentration of total transferrin was significantly lower than in the group of healthy people. Moreover, in AP it was lower than in CP. The analysis of the profiles of transferrin isoforms showed a lower concentration of pentasialotransferrin in patients with AP and CP than in the control group. Additionally, in patients with acute pancreatitis, the concentration of tetrasialotransferrin was significantly higher than in healthy people. There were no significant differences in the concentrations of transferrin isoforms between the groups with AP and CP.

In conclusion, the determination of transferrin isoforms concentrations in liver and pancreatic diseases may provide additional information about the studied diseases. The profile of transferrin isoforms in PBC is characteristic of this disease but doesn't change with the severity of the disease. Changes in the profile of transferrin isoforms in acute and chronic pancreatitis are not specific for this organ, but relate to the pathogenesis of the disease. Furthermore, these changes are independent of the morphological form and etiology of acute pancreatitis. A comparative analysis of transferrin isoform profiles in various diseases may be important in the primary and differential diagnosis of these diseases.



Article

Changed Profile of Serum Transferrin Isoforms in Primary Biliary Cholangitis

Agnieszka Grytczuk ¹, Alicja Bauer ² , Ewa Gruszewska ³, Bogdan Cylwik ⁴ and Lech Chrostek ^{3,*}

¹ Department of Laboratory Diagnostics, University Clinical Hospital, 15-540 Białystok, Poland; agnieszka.grytczuk@onet.eu

² Department of Biochemistry and Molecular Biology, Centre of Postgraduate Medical Education, 01-813 Warsaw, Poland; alabauer@wp.pl

³ Department of Biochemical Diagnostics, Medical University of Białystok, 15-269 Białystok, Poland; gr_ewa@interia.pl

⁴ Department of Pediatric Laboratory Diagnostics, Medical University of Białystok, 15-274 Białystok, Poland; cylwikb@umb.edu.pl

* Correspondence: chrostek@umb.edu.pl; Tel./Fax: +48-85-831-85-85

Received: 6 August 2020; Accepted: 1 September 2020; Published: 8 September 2020



Abstract: Liver damage affects the synthesis of proteins and glycoproteins, and alters their posttranslational modification, such as glycosylation changing the serum profile of glycoprotein isoforms. The retention of hydrophobic bile acids in the course of cholestatic liver diseases is a major cause of liver damage in primary biliary cholangitis (PBC). The study objective was to determine the serum profile of transferrin isoforms in primary biliary cholangitis and compare it to transferrin isoforms profile in extrahepatic cholestasis. The study was carried out in 76 patients with PBC and 40 healthy blood donors. Transferrin isoforms were analyzed by the capillary electrophoresis method. The mean relative concentrations of disialotransferrin and trisialotransferrin in PBC were significantly lower than those in the healthy subjects ($p < 0.001$, $p = 0.011$; respectively). None of the transferrin isoforms changed according to the disease severity evaluated by the Ludwig scoring system. However, the disease stage affected the activity of alkaline phosphatase (ALP) and γ -glutamyl transferase (GGT), and albumin level ($p = 0.002$; $p = 0.013$ and $p = 0.005$, respectively). Our results indicate that serum profile of transferrin isoforms alters primary biliary cholangitis and differs in comparison to transferrin isoforms profile in extrahepatic cholestasis. The decreased concentrations of lower sialylated isoforms of transferrin (low percentage share in total transferrin level) are not associated with the histological stage of disease.

Keywords: capillary electrophoresis; glycosylation; primary biliary cholangitis; transferrin isoforms

1. Introduction

Primary biliary cholangitis (PBC) is a chronic liver disease characterized by damage of small intrahepatic bile ducts resulting in cholestasis, inflammation, and bile acids (BAs) retention [1]. The retention and accumulation of hydrophobic bile acids, such as cholic acid and chenodeoxycholic acid inside cells, can damage hepatocyte in different ways [2]. Prolonged cholestasis may lead to cirrhosis and portal hypertension. BAs may disrupt cell membranes and can promote the generation of reactive oxygen species (ROS) in human liver [3]. ROS generation induces oxidative cell damage causing mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress in isolated rat hepatocytes [4], isolated rat liver mitochondria [5], and isolated human mitochondria [6]. The rough endoplasmic reticulum (RER) is the place of biosynthesis of glycoprotein's oligosaccharides [7]. Therefore, bile-acid-induced damage

in plasma membranes and cell organelle membranes may alter the synthesis of oligosaccharides and subsequently glycoproteins in hepatocytes. Hepatocyte membrane injury induced by BAs can be structural and also functional. The structural alterations involve the aggregation between BAs and lipids in the outer membrane monolayer and consequently the formation of transient holes, which disrupt membrane integrity and resolve of hepatocytes [8]. A key tool for diagnosis PBC and differentiation between PBC, PSC (Primary sclerosing cholangitis) and AIH (Autoimmune hepatitis) is liver biopsy [9,10].

The aim of the current study was to provide evidence that primary biliary cholangitis disrupts the function of hepatocytes, resulting in alterations of protein synthesis and glycosylation in the example of transferrin. Transferrin is a negative acute-phase protein, whose concentration decreases during inflammatory disorders [11]. Discrepancy between the plasma concentrations of different acute-phase proteins is common. These variations indicate that the components of the acute-phase response are individually regulated. The changes in transferrin concentration reflect mainly the synthesis in hepatocytes. The source of microheterogeneity is its structure because transferrin is composed of amino acids and carbohydrates. Transferrin exists as a number of different isoforms resulting from variations in glycosylation, especially sialylation of oligosaccharide chains [12]. Depending on the number of sialic acid residues attached to the oligosaccharide chain, nine isoforms of transferrin can be identified, from asialotransferrin to octasialotransferrin. The synthesis and glycosylation of acute-phase proteins including transferrin is regulated at the transcriptional and post-transcriptional level [13]. Post-translational changes in the glycosylation of plasma proteins during diseases include alterations in oligosaccharide branching [14], changing sialylation [15], and decreased galactosylation of IgG (Immunoglobulin G) [16]. The changes in glycosylation develop independently of changes in the synthesis of acute-phase proteins.

We expect that the changes in the serum profile of transferrin isoforms are likely to be disease-specific and can therefore additionally confirm the toxic effect of bile acid retention on the organelle membranes of hepatocytes in primary biliary cholangitis.

2. Patients and Methods

2.1. Patients

Serum samples were collected from 76 patients with primary biliary cholangitis (PBC) (68 women, 8 men; median age for women: 53 years, range 22–75 years; median age for men: 46 years, range 34–57 years) who were hospitalized at the Department of Gastroenterology, Hepatology and Clinical Oncology of the Centre of Postgraduate Medical Education (Warsaw, Poland). Additionally, serum samples from 44 patients with carcinoma of Vater's ampulla as an example of extrahepatic cholestasis were analyzed (females: 19, males: 25; mean age: 63.2 years; range: 43–84). The patients were hospitalized in the II Department of General and Gastroenterological Surgery, Medical University of Białystok. The samples were frozen at -86°C and tested immediately after thawing. Serum samples were also collected from 40 healthy adult blood donors at the Warsaw Blood Bank. All subjects gave their informed consent for inclusion before they participated in the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Ethics Committee of Medical University in Białystok (Protocol number R-I-002/563/2019). The laboratory characteristics of the PBC patients and healthy controls are presented in Table 1.

The prevalence of autoantibodies in the tested patients was as follows: anti-Sp100—35.53% (27/76), anti-gp210 and anti-Ro52—34.21%, anti-centromere—7.89%, anti-p61—5.26% and AMAM2—84.21%. PBC was diagnosed using the European Association for the Study of the Liver (EASL) guidelines [1]. Because it was the first diagnosis for these patients, they had not been treated before. The differentiation with PSC was made on the basis of histopathological study of liver biopsy. The persons with suspicion of AIH or PBC-AIH were pre-eliminated. The histological scoring system was performed according to Ludwig's staging system. The numbers of PBC patients in stages of Ludwig's scale were: 13 in stage 1,

36 in stage 2, 16 in stage 3, and 11 in stage 4. Patients with abnormal liver biochemistry were examined by ultrasound and serological screening for AMA (Antimitochondrial antibody) and PBC-specific-ANA (presence of nuclear dots or perinuclear rims) was performed with immunofluorescence detection. Biochemical tests of all PBC patients suggested cholestatic liver disease. All patients had a liver biopsy. The main criteria included biochemical evidence of cholestasis with elevation of alkaline phosphatase (ALP) activity, presence of AMA and/or anti 2-oxoacid dehydrogenase complex and/or PBC-specific-ANA, histopathologic evidence of characteristic cholangitis, and destruction of small or medium-sized bile ducts.

Table 1. Characteristics of healthy, cholestasis, and primary biliary cholangitis (PBC) groups.

