

**Mirosław Szmyt**

**Immunocytochemiczna ekspresja  
wybranych białek z rodziny S100  
oraz cytokin prozapalnych w kamiczym  
zapaleniu pęcherzyka żółciowego**

**Praca doktorska**

**Promotor: Prof. dr hab. med. ALDONA KASPRZAK**

**Katedra i Zakład Histologii i Embriologii  
Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu  
Kierownik Katedry i Zakładu: Prof. dr hab. med. Maciej Zabel**

**Poznań 2012**

Praca zrealizowana częściowo z grantu promotorskiego Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu (Nr 501-02-02229373-05360-50574).

Doktorant jest również stypendystą w ramach Poddziałania 8.2.2 „Regionalne Strategie Innowacji”, Działania 8.2 „Transfer wiedzy”, Priorytetu VIII „Regionalne Kadry Gospodarki” Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego Unii Europejskiej i z budżetu państwa.

## SPIS TREŚCI

	strona
<b>WYKAZ SKRÓTÓW UŻYWANYCH W TEKŚCIE</b> .....	4
<b>WSTĘP</b> .....	7
<b>1. Zapalenie pęcherzyka żółciowego (<i>Cholecystitis</i>)</b> zmiany histopatologiczne	9
1.1. Ostre zapalenie pęcherzyka żółciowego ( <i>cholecystitis acuta</i> , ACC).....	9
1.2. Przewlekłe zapalenie pęcherzyka żółciowego ( <i>cholecystitis chronica</i> , CCC)	9
<b>2. Cytokiny – wiadomości ogólne</b> .....	13
2.1. Wybrane cytokiny prozapalne (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) – znaczenie w patogenezie zapalenia pęcherzyka żółciowego ( <i>cholecystitis</i> ).....	15
2.1.1. Interleukina-1 (IL-1).....	16
2.1.1.2. Receptory rodziny IL-1.....	22
2.1.1.3. Interleukina-1 a kamica żółciowa.....	25
2.1.2. Interleukina 6 (IL-6).....	26
2.1.2.1. Receptory IL-6.....	29
2.1.2.2. Rola IL-6 w zapaleniu pęcherzyka żółciowego.....	32
2.1.3. Czynniki martwicy nowotworów $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ).....	33
2.1.3.1. Receptory dla TNF i limfotoksyn.....	37
2.1.3.2. TNF- $\alpha$ a kamica pęcherzyka żółciowego.....	39
<b>3. Białka z rodziny S100</b> .....	43
3.1. Ekspresja genowa S100A8 i S100A9.....	45
3.2. Receptory dla białek S100A8 i S100A9.....	48
3.3. Rola białek S100A8/A9 w chorobach przewodu pokarmowego.....	50
<b>ZAŁOŻENIA I CELE PRACY</b> .....	53
<b>MATERIAŁ I METODY</b> .....	55
<b>WYNIKI</b> .....	66
<b>OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA</b> .....	121
<b>WNIOSKI</b> .....	156
<b>STRESZCZENIE</b> .....	157
<b>SUMMARY</b> .....	160
<b>PIŚMIENNICTWO</b> .....	163

## WYKAZ SKRÓTÓW UŻYWANYCH W TEKŚCIE

<b>a.a.</b>	(ang. <i>amino acid</i> ) - aminokwas
<b>ABC</b>	(ang. <i>avidin-biotin peroxidase complex</i> ) – kompleks awidyna-biotynyłowana peroksydaza
<b>AGE</b>	(ang. <i>advanced glycation end products</i> ) - końcowe produkty zaawansowanej glikacji
<b>AP-1</b>	(ang. <i>activating protein -1</i> ) – czynnik transkrypcyjny AP-1
<b>BMI</b>	(ang. <i>Body Mass Index</i> ) – wskaźnik masy ciała
<b>BSA</b>	(ang. <i>bovine serum albumin</i> ) - albumina surowicy wołowej
<b>ACC</b>	(ang. <i>cholecystitis acuta</i> ) – ostre zapalenie pęcherzyka żółciowego
<b>cAMP</b>	(ang. <i>cyclic adenosine-3,5-monophosphate</i> ) – cykliczny 3'5'-adenozynomonofosforan
<b>CCC</b>	(ang. <i>cholecystitis chronica</i> ) – przewlekłe zapalenie pęcherzyka żółciowego
<b>C/EBP</b>	(ang. <i>CCAAT enhancer binding proteins, CCAAT binding factor</i> ) - czynniki transkrypcyjne C/EBP lub białka wiążące się z sekwencją CCAAT
<b>CREB</b>	(ang. <i>cAMP response element binding</i> ) – czynnik transkrypcyjny CREB, białko wiążące się z elementem odpowiedzi na cAMP
<b>DAB</b>	(ang. <i>3,3'-diaminobenzidine</i> ) - 3,3'-diaminobenzydyna
<b>DAMPs</b>	(ang. <i>damage/danger-associated molecular pattern proteins</i> ) – wzorce molekularne związane z uszkodzeniem/zagrożeniem
<b>EC</b>	(ang. <i>endothelial cells</i> ) – komórki śródbłonna
<b>ECF</b>	(ang. <i>Eosinophil Chemotactic Factor</i> ) – czynnik chemotaktyczny dla eozynofiliów
<b>EGF-R</b>	(ang. <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> ) – receptor naskórkowego czynnika wzrostu
<b>G</b>	(ang. <i>grading</i> ) – nasilenie zmian zapalnych
<b>G-CSF</b> stymulujący	(ang. <i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i> ) - czynnik stymulujący powstawanie kolonii granulocytów