	Healthy Blood Donors (n = 40)	Extrahepatic Cholestasis (n = 44)	PBC (n = 76)
Age (range)	35 (20–60)	63 (43–84)	52 (22–75)
Sex (F/M)	30/10	19/25	68/8
AST (μkat/L)	0.38 ± 0.40	1.85 ± 2.03 *	2.2 ± 1.2 *#
ALT (μkat/L)	0.33 ± 0.50	1.28 ± 2.12 *	2.3 ± 2.1 *#
ALP (μkat/L)	0.80 ± 0.40	11.9 ± 10.2 *	4.5 ± 3.8 *#
GGT (μkat/L)	0.40 ± 1.0	7.34 ± 8.89 *	7.8 ± 6.0 *#
Bilirubin (μmol/L)	17.1 ± 5.4	91.5 ± 123.3 *	21.5 ± 35.5 *#
Albumin (g/L)	42 ± 30	32.6 ± 6.3 *	26.7 ± 16.0 *#
BAs (μM/L)	3.57 ± 2.11	91.6 ± 37.9 *	27.97 ± 21.5 *#
AMA-M2 (+/–) (%)	ND	ND	64/76 (84.2)
Anti-gp210 (+/–) (%)	ND	ND	26/76 (34.2)
Anti-SP100 (+/–) (%)	ND	ND	27/76 (35.5)
Anti-Ro52 (+/–) (%)	ND	ND	26/76 (34.2)
Anti-p62 (+/–) (%)	ND	ND	4/76 (5.2)
Anti-centromere (+/–) (%)	ND	ND	6/76 (7.9)

Data are means ± SD (Standard deviation). * Statistically significant difference in comparison to the control group. # Statistically significant difference between the groups (cholestasis vs. PBC). ND, not detectable; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; GGT, γ-glutamyl transferase; BAs, bile acids.

2.2. Autoantibodies Assay

All autoantibodies except for anti-p62 were detected using commercially available ELISA kits according to manufacturer's instructions: anti-Sp100 antibodies using IMTEC-Sp100-Antibodies kit (ITC 660040; IMTEC, Berlin, Germany), which uses recombinant Sp100 protein, anti-gp210 with QUANTA Lite gp210 kit (Inova Diagnostics, San Diego, CA, USA), which uses a highly purified peptide corresponding to an immunodominant portion of the gp210 protein, anti-AMA M2 using IMTEC-AMA M2 kit (HUMAN-IMTEC, Berlin, Germany), anti-Ro-52 with QANTA Lite SS-A 52 ELISA kit (Inova Diagnostics, San Diego, CA, USA), and anti-centromere using ACA—QANTA Lite Centromere ELISA kit (CENP-A & CENP-B) (Inova Diagnostics, San Diego, CA, USA). Optical density (OD) was measured with an automatic plate reader (Multiscan RC, LabSystem, Vantaa, Finland). Detection of anti-p62 antibodies was performed according to the procedure described by Bauer and Habor [17].

2.3. Transferrin Isoforms Assay

Transferrin isoforms were determined by the capillary electrophoresis (CE) assay on a MINICAP (Carbohydrate deficient transferrin) electrophoretic system using the MINICAP CDT reagent kit (Sebia, Evry, France). The transferrin isoforms are separated by their electrophoretic mobility in an

alkaline buffer with a specific pH 8.8. In this method, the following major fractions can be detected: asialotransferrin, disialotransferrin, trisialotransferrin, tetrasialotransferrin, and pentasialotransferrin.

2.4. Total Transferrin Assay

Total serum transferrin concentration was determined by the immunoturbidimetric method using the transferrin kit from Abbott (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) on the Architect ci8200 analyzer (Abbott Laboratories, USA). In this method, specific antibodies to human transferrin form insoluble complexes and the result as a turbidity is measured on the analyzer.

2.5. Total Bile Acid Assay

Total bile acids were determined by enzyme cycling method using Diazyme Total Bile Acids Assay kit (Diazyme Laboratories, Gregg Court, Poway, CA, USA). Enzyme 3- α -hydroxysteroid dehydrogenase (3- α -HSD) converts bile acids to 3-keto steroids and thio-NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide hydride, in the presence of thio-NAD (Nicotinamide adenine dinucleotide)). The reaction is reversible. In the presence of excess NADH, the enzyme cycling occurs efficiently and the rate of formation of thio-NADH is determined by measuring specific change of absorbance at 405 nm on Indiko Plus analyzer (Thermo Fisher Scientific, Thermo, Finland).

2.6. Statistics

The results were expressed as mean and SD. The differences between the tested group and control were evaluated using the Mann–Whitney U test. The effect of the histological changes on the concentration of isoforms was tested by the ANOVA rank Kruskal–Wallis test. The Spearman’s rank correlation coefficient was used to assess the correlation between transferrin isoforms and laboratory tests. The differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

3. Results

Total bile acids concentration (BAs) increased significantly in PBC patients in comparison with control group (Mann–Whitney U test: $Z = 6.950$; $p < 0.001$) (Table 1), however did not change with the advancement of liver histological failure (ANOVA rank Kruskal–Wallis test: 3.622 ; $p = 0.305$) (Figure 1). The mean serum BAs concentration in extrahepatic cholestasis (carcinoma of Vater’s ampulla) was significantly higher than that in the control group (about 30 times higher) and in the PBC group (about three times higher) (Mann–Whitney U test: $p < 0.001$ for both comparisons) (Table 1). Furthermore, the total transferrin concentration (TRF) significantly increased in patients in comparison to the control group (Mann–Whitney U test: $Z = 2.353$; $p = 0.019$) (Table 2), and also did not change according to histopathological scale of liver injury (ANOVA rank Kruskal–Wallis test: $H = 4.317$; $p = 0.229$) (Figure 1). The mean serum TRF concentration in extrahepatic cholestasis was significantly lower than that in the healthy controls and PBC patients ($p < 0.001$ for both comparisons; Mann–Whitney U test) (Table 2).

Table 2. Transferrin and its isoforms in healthy blood donors, cholestasis, and PBC group.

	Healthy Blood Donors ($n = 40$)	Extrahepatic Cholestasis ($n = 44$)	PBC ($n = 76$)
TRF (g/L)	2.94 ± 0.53	$2.26 \pm 0.67^*$	$3.26 \pm 0.86^{*#}$
2-sialoTRF (%)	0.71 ± 0.47	0.68 ± 0.38	$0.33 \pm 0.22^{*#}$
3-sialoTRF (%)	3.61 ± 1.16	$3.08 \pm 1.38^*$	$2.70 \pm 1.43^*$
4-sialoTRF (%)	76.84 ± 5.62	$81.11 \pm 2.34^*$	$74.92 \pm 13.78^{\#}$
5-sialoTRF (%)	18.61 ± 6.03	$15.15 \pm 2.63^*$	$22.03 \pm 14.25^{\#}$

Data are means \pm SD. * Statistically significant difference in comparison to the control group. # Statistically significant difference between groups (cholestasis vs. PBC). TRF, total transferrin concentration.

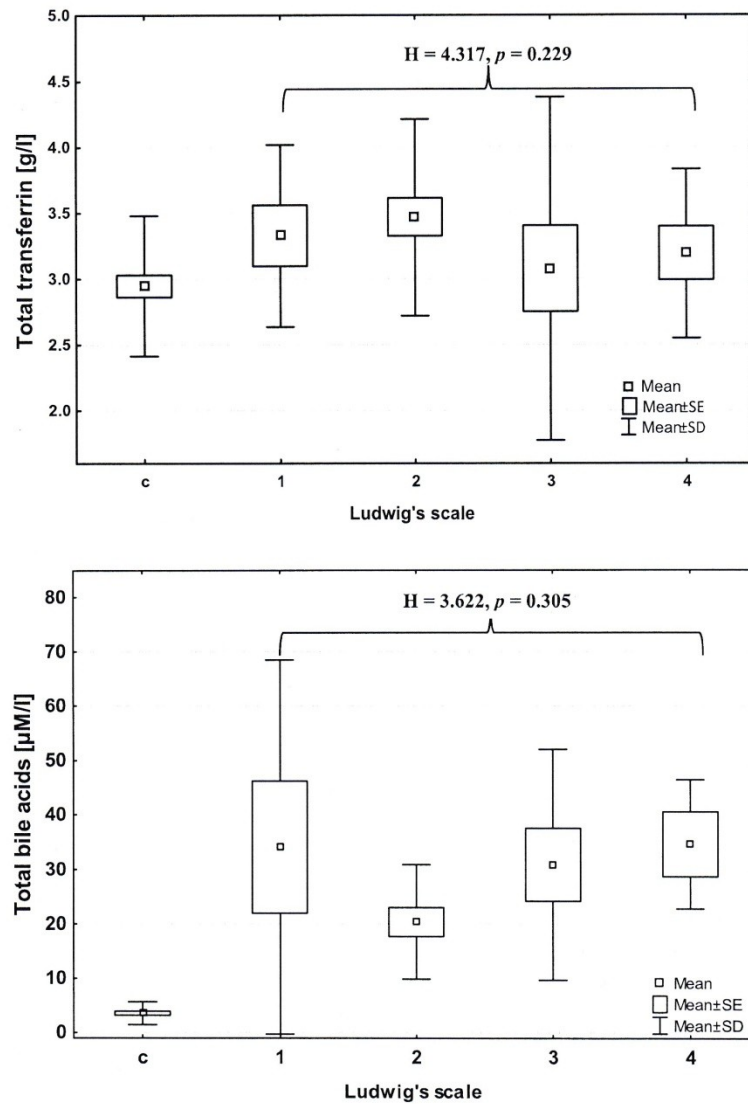


Figure 1. Total transferrin concentration (**top**) and bile acids (**bottom**) in PBC patients according to Ludwig's scale. C—control group, 1–4—stages of liver injury according to Ludwig's scale. Comparison between stages of Ludwig's scoring system: ANOVA rank Kruskal–Wallis test (H, p).

There were significant differences in the mean concentrations of disialotransferrin and trisialotransferrin in patients with PBC in comparison with the control group (Mann–Whitney U test: $Z = -4.356; p < 0.000$ and $Z = -2.522; p = 0.011$; respectively) (Figure 2, Table 2). The mean disialotransferrin and tetrasialotransferrin concentrations in extrahepatic cholestasis were significantly higher than that in PBC group ($Z = 6.289; p < 0.001$ and $Z = 4.941; p < 0.001$, respectively) and the concentration of pentasialotransferrin was significantly lower than that in PBC patients ($Z = -5.936$;

$p < 0.001$) (Table 2). The mean relative concentrations of disialotransferrin and trisialotransferrin were significantly lower in PBC patients (mean: $0.33 \pm 0.22\%$ and $2.71 \pm 1.42\%$, respectively) than those in the controls (mean: $0.935 \pm 1.15\%$ and $3.61 \pm 1.16\%$, respectively). The relative concentrations of other transferrin isoforms (tetra- and pentasialotransferrin) did not differ in comparison to the control group.

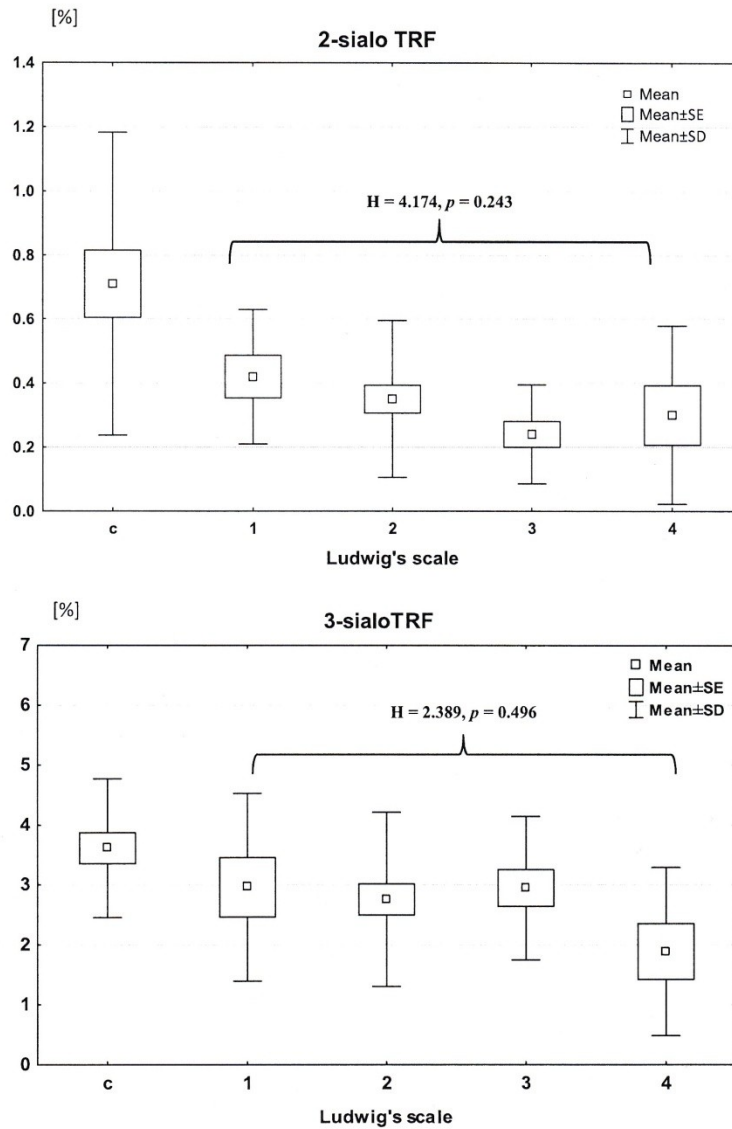


Figure 2. The relative concentration of 2-sialotransferrin (top) and 3-sialotransferrin (bottom) in PBC patients according to Ludwig's scale. C—control group, 1–4—stages of liver injury according to Ludwig's scale, SE—standard error. Comparison between stages of Ludwig's scale: ANOVA rank Kruskal–Wallis test (H, p).

None of the transferrin isoforms changed according to histological staging based on the Ludwig classification (ANOVA rank Kruskal–Wallis test: $H = 4.17$ and $p = 0.24$ for disialotransferrin; $H = 2.39$ and $p = 0.49$ for trisialotransferrin; $H = 5.50$ and $p = 0.14$ for tetrasialotransferrin; $H = 6.10$ and $p = 0.11$ for pentasialotransferrin). Among other tests, the histological progression of PBC exerts an impact on ALP and GGT activity ($H = 14.73$ and $p = 0.002$; $H = 10.83$ and $p = 0.013$, respectively) and on albumin concentration ($H = 12.96$ and $p = 0.005$). Post-hoc analysis revealed that the activity of GGT and ALP in stage 3 was higher than that in stage 1 ($p = 0.008$ and $p = 0.006$, respectively) but albumin level in stage 3 was lower than in stage 2 ($p = 0.039$). Furthermore, ALP activity in stage 4 was also significantly higher than in stage 1 ($p = 0.015$).

There was no correlation of bile acids concentration with total transferrin and individual fractions of transferrin ($p > 0.05$ for all comparisons in Spearman's rank correlation coefficient test).

4. Discussion

It is generally accepted that primary biliary cholangitis (PBC) is an autoimmune liver disease characterized by the presence of specific autoantibodies. A review of several studies showed the prevalence of anti-mitochondrial antibodies (AMAs) in the course of PBC at the level of 90–95% [18,19]. In our study, AMAs were present in 84.2% of PBC patients, being a little lower than the general AMA range in PBC patients, though comparable with the frequency of autoantibodies in other studies [20]. The frequency of anti-nuclear antibodies (ANA) including anti-gp210, anti-SP100, and anti-Ro52 reached a value between 34.2% and 35.5%.

In addition to ALP, other liver biochemical tests are used to diagnose PBC, including alanine (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), immunoglobulins (mainly IgM), and bilirubin [21,22]. Since we know that bile acid retention in cholestatic liver diseases may disrupt cell and organelle membranes and that the synthesis of glycoprotein oligosaccharides takes place in the RER membrane, we made an attempt to test the glycosylation profile of serum transferrin in the course of PBC.

Several pathways are involved in bile-acid-induced hepatocyte injury, e.g., promotion of reactive oxygen species generation [6], induction of hepatocyte necrosis and apoptosis [23], and disruption of plasma membrane integrity by BA-lipids aggregates [8]. Whatever it is, the mechanisms involved in BAs toxicity are not fully understood. Regardless of cellular and molecular mechanism of hepatocyte injury caused by the retention of hydrophobic bile acids, hepatocyte swelling and the intracellular accumulation of bile pigments have been observed [24], resulting in bile-acid-mediated inflammation in the liver. Because of this, we can expect the decrease in blood level of negative acute-phase proteins e.g., transferrin. Unexpectedly, we observed a statistically significant increase of transferrin concentration in the sera of patients with PBC. This may mean that it is more effective at damaging the cell membrane than organelle membranes, which reduces the synthesis of glycoproteins. Finally, the efflux of transferrin through membrane holes comprised of BA-lipids aggregates is more effective than impaired synthesis of transferrin in ER and Golgi apparatus.

The results of the serum profile of transferrin isoforms obtained in PBC patients are surprising. Except for changes in lower sialylated isoforms of transferrin (disialo and trisialotransferrin), we found no alterations in higher sialylated isoforms (tetra- and pentasialotransferrin). The most visible change was observed in the relative concentration of disialotransferrin showing almost a three-fold reduction in PBC patients in comparison to the controls. Despite this large change in the relative concentration of disialotransferrin, there were no shifts related to histological staging evaluated by the Ludwig scoring system. The decrease in relative concentration of trisialotransferrin was much smaller (about 25% lower). Unexpectedly, we noticed an impact of the histological progression of disease on ALP and GGT activity and on albumin concentration, perhaps because ALP and GGT are membrane-bound extracellular enzymes and are more dependent on bile duct obstruction, whereas albumin synthesis takes place in different hepatocyte compartments starting in ribosomes, continuing in endoplasmic reticulum, and ending in Golgi apparatus. It should be emphasized that only those isoforms of transferrin that constitute a very small fraction of the total transferrin concentration were reduced.

The mean relative concentrations of disialotransferrin and trisialotransferrin in healthy people get a value of $0.935 \pm 1.15\%$ and $3.61 \pm 1.16\%$ (in our study), respectively. Therefore, the changes in these low-sialylated isoforms of transferrin did not affect the total transferrin concentration in PBC patients. Because of the low concentration of low-sialylated transferrin isoforms, neither of them correlated with total transferrin concentration. Furthermore, none of these isoforms correlated with total concentration of bile acids.

The reduction in the concentration of low-sialylated isoforms in PBC patients was not accompanied by the changes in higher sialylated isoforms. The relative concentration of tetra- and pentasialotransferrin did not change. In our previous studies, we showed that the shift in one isoform of transferrin causes the reverse shift in the other, e.g., the increased level of tetrasialotransferrin was accompanied by the decreased level of pentasialotransferrin in the course of chronic hepatitis [25], and in pancreatic cancer [26], or mixed effect in the form of a significant decrease in tri- and pentasialotransferrin and a significant increase in tetrasialotransferrin in patients with rheumatoid arthritis [27]. Opposite changes in transferrin isoforms aim to maintain a stable level of transferrin. However, in liver cirrhosis (alcoholic and nonalcoholic origin) and in toxic hepatitis the changes were limited to one transferrin isoform [28]. Increased levels of trisialotransferrin in cirrhosis and disialotransferrin in toxic hepatitis were observed. Taking into consideration that in all steps of synthesis and glycosylation of proteins enzymes are involved, it means that disease-specific changes in enzyme activity are responsible for the specific profile of transferrin isoforms in the blood during the course of disease. Thus, the comparison of the serum profile of transferrin isoforms in different diseases can provide information about specific diseases, as this profile is unique to the specific disease.

The profile of transferrin isoforms in PBC patients was compared with the transferrin profile in extrahepatic cholestasis. We observed the different changes in sialylation of transferrin in these patients to those in PBC patients. Firstly, the level of disialotransferrin was not changed. Secondly, we noticed the significant changes in the concentration of higher sialylated isoforms. Thus, the tetrasialotransferrin level was significantly higher than that in the healthy controls and was higher than that in PBC patients, but the level of pentasialotransferrin was significantly lower than that in the control group and in the PBC group.

5. Conclusions

We can state that the serum profile of transferrin isoforms in primary biliary cholangitis is specific and differs in comparison to extrahepatic cholestasis. The decreased concentrations of lower sialylated isoforms of transferrin (low percentage share of total transferrin level) are not associated with the parallel changes in the concentrations of higher sialylated isoforms (high percentage share of total transferrin level) and are not parallel to the histological stage of disease.

Author Contributions: Conceptualization, A.G. and L.C.; data curation, A.B. and E.G.; laboratory investigation, A.G., A.B. and B.C.; writing—original draft preparation, A.G. and E.G.; writing—review and editing, B.C.; supervision, L.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: We have received no external funding.

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

References

1. Hirschfield, G.M.; Beuers, U.; Corpechot, C.; Invernizzi, P.; Jones, D.; Marzioni, M.; Schramm, C. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: The diagnosis and management of patients with primary biliary cholangitis. *J. Hepatol.* **2017**, *67*, 145–172. [CrossRef] [PubMed]
2. Attili, A.F.; Angelico, M.; Cantafora, A.; Alvaro, D.; Capocaccia, L. Bile acid-induced liver toxicity: Relation to the hydrophobic/hydrophilic balance of bile acids. *Med. Hypotheses* **1986**, *19*, 57–69. [CrossRef]
3. Togashi, H.; Shinzawa, H.; Wakabayashi, H.; Nakamura, T.; Yamada, N.; Takahashi, T.; Ishikawa, M. Activities of free oxygen radical scavenger enzymes in human liver. *J. Hepatol.* **1990**, *11*, 200–205. [CrossRef]

4. Billington, D.; Evans, C.E.; Godfrey, P.P.; Coleman, R. Effects of bile salts on the plasma membranes of isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* **1980**, *188*, 321–327. [CrossRef]
5. Sokol, R.J.; Straka, M.S.; Dahl, R.; Devereaux, M.W.; Yerushalmi, B.; Gumprecht, E.; Elkins, N.; Everson, G. Role of oxidant stress in the permeability transition induced in rat hepatic mitochondria by hydrophobic bile acids. *Pediatr. Res.* **2001**, *49*, 519–531. [CrossRef]
6. Sokol, R.J.; Dahl, R.; Devereaux, M.W.; Yerushalmi, B.; Kobak, G.E.; Gumprecht, E. Human hepatic mitochondria generate reactive oxygen species and undergo the permeability transition in response to hydrophobic bile acids. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2005**, *41*, 235–243. [CrossRef]
7. Kornfeld, R.; Kornfeld, S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 631–664. [CrossRef]
8. Schubert, R.; Schmidt, K.H. Structural changes in vesicle membranes and mixed micelles of various lipid compositions after binding of different bile salts. *Biochemistry* **1988**, *27*, 8787–8794. [CrossRef]
9. Scheuer, P. Primary biliary cirrhosis. *Proc. R. Soc. Med.* **1967**, *60*, 1257–1260.
10. Ludwig, J. Surgical pathology of the syndrome of primary sclerosing cholangitis. *Am. J. Surg. Pathol.* **1989**, *13* (Suppl. S1), 43–49.
11. Gabay, C.; Kushner, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.* **1999**, *340*, 448–454. [CrossRef] [PubMed]
12. van Eijk, H.G.; van Noort, W.L.; de Jong, G.; Koster, J.F. Human serum sialo transferrins in diseases. *Clin. Chim. Acta* **1987**, *165*, 141–145. [CrossRef]
13. Jiang, S.-L.; Samols, C.; Rzewnicki, D.; Macintyre, S.S.; Greber, I.; Sipe, J.; Kusher, I. Kinetic modeling and mathematical analysis indicate that acute phase gene expression in Hep 3B cells is regulated by both transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J. Clin. Investig.* **1995**, *95*, 1253–1261. [CrossRef] [PubMed]
14. Van Dijk, W.; Mackiewicz, A. Interleukin-6-type cytokine-induced changes in acute phase protein glycosylation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1995**, *762*, 319–330. [CrossRef] [PubMed]
15. de Graaf, T.W.; Van der Stelt, M.E.; Anbergen, M.G.; van Dijk, W. Inflammation-induced expression of sialyl Lewis X-containing glycan structures on alpha 1-acid glycoprotein (orosomucoid) in human sera. *J. Exp. Med.* **1993**, *177*, 657–666. [CrossRef]
16. Dube, R.; Rook, G.A.W.; Steele, J.; Brealey, R.; Dwek, R.; Rademacher, T.; Lennard-Jones, J. Agalactosyl IgG in inflammatory bowel disease: Correlation with C-reactive protein. *Gut* **1990**, *31*, 431–434. [CrossRef]
17. Bauer, A.; Habor, A. Detection of Autoantibodies Against Nucleoprotein p62 in Sera of Patients with Primary Biliary Cholangitis. *Ann. Lab. Med.* **2019**, *39*, 291–298. [CrossRef]
18. Gershwin, M.E.; Mackay, I.R.; Sturgess, A.; Coppel, R.L. Identification and specificity of a cDNA encoding the 70 kd mitochondrial antigen recognized in primary biliary cirrhosis. *J. Immunol.* **1987**, *138*, 3525–3531.
19. Kaplan, M.M.; Gershwin, M.E. Primary biliary cirrhosis. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353*, 1261–1273. [CrossRef]
20. Terziroli Beretta-Piccoli, B.; Stirnimann, G.; Cerny, A.; Semela, D.; Hessler, R.; Helbling, B.; Stickel, F.; Kalid-de Bakker, C.; Bihl, F.; Giostra, E.; et al. Geoepidemiology of Primary Biliary Cholangitis: Lessons from Switzerland. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2018**, *54*, 295–306. [CrossRef]
21. Poupon, R.; Chazouilleres, O.; Balkau, B.; Poupon, R.E. Clinical and biochemical expression of the histopathological lesions of primary biliary cirrhosis. UDCA-PBC Group. *J. Hepatol.* **1999**, *30*, 408–412. [CrossRef]
22. Lindor, K.D.; Gershwin, M.E.; Poupon, R.; Kaplan, M.; Bergasa, N.V.; Heathcote, E.J. American Association for Study of Liver Diseases. Primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **2009**, *50*, 291–308. [CrossRef] [PubMed]
23. Faubion, W.A.; Guicciardi, M.E.; Miyoshi, H.; Bronk, S.F.; Roberts, P.J.; Svingen, P.A.; Kaufmann, S.H.; Gores, G.J. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J. Clin. Investig.* **1999**, *103*, 137–145. [CrossRef] [PubMed]
24. Scheuer, P.J. *Liver Biopsy Interpretation*; Balliere Tindall: London, UK, 1980; pp. 35–59.
25. Gruszewska, E.; Wrona, A.; Gudowska, M.; Cylwik, B.; Lipartowska-Klimuk, K.; Flisiak, R.; Chrostek, I. The transferrin isoforms in chronic hepatitis. *Clin. Biochem.* **2017**, *50*, 1131–1135. [CrossRef]
26. Gruszewska, E.; Cylwik, B.; Matus, L.; Gudowska, M.; Szmitkowski, M.; Kedra, B.; Chrostek, L. Changes in transferrin isoforms in pancreatic cancer. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **2016**, *46*, 286–290.

27. Gudowska, M.; Gruszewska, E.; Wrona, A.; Gindzienska-Sieskiewicz, E.; Domyslowska, I.; Lipartowska-Klimiuk, K.; Cylwik, B.; Sierakowski, S.; Chrostek, L. The profile of serum transferrin isoforms in rheumatoid arthritis. *JCR J. Clin. Rheumatol.* **2019**, *25*, 159–162. [CrossRef]
28. Gudowska, M.; Gruszewska, E.; Panasiuk, A.; Cylwik, B.; Swiderska, M.; Flisiak, R.; Szmitkowski, M.; Chrostek, L. Changed profile of serum transferrin isoforms in liver diseases. *Clin. Lab.* **2017**, *63*, 349–354. [CrossRef]



© 2020 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 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Article

The Serum Profile of Transferrin Isoforms in Pancreatitis

Agnieszka Mucha ¹, Malgorzata Zaczek ², Michal Kralisz ², Ewa Gruszewska ³, Bogdan Cylwik ⁴, Anatol Panasiuk ^{2,5} and Lech Chrostek ^{3,*}

¹ Department of Laboratory Diagnostics, University Clinical Hospital in Bialystok, 15-535 Bialystok, Poland; agnieszka.grytczuk@onet.eu

² Department of Gastroenterology, Hepatology and Internal Diseases with the Center of Diagnostics and Endoscopic Treatment, Provincial Welded Hospital in Bialystok, 15-278 Bialystok, Poland; malgorzata_zaczek1@wp.pl (M.Z.); michal.kralisz@gmail.com (M.K.); anatol@panasiuk.pl (A.P.)

³ Department of Biochemical Diagnostics, Medical University of Bialystok, 15-269 Bialystok, Poland; ewa.gruszewska@umb.edu.pl

⁴ Department of Pediatric Laboratory Diagnostics, Medical University of Bialystok, 15-274 Bialystok, Poland; cylwikb@umb.edu.pl

⁵ Department of Clinical Medicine, Medical University of Bialystok, 15-254 Bialystok, Poland

* Correspondence: lech.chrostek@umb.edu.pl



Citation: Mucha, A.; Zaczek, M.; Kralisz, M.; Gruszewska, E.; Cylwik, B.; Panasiuk, A.; Chrostek, L. The Serum Profile of Transferrin Isoforms in Pancreatitis. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 1638. <https://doi.org/10.3390/jcm11061638>

Academic Editor: Stanley W. Ashley

Received: 2 March 2022

Accepted: 14 March 2022

Published: 16 March 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: Total transferrin concentration changes in acute-phase reactions. Additionally, the alteration of transferrin glycosylation in inflammations can occur. The aim of this study is to evaluate the effect of pancreatitis on the serum profile of transferrin isoforms. The tested groups consisted of 84 patients with acute pancreatitis and 42 patients with chronic hepatitis. Transferrin isoforms were analyzed by capillary electrophoresis on a MINICAP electrophoretic system (Sebia, France). There was a significant decrease in the concentration of pentasialotransferrin in both acute and chronic pancreatitis, and a significant increase in tetrasialotransferrin in the acute pancreatitis group when compared to the control group. There were no significant changes in transferrin isoforms between the acute and chronic pancreatitis groups, and between the edematous and necrotizing forms of the disease. Considering the etiology of acute pancreatitis, we noticed higher values of bile acids and γ -glutamyltransferase in acute pancreatitis of alcoholic etiology than that in pancreatitis of other etiologies. In conclusion, the alterations in transferrin isoform profile in acute and chronic pancreatitis are not organ specific. Because similar changes were observed in hepatitis, we can conclude that the serum profile of transferrin isoforms is involved in the pathogenesis of the disease.

Keywords: pancreatitis; transferrin isoforms; capillary electrophoresis

1. Introduction

It is well known that alterations in protein glycosylation occur in various diseases, including inflammations, which, as a result, cause a quantitative shift in glycoforms of different glycoproteins [1,2]. One such highly variable glycoprotein is transferrin (Tf), whose different isoforms result from variations in the glycosylation of oligosaccharide chains [3]. Additionally, transferrin is a negative acute-phase protein, whose concentration decreases during inflammatory responses [4]. Previously, we reported the changed profile of carbohydrate-deficient transferrin (a sum of the asialo, monosialo and disialo isoforms of transferrin, CDT for short) in pancreatic diseases, including pancreatitis of different etiologies (alcoholic and biliary) [5] and in pancreatic cancers [6]. It has been also shown that transferrin sialylation can be a potential prognostic marker for the severity of acute pancreatitis [7]. In this study, we determine the profile of transferrin isoforms by means of the capillary electrophoresis method, which enables the determination of five different isoforms (asialo-, disialo-, trisialo-, tetrasialo- and pentasialo-transferrin) [8]. We expect to obtain the characteristic profile of Tf isoforms, which is different from that in pancreatic cancers [6], liver [9,10] and rheumatic diseases [11,12].

2. Patients and Methods

2.1. Patients

The study was carried out on the sera of 84 patients (59 men and 25 women) with acute pancreatitis (mean age: 38 years; range: 23–70 years) and 42 patients (34 men and 8 women) with chronic pancreatitis (mean age: 46 years; range: 19–71 years) admitted to the Department of Gastroenterology, Hepatology and Internal Diseases with the Center of Diagnostics and Endoscopic Treatment (Provincial Welded Hospital in Białystok, Poland).

2.2. Blood Sampling

Blood samples (7 mL) were taken from all patients by vein puncture once after admittance. The blood was allowed to clot. The sera were separated by centrifugation at 1500 g for 10 min at room temperature. All samples were stored at 86 °C until analysis. In addition to sera, portions of each blood sample were subsequently collected into two tubes: one containing anticoagulant (ethylene-diamine tetraacetic acid (EDTA-2K)) for hematological assays (MCV and platelets), and the second containing sodium citrate (0.1 M/L) for coagulation tests [PT, INR].

2.3. Diagnosis

The diagnosis of acute pancreatitis (AP) was made on the basis of clinical signs and symptoms (upper abdominal pain, abdominal pain that radiates to the back, tenderness when touching the abdomen, fever, rapid pulse, nausea and vomiting). The diagnosis of chronic pancreatitis (CP) was made on the basis of the following clinical signs and symptoms: upper abdominal pain, abdominal pain that feels worse after eating, losing weight without trying, and oily, smelly stools. To confirm the diagnosis, each patient underwent blood tests (pancreatic enzymes, complete blood count and liver enzymes), abdominal ultrasound, computerized tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI), endoscopic ultrasound, and stool tests). To resolve the diagnostic problems in the bile tract and pancreatic duct, and to remove obstructions, such as gallstones, Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography (ERCP) was recommended. Acute intestinal edematous pancreatitis was observed in 42 AP patients and acute necrotizing pancreatitis in 42 AP patients. The alcoholic etiology of pancreatitis was approved in 21 patients. Other causes of acute pancreatitis were: gallstones, hypertriglyceridemia, drugs and unknown causes. The control subjects ($n = 30$; 16 men and 14 women aged 32 years; range 22–54 years) were recruited from healthy volunteers. The laboratory characteristics of patients and controls are presented in Table 1. Written informed consent was obtained from each patient after the explanation of the nature of the study. The study was approved by the local research ethics committee for Medical University of Białystok (APK.002.67.2020).

2.4. Laboratory Testing

Amylase, lipase, AST, ALT, GGT, ALP, glucose, total bilirubin, total transferrin, C-reactive protein (CRP), cholesterol (Chol), and triglycerides (TG) were determined on a Cobas c501 Analyzer (Hitachi, Tokyo, Japan). The platelet count (PLT) was measured on a Sysmex XS-800i (Sysmex Corporation, Singapore). Prothrombin time (PT) was measured on an STA Compact Max analyzer (Stago) by the viscometric method. Total bile acids (BA) were determined by the enzyme cycling method using the Diazyme Total Bile Acids Assay kit (Diazyme Laboratories, Gregg Court, Poway, CA, USA) on Indiko Plus analyzer (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland).

Table 1. The characteristics of the controls and the acute and chronic pancreatitis groups.

Test	Controls (n = 30)	Acute Pancreatitis (n = 84)	Chronic Pancreatitis (n = 42)
MCV [fl]	87.1 ± 4.5	90.7 ± 5.8 *	88.0 ± 4.4
PLT [10 ⁹ /L]	243.2 ± 55.1	258.1 ± 138.7	192.4 ± 66.7
PT [sec]	12.42 ± 0.42	13.04 ± 1.35	11.8 ± 1.5
INR	0.93 ± 0.04	1.09 ± 0.11 *	0.98 ± 0.12
CDT [%]	0.62 ± 0.19	1.53 ± 1.86 *	1.38 ± 2.07
5-sialoTf [%]	18.61 ± 6.03	13.76 ± 2.20 *	12.95 ± 2.58 *
4-sialoTf [%]	76.84 ± 5.62	80.82 ± 2.87 *	80.23 ± 3.36
3-sialoTf [%]	3.61 ± 1.16	3.80 ± 1.17	5.43 ± 3.18
Transferrin [g/L]	3.14 ± 0.57	1.74 ± 0.50 #	2.23 ± 0.48 *
BA [μMol/L]	3.55 ± 2.14	10.75 ± 20.22	18.75 ± 28.34
Glucose [mM/L]	5.22 ± 0.42	5.56 ± 2.32	6.22 ± 2.33
AST [IU]	23.2 ± 5.3	70.6 ± 73.7 *	41.8 ± 20.8
ALT [IU/L]	17.6 ± 8.3	74.3 ± 79.1 *	57.5 ± 54.2
GGT [IU/L]	23.3 ± 7.3	221.7 ± 238.5 *	210.0 ± 168.2 *
Amylase [IU/L]	58.6 ± 14.3	627.7 ± 714.41 *#	94.5 ± 85.8
Lipase [IU/L]	36.4 ± 13.3	1263 ± 1931 #	91.0 ± 118.1
ALP [IU/L]	61.4 ± 11.2	113.3 ± 110.3 *	194.5 ± 130.8 *
CRP [mg/L]	1.03 ± 0.78	96.0 ± 112.5 *#	4.5 ± 3.5 *
Bilirubin [μM/L]	12.48 ± 5.30	17.61 ± 11.6	11.45 ± 1.54
Cholesterol [mM/L]	5.13 ± 0.81	3.94 ± 1.18 *	4.77 ± 2.04
TG [mM/L]	1.12 ± 0.32	1.49 ± 0.92	1.43 ± 0.79

* Significant difference in comparison with the controls. # Significant difference in the comparison between AP and CP group.

2.5. Transferrin Isoforms Testing

The electrophoretic analysis of transferrin was performed on a MINICAP system (Sebia, France), according to the manufacturer's instructions. The MINICAP CDT reagent kit (Sebia, France) was applied. The MINICAP system uses the principle of capillary electrophoresis (CE) in a free solution. The system performs all sequences automatically to obtain a complete transferrin isoform profile for the quantitative analysis of each fraction. The human serum transferrin isoforms were separated in an alkaline buffer (pH 8.8) into five major fractions according to their sialylation level: asialotransferrin, disialotransferrin, trisialotransferrin, tetrasialotransferrin and pentasialotransferrin.

2.6. Statistical Analysis

Results are expressed as means and standard deviations. The differences between tested and control groups were evaluated by Mann–Whitney U-test. We considered p values < 0.05 as statistically significant.

3. Results

The results of tests in the controls and acute and chronic pancreatitis are presented in Table 1. The mean values of MCV, PT, CDT, AST, ALT, amylase, lipase, ALP and CRP were significantly higher, but the mean values of 5-sialoTf, total transferrin and cholesterol were significantly lower in the AP group than that in the controls. In the chronic pancreatitis group, the mean values of GGT, ALP and CRP were significantly higher, but total transferrin was significantly lower in the CP group than that in the controls.

While testing the concentrations of transferrin isoforms, a statistically significant decrease in the 5-sialoTf concentrations in the acute and chronic pancreatitis groups was observed in comparison with the control group ($p = 0.003$ and $p = 0.026$, respectively) (Figure 1). Among the other isoforms of transferrin, only the concentration of 4-sialoTf was significantly higher in the acute pancreatitis group than that in the controls ($p = 0.011$). The concentration of 4-sialoTf, among other isoforms of transferrin, was exclusively one to be significantly higher in acute pancreatitis group than that in the controls. The concentrations

of 3-sialoTf did not significantly change in both the (AP and CP) tested groups when compared to the control group ($p = 0.722$ and $p = 273$, respectively). There were also no significant differences in the concentrations of transferrin isoforms between the acute and chronic pancreatitis groups. Total transferrin concentrations were significantly lower in the AP and CP groups in comparison with the controls ($p < 0.001$ and $p = 0.002$, respectively) and in the acute pancreatitis group, it was significantly lower than that in the chronic pancreatitis group ($p = 0.028$).

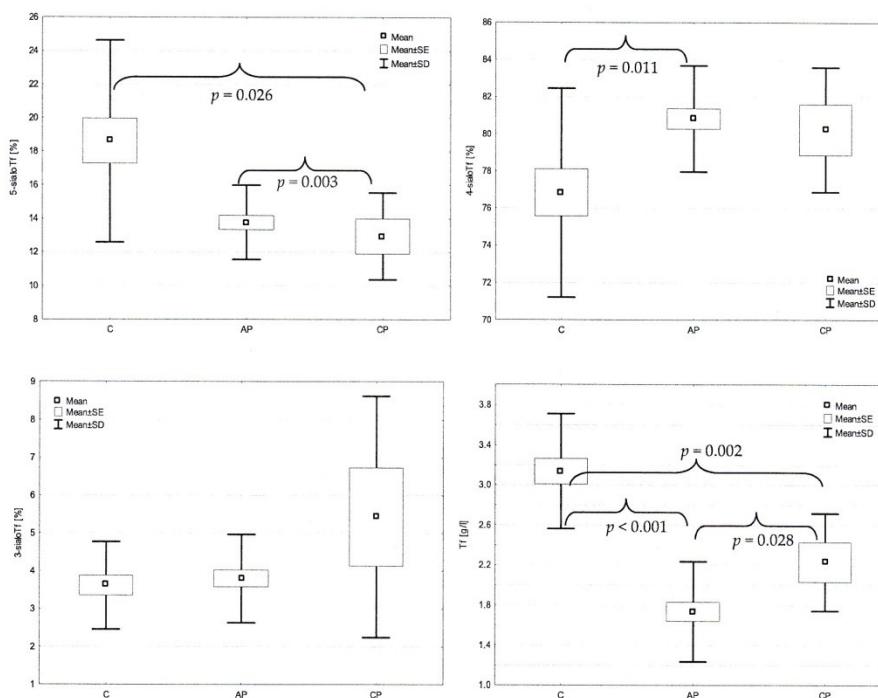


Figure 1. The concentrations of transferrin isoforms and total transferrin in the control (C), acute pancreatitis (AP) and chronic pancreatitis (CP) groups.

Taking into consideration the morphological classification of acute pancreatitis, there were no statistically significant differences between edematous and necrotizing acute pancreatitis, also for carbohydrate-deficient transferrin (CDT) and other transferrin isoforms. Comparing the alcoholic and other etiologies of acute pancreatitis (Figure 2), there were significantly higher concentrations of bile acids ($11.63 \pm 9.46 \mu\text{M/L}$) and the activity of GGT ($338 \pm 238 \text{ IU/L}$) in the alcoholic etiology of AP than that in the pancreatitis of other etiologies ($5.75 \pm 7.05 \mu\text{M/L}$ and $154 \pm 175 \text{ IU/L}$, respectively) ($p = 0.036$ and $p = 0.017$, respectively).

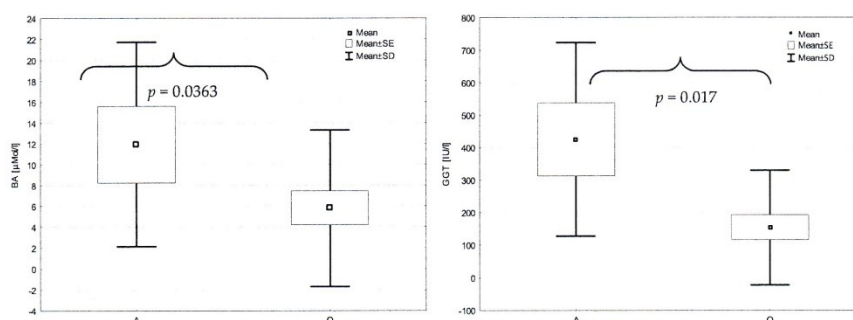


Figure 2. The concentration of bile acids (BA) and the activity of GGT in the acute pancreatitis of alcoholic (A) and other (O) etiologies.

4. Discussion

In this paper, we tried to determine the profile of transferrin isoforms in pancreatitis, in acute as well as in chronic forms of disease, in accordance with the knowledge on the changes of protein glycosylation in the course of inflammatory diseases. Because we previously assessed the profile of transferrin isoforms in many different diseases, including liver diseases, rheumatic diseases and pancreatic cancers, we have the opportunity to compare the changes in pancreatitis with the changes in the diseases mentioned above [6,10,11,13]. This situation created the possibility to show whether these changes are characteristic for pancreatitis or only organ-dependent inflammation. First, we found the changed profile of transferrin isoforms in pancreatitis, with more severe changes in acute pancreatitis. Thus, the concentration of pantoalotransferrin was decreased in both forms of pancreatitis, but the concentration of tetrasialotransferrin was only elevated in the acute form of pancreatitis. The concentration of trisialotransferrin was not changed and asialotransferrin was undetectable. As expected, the total transferrin concentration was diminished in both forms of pancreatitis, with an apparent greater decrease in acute pancreatitis. Looking at our earlier works, we can only see a similarity to the profile of transferrin isoforms in chronic hepatitis [13]. At the same time, we find differences in the transferrin isoform profile in other liver diseases [9]; in rheumatic diseases, including rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis and juvenile idiopathic arthritis [11,12,14]; and in pancreatic cancers [6]. Thus, we can conclude that the change in transferrin isoform profile in pancreatitis is only similar to that seen in hepatitis [13]. It is also different from that observed in pancreatic cancers [6]. In summary, the changes in serum transferrin isoform profile are not organ specific, but are characteristic for the pathogenesis of disease, in this case, inflammation.

As expected, we obtained a decreased total concentration of transferrin, with lower level in acute pancreatitis than that in the chronic one. It is a consequence of the nature of this glycoprotein as a negative protein of acute-phase reaction. From a diagnostic point of view, in many clinical situations, it is not sufficient to estimate only the total concentration of the measured compound, but also its components. This is especially true as far as enzymes (i.e., isoenzymes) and proteins (i.e., isoforms) are concerned. Therefore, the changes in the individual components of the whole system are of greater importance, regardless of the direction of shift of the entire system. Thus, individual isoforms that shift in varied directions can be observed. Moreover, it should be remembered that the results are expressed as a percentage. On the other hand, we do not have information about the absolute concentration of the isoforms. Therefore, it should not be interpreted that a reduction of about 30% of the isoform contribution in the total concentration is insufficient to reduce the total protein concentration by about 40%. These values cannot be compared with each other because they signify completely different things.

In this study, we expected changes in transferrin isoform profile due to the histological picture of pancreatitis, but we did not find differences between necrotic and edematous forms of inflammation. It may be because transferrin is mainly synthesized in the liver, and the effect of pancreatic inflammation on the liver is independent of the histological picture of pancreatic diseases [3]. However, we expected differences because, in the edematous form of pancreatitis, only the swelling and disruption of cytoplasmic organelles in the acinar cells occurs, but in necrotizing pancreatitis, the necrosis of the epithelial duct with periductal acute inflammation occurs [15]. The necrosis of cells should be accompanied by the release of the cells' organelle content, such as proteins, glycoproteins, and enzymes. In this study, we did not observe any changes in all the studied laboratory tests, including transferrin isoforms, between the edematous and necrotizing forms of acute pancreatitis.

While testing the changes in other laboratory tests (Table 1), we did not see changes in bile acid concentration (due to the wide dispersion of results); however, taking into consideration the etiology of acute pancreatitis, we noticed significant differences. In acute pancreatitis of alcoholic etiology, the concentration of bile acids is higher than that in pancreatitis of other etiologies. We observed a similar change in the case of GGT, which seems to be an evident alteration considering the role of this enzyme as an indicator of alcohol abuse [16]. An increased level of bile acids in alcoholic liver diseases was confirmed in other studies [17,18].

In our opinion, it is necessary to distinguish the etiology of pancreatitis in the mixed group, especially in the group with obstructions in the biliary tract, as opposed to the other causes of inflammation (such as drugs and hypertriglyceridemia).

5. Conclusions

In conclusion, we showed the changes in transferrin isoform profile in acute and chronic pancreatitis, which are not organ specific, but specific to the pathogenesis of the disease, in this case, inflammation.

Author Contributions: Conceptualization, A.M. and L.C.; laboratory investigation, A.M., E.G. and B.C.; data curation, M.K., M.Z. and A.P.; writing—original draft preparation, A.M., M.Z. and E.G.; writing—review and editing, B.C. and A.P.; supervision, L.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Medical University in Białystok, Poland (protocol code APK.002.67.2020).

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

Data Availability Statement: Data sharing not applicable.

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

References

1. Axford, J.S. Glycosylation and rheumatic diseases. *Biochem. Biophys. Acta* **1999**, *1455*, 219–229. [CrossRef]
2. Blomme, B.; van Steenkiste, C.; Callewaert, N.; van Vlierberghe, H. Alteration of protein glycosylation in liver diseases. *J. Hepatol.* **2009**, *50*, 592–603. [CrossRef] [PubMed]
3. van Eijk, H.G.; van Noort, W.L.; de Jong, G.; Koster, J.F. Human serum sialo transferrins in diseases. *Clin. Chim. Acta* **1987**, *165*, 141–145. [CrossRef]
4. Gabay, C.; Kushner, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.* **1999**, *340*, 448–454. [CrossRef] [PubMed]
5. Cylwik, B.; Gruszewska, E.; Gudowska, M.; Lipartowska-Klimiuk, K.; Szmitkowski, M.; Kedra, B.; Chrostek, L. Serum carbohydrate-deficient transferrin in pancreatic diseases of different etiologies. *Clin. Lab.* **2016**, *62*, 1787–1793. [CrossRef] [PubMed]
6. Gruszewska, E.; Cylwik, B.; Matus, L.; Gudowska, M.; Szmitkowski, M.; Kedra, B.; Chrostek, L. Changes in transferrin isoforms in pancreatic cancer. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **2016**, *46*, 286–290. [PubMed]

7. Gornik, O.; Gornik, I.; Gasparovic, V.; Lauc, G. Change in transferrin sialylation is a potential prognostic marker for severity of acute pancreatitis. *Clin. Biochem.* **2008**, *41*, 504–510. [CrossRef] [PubMed]
8. Schellenberg, F.; Wienders, J.P. Evaluation of capillary electrophoresis assay for CDT on SEBIA's Capillary System: Intra and inter laboratory precision, reference interval and cut-off. *Clin. Chim. Acta* **2010**, *411*, 1888–1893. [CrossRef] [PubMed]
9. Gudowska, M.; Gruszewska, E.; Panasiuk, A.; Cylwik, B.; Swiderska, M.; Flisiak, R.; Szmitkowski, M.; Chrostek, L. Changed profile of serum transferrin isoforms in liver diseases. *Clin. Lab.* **2017**, *63*, 349–354. [CrossRef] [PubMed]
10. Grytczuk, A.; Bauer, A.; Gruszewska, E.; Cylwik, B.; Chrostek, L. Changed profile of serum transferrin isoforms in Primary Biliary Cholangitis. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 2894. [CrossRef] [PubMed]
11. Gudowska, M.; Gruszewska, E.; Wrona, A.; Gindzienska-Sieskiewicz, E.; Domysłowska, I.; Cylwik, B.; Sierakowski, S.; Chrostek, L. The profile of serum transferrin isoforms in rheumatoid arthritis. *JCR J. Clin. Rheumatol.* **2019**, *25*, 159–162. [CrossRef] [PubMed]
12. Chrostek, L.; Gindzienska-Sieskiewicz, E.; Gruszewska, E.; Kowal-Bielecka, O.; Cylwik, B. Transferrin isoforms analysis by capillary electrophoresis in systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis. *Scand. J. Clin. Lab. Investig.* **2020**, *80*, 567–570. [CrossRef] [PubMed]
13. Gruszewska, E.; Wrona, A.; Gudowska, M.; Panasiuk, A.; Cylwik, B.; Lipartowska-Klimuk, K.; Flisiak, R.; Chrostek, L. The transferrin isoforms in chronic hepatitis. *Clin. Biochem.* **2017**, *50*, 1131–1135. [CrossRef] [PubMed]
14. Gruszewska, E.; Sienkiewicz, M.; Abramowicz, P.; Konstantynowicz, J.; Gudowska-Sawczuk, M.; Chrostek, L.; Cylwik, B. Serum profile of transferrin isoforms in JIA: A preliminary study. *Rheumatol. Int.* **2018**, *38*, 1235–1240. [CrossRef] [PubMed]
15. Sarner, M.; Cotton, P.B. Classification of pancreatitis. *Gut.* **1984**, *25*, 756–759. [CrossRef] [PubMed]
16. Ivanov, E.; Adjarov, D.; Etarska, M.; Stankushev, T.; Brumbarov, K.; Kerimova, M. Elevated liver gamma-glutamyl transferase in chronic alcoholics. *Enzyme* **1980**, *25*, 304–308. [CrossRef] [PubMed]
17. Milstein, H.J.; Bloomer, J.R.; Klatskin, G. Serum bile acids in alcoholic liver disease. Comparison with histological features of the disease. *Am. J. Dig. Dis.* **1976**, *21*, 281–285. [CrossRef] [PubMed]
18. Trinchet, J.C.; Gerhardt, M.F.; Balkau, B.; Munz, C.; Poupon, R.E. Serum bile acids and cholestasis in alcoholic hepatitis. Relationship with usual liver tests and histological features. *J. Hepatol.* **1994**, *21*, P235–P240. [CrossRef]

14. Zgoda Komisji Bioetycznej

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

Białystok, 28-11-2019

Uchwała nr: R-I-002/563/2019

Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, po zapoznaniu się z projektem badania zgodnie z zasadami GCP/ Guidelines for Good Clinical Practice /- **w y r a ż a z g o d ę** na prowadzenie tematu badawczego: „Profil izoform transferyny w pierwotnym zapaleniu dróg żółciowych (PBC)” przez prof. dr hab. Lecha Chrostka wraz z zespołem badawczym z UMB.

Z-ca Przewodniczącej Komisji Bioetycznej UMB


dr n. farm. Krzysztof Chrzanowski

*W powyższym projekcie jest udziałem zespołu badawczego
p. mgr Agnieszka Gajda*

E. Staszczak

UNIwersYTET MEDYCZNY
w Białymstoku
KOMISJA BIOETYCZNA
089 Białystok, ul. Jana Kilińskiego 1

**KOMISJA BIOETYCZNA
UNIwersYTETU MEDYCZNEGO w BIAŁYMSTOKU**

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

Białystok, 30.01.2020r.

Uchwała nr: APK.002.67.2020

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 z a z g o d ę** na prowadzenie tematu badawczego: „Profil izoform transferyny w zapaleniu trzustki i dróg żółciowych” przez prof. dr hab. Lecha Chrostka wraz z zespołem badawczym z UMB.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej UMB

prof. dr hab. Otylia Kowal-Bielecka

W powyższym projekcie badawczym w składzie zespołu jest mgr Agnieszka Gąbka.

UNIwersYTET MEDYCZNY
w Białymstoku
KOMISJA BIOETYCZNA
15-089 Białystok, ul. Jana Kilińskiego 1

15. Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Mgr Agnieszka Mucha
imię i nazwisko współautora

Białystok, 29.09.2022 r.

Zakład Diagnostyki Biochemicznej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. „Changed profile of serum transferrin isoforms in primary biliary cholangitis” autorów Grytczuk A., Bauer A., Gruszewska E., Cylwik B., Chrostek L., opublikowanej w Journal of Clinical Medicine. 2020, 9(9), 2894, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Ocena stężenia izoform transferyny we krwi chorych na pierwotne zapalenie dróg żółciowych oraz zapalenia trzustki” wynoszący 55 %, polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zebraniu i przeglądzie literatury, oznaczeniu badanych parametrów, interpretacji uzyskanych wyników, sformułowaniu wniosków oraz napisaniu i przygotowaniu pracy do publikacji.
2. „The serum profile of transferrin isoforms in pancreatitis” autorów: Mucha A., Żaczek M., Kralisz M., Gruszewska E., Cylwik B., Panasiuk A., Chrostek L., opublikowanej w Journal of Clinical Medicine, 2022, 11(6), 1638, , wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Ocena stężenia izoform transferyny we krwi chorych na pierwotne zapalenie dróg żółciowych oraz zapalenia trzustki” wynoszący 55% polegał na ustaleniu koncepcji pracy, zgromadzeniu i przeglądzie literatury, oznaczeniu badanych parametrów, interpretacji uzyskanych wyników, sformułowaniu wniosków oraz napisaniu i przygotowaniu pracy do publikacji.

.....Agnieszka Mucha.....
Podpis

16. Oświadczenia współautorów publikacji

Dr n. med. Alicja Bauer
imię i nazwisko współautora

Warszawa, 29.09.2022 r.

Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej
Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. „Changed profile of serum transferrin isoforms in primary biliary cholangitis” autorów Grytczuk A., Bauer A., Gruszewska E., Cylwik B., Chrostek L., opublikowanej w Journal of Clinical Medicine. 2020, 9(9), 2894, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Ocena stężenia izoform transferyny we krwi chorych na pierwotne zapalenie dróg żółciowych oraz zapalenia trzustki” wynoszący 15%, polegał na zebraniu i zabezpieczeniu materiału do badań, oznaczeniu wybranych parametrów oraz udostępnieniu danych klinicznych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Agnieszkę Muchę publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej
Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego



dr n. med. Alicja Bauer

.....
Podpis

Dr hab. Ewa Gruszewska
imię i nazwisko współautora

Białystok, 29.09.2022 r.

Zakład Diagnostyki Biochemicznej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. „Changed profile of serum transferrin isoforms in primary biliary cholangitis” autorów Grytczuk A., Bauer A., Gruszewska E., Cylwik B., Chrostek L., opublikowanej w Journal of Clinical Medicine. 2020, 9(9), 2894, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Ocena stężenia izoform transferyny we krwi chorych na pierwotne zapalenie dróg żółciowych oraz zapalenia trzustki” wynoszący 10 %, polegał na zabezpieczeniu i przygotowaniu próbek do analizy, oznaczeniu wybranych parametrów.
2. „The serum profile of transferrin isoforms in pancreatitis” autorów: Mucha A., Żaczek M., Kralisz M., Gruszewska E., Cylwik B., Panasiuk A., Chrostek L., opublikowanej w Journal of Clinical Medicine, 2022, 11(6), 1638, , wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Ocena stężenia izoform transferyny we krwi chorych na pierwotne zapalenie dróg żółciowych oraz zapalenia trzustki” wynoszący 5 %, polegał na oznaczeniu wybranych parametrów.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Agnieszkę Mucha publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Ewa Gruszewska
.....
Podpis

Prof. dr hab. Lech Chrostek
imię i nazwisko współautora

Białystok, 29.09.2022 r.

Zakład Diagnostyki Biochemicznej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku


Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. „Changed profile of serum transferrin isoforms in primary biliary cholangitis” autorów Grytczuk A., Bauer A., Gruszewska E., Cylwik B., Chrostek L., opublikowanej w Journal of Clinical Medicine. 2020, 9(9), 2894, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Ocena stężenia izoform transferyny we krwi chorych na pierwotne zapalenie dróg żółciowych oraz zapalenia trzustki” wynoszący 10 %, polegał na współpracowaniu koncepcji pracy, ocenie merytorycznej i ocenie ostatecznej wersji manuskryptu.
2. „The serum profile of transferrin isoforms in pancreatitis” autorów: Mucha A., Żaczek M., Kralisz M., Gruszewska E., Cylwik B., Panasiuk A., Chrostek L., opublikowanej w Journal of Clinical Medicine, 2022, 11(6), 1638, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Ocena stężenia izoform transferyny we krwi chorych na pierwotne zapalenie dróg żółciowych oraz zapalenia trzustki” wynoszący 10 %, polegał na współpracowaniu koncepcji pracy, ocenie merytorycznej i ocenie ostatecznej wersji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Agnieszkę Mucha publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.


.....
Podpis

Dr hab. Bogdan Cylwik
imię i nazwisko współautora

Białystok, 29.09.2022 r.

Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Pediatricznej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

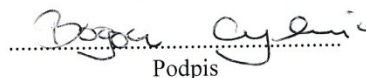
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

- 1- „Changed profile of serum transferrin isoforms in primary biliary cholangitis” autorów Grytczuk A., Bauer A., Gruszewska E., Cylwik B., Chrostek L., opublikowanej w Journal of Clinical Medicine. 2020, 9(9), 2894, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Ocena stężenia izoform transferyny we krwi chorych na pierwotne zapalenie dróg żółciowych oraz zapalenia trzustki” wynoszący 10 %, polegał na oznaczeniu wybranych parametrów oraz merytorycznej ocenie opracowań statystycznych.
- 2- „The serum profile of transferrin isoforms in pancreatitis” autorów: Mucha A., Żaczek M., Kralisz M., Gruszewska E., Cylwik B., Panasiuk A., Chrostek L., opublikowanej w Journal of Clinical Medicine, 2022, 11(6), 1638, , wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Ocena stężenia izoform transferyny we krwi chorych na pierwotne zapalenie dróg żółciowych oraz zapalenia trzustki” wynoszący 5 %, polegał na oznaczeniu wybranych parametrów.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Agnieszkę Mucha publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.


Podpis

Lek. med. Małgorzata Żaczek
29.09.2022 r.
imię i nazwisko współautora

Białystok,

Oddział Gastroenterologii, Hepatologii i Chorób Wewnętrznych
z Ośrodkiem Diagnostyki i Leczenia Endoskopowego
Wojewódzki Szpital Zespolony im. Jędrzeja Śniadeckiego
w Białymstoku

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. „The serum profile of transferrin isoforms in pancreatitis” autorów: Mucha A., Żaczek M., Kralisz M., Gruszewska E., Cylwik B., Panasiuk A., Chrostek L., opublikowanej w Journal of Clinical Medicine, 2022, 11(6), 1638, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Ocena stężenia izoform transferyny we krwi chorych na pierwotne zapalenie dróg żółciowych oraz zapalenia trzustki” wynoszący 10 %, polegał na kwalifikacji pacjentów, zebraniu materiału do badań.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Agnieszkę Mucha publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Małgorzata Żaczek
.....
Podpis

Lek. med. Michał Kralisz
imię i nazwisko współautora

Białystok, 29.09.2022 r.

Oddział Gastroenterologii, Hepatologii i Chorób Wewnętrznych
z Ośrodkiem Diagnostyki i Leczenia Endoskopowego
Wojewódzki Szpital Zespolony im. Jędrzeja Śniadeckiego
w Białymstoku

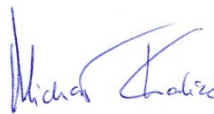
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. „The serum profile of transferrin isoforms in pancreatitis” autorów: Mucha A., Żaczek M., Kralisz M., Gruszewska E., Cylwik B., Panasiuk A., Chrostek L., opublikowanej w Journal of Clinical Medicine, 2022, 11(6), 1638, , wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Ocena stężenia izoform transferyny we krwi chorych na pierwotne zapalenie dróg żółciowych oraz zapalenia trzustki” wynoszący 10 %, polegał na kwalifikacji pacjentów oraz zebraniu materiału do badań.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Agnieszkę Mucha publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



.....
Podpis

Prof. dr hab. Anatol Panasiuk
29.09.2022 r.
imię i nazwisko współautora

Białystok,

Oddział Gastroenterologii, Hepatologii i Chorób Wewnętrznych
z Ośrodkiem Diagnostyki i Leczenia Endoskopowego
Wojewódzki Szpital Zespolony im. Jędrzeja Śniadeckiego
w Białymstoku

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. „The serum profile of transferrin isoforms in pancreatitis” autorów: Mucha A., Żaczek M., Kralisz M., Gruszewska E., Cylwik B., Panasiuk A., Chrostek L., opublikowanej w Journal of Clinical Medicine, 2022, 11(6), 1638, , wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Ocena stężenia izoform transferyny we krwi chorych na pierwotne zapalenie dróg żółciowych oraz zapalenia trzustki” wynoszący 5 %, polegał na nadzorze nad kwalifikacją pacjentów i udostępnieniem danych klinicznych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Agnieszkę Mucha publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



.....
Podpis

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

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

„Changed Profile of Serum Transferrin Isoforms in Primary Biliary Cholangitis” autorów: Agnieszka Grytczuk, Alicja Bauer, Ewa Gruszewska, Bogdan Cylwik, Lech Chrostek opublikowanej Journal of Clinical Medicine, 2020, 9(9), 2894.

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału	Procentowy wkład
mgr Agnieszka Grytczuk	Opracowanie koncepcji pracy, zebranie i przegląd literatury, oznaczenie badanych parametrów, interpretacja uzyskanych wyników, sformułowanie wniosków, napisanie i przygotowanie pracy do publikacji	55%
dr n. med. Alicja Bauer	Zebranie i zabezpieczenie materiału do badań, oznaczenie wybranych parametrów, udostępnienie danych klinicznych	15%
dr hab. Ewa Gruszewska	Zabezpieczenie i przygotowanie próbek do analizy, oznaczenie wybranych parametrów	10%
dr hab. Bogdan Cylwik	Merytoryczna ocena opracowań statystycznych	10%
prof. dr hab. Lech Chrostek	Współpracowanie koncepcji pracy, ocena merytoryczna, ocena ostatecznej wersji manuskryptu	10%

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej mgr Agnieszki Mucha

Podpis

Agnieszka Mucha

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

„The Serum Profile of Transferrin Isoforms in Pancreatitis” autorów: Agnieszka Mucha, Małgorzata Żaczek, Michał Kralisz, Ewa Gruszewska, Bogdan Cylwik, Anatol Panasiuk, Lech Chrostek opublikowanej Journal of Clinical Medicine, 2022, 11(6), 1638.

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału	Procentowy wkład
mgr Agnieszka Mucha	Ustalenie koncepcji pracy, zgromadzenie i przegląd literatury, oznaczenie badanych parametrów, interpretacja uzyskanych wyników, sformułowanie wniosków, napisanie i przygotowanie pracy do publikacji	55%
lek. med. Małgorzata Żaczek	Kwalifikacja pacjentów, zebranie materiału do badań	10%
lek. med. Michał Kralisz	Kwalifikacja pacjentów, zebranie materiału do badań	10%
dr hab. Ewa Gruszewska	Oznaczenie wybranych parametrów	5%
dr hab. Bogdan Cylwik	Oznaczenie wybranych parametrów	5%
prof. dr hab. Anatol Panasiuk	Nadzór nad kwalifikacją pacjentów, udostępnienie danych klinicznych	5%
prof. dr hab. Lech Chrostek	Współpracowanie koncepcji pracy, ocena merytoryczna, ocena ostatecznej wersji manuskryptu	10%

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej mgr Agnieszki Mucha

Podpis

Agnieszka Mucha