<b>GM-CSF</b>	(ang. <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> ) - czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
<b>HEV</b>	(ang. <i>high endothelial venules</i> ) – żyłki postkapilarne z wysokim śródbłonkiem
<b>HLA</b>	(ang. <i>human leukocyte antigens</i> ) – antygeny ludzkich leukocytów
<b>IBD</b>	(ang. <i>inflammatory bowel disease</i> ) – zapalna choroba jelit
<b>ICAM-1</b>	(ang. <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> ) – cząsteczka adhezji międzykomórkowej
<b>ICE</b>	(ang. <i>interleukin-1 converting enzyme</i> ) – kaspaza 1
<b>IFN</b>	(ang. <i>interferon</i> ) – interferon
<b>IL</b>	(ang. <i>interleukin</i> ) – interleukina
<b>LAF</b>	(ang. <i>lymphocyte activating factor</i> ) - czynnik aktywujący limfocyty
<b>LAK</b>	(ang. <i>Lymphokine Activated Killer</i> ) – komórki cytotoksyczne aktywowane przez limfokiny
<b>LIF</b>	(ang. <i>leukemia inhibitory factor</i> ) - czynnik hamujący białaczkę
<b>LPS</b>	(ang. <i>lipopolysaccharide</i> ) – lipopolisacharyd (bakteryjny)
<b>LT-<math>\alpha</math></b>	limfotoksyna $\beta$
<b>M-CSF</b>	(ang. <i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> )- czynnik stymulujący powstawanie kolonii makrofagów
<b>MCP</b>	(ang. <i>membrane cofactor protein</i> ) – monocytarny, chemotaktyczny czynnik białkowy
<b>MPO</b>	(ang. <i>myeloperoxidase</i> ) – mieloperozydaza
<b>MUC5AC</b>	(ang. <i>mucin 5AC</i> ) – jedna z sekrecyjnych mucyn
<b>NADPH</b>	(ang. <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> ) – dinukleotyd nikotynamidoadeninowy
<b>NF-AT</b>	(ang. <i>nuclear factor of activated T cells</i> ) – czynnik jądrowy aktywowanych limfocytów
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	(ang. <i>nuclear factor <math>\kappa</math>B</i> ) - czynnik jądrowy $\kappa$ B
<b>OSM</b>	(ang. <i>oncostatin M</i> ) - onkostatyna M
<b>PAMP</b>	(ang. <i>pathogen associated molecular patterns</i> ) – molekularne wzorce wiązane z patogenami
<b>PBS</b>	(ang. <i>phosphate buffered saline</i> ) - sól fizjologiczna buforowana fosforanami

<b>PRR</b>	(ang. <i>pattern recognition receptors</i> ) – receptory rozpoznające wzorce (receptory dla PAMP)
<b>PKC</b>	(ang. <i>protein kinase C</i> ) – kinaza proteinowa C
<b>pż</b>	pęcherzyk żółciowy
<b>RA</b>	(ang. <i>rheumatoid arthritis</i> ) - reumatoidalne zapalenie stawów
<b>RAGE</b>	(ang. <i>receptor for advanced glycation and products</i> ) - receptor dla końcowych produktów glikozylacji
<b>RANTES</b>	(ang. <i>regulated on activation normal T cell expressed and secreted</i> ) – regulowany przez aktywację; ekspresja i wydzielanie przez prawidłowe limfocyty T
<b>ROS</b>	(ang. <i>reactive oxygen species</i> ) – wolne rodniki tlenowe
<b>SCF</b>	(ang. <i>stem cell factor</i> ) - czynnik komórek macierzystych
<b>SD</b>	(ang. <i>standard deviation</i> ) – odchylenie standardowe
<b>SDF-1</b>	(ang. <i>stromal cell-derived factor-1</i> ) - czynnik wzrostowy w szpiku kostnym dla prekursorów limfocytów
<b>SEM</b>	(ang. <i>standard error of the mean</i> ) – błąd standardowy średniej
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	(ang. <i>Transforming Growth Factor</i> ) – transformujący czynnik wzrostu alfa
<b>TIR</b>	(ang. <i>Toll-IL-1-receptor domain</i> ) – domena receptora Toll-podobnego
<b>TIR-MyD88</b>	(ang. <i>myeloid differentiaton antygen 88</i> ) – białko adaptorowe
<b>TLR</b>	(ang. <i>Toll-like receptor</i> ) – receptor Toll-podobny
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	(ang. <i>tumor necrosis factor</i> ) - czynnik martwicy nowotworów alfa
<b>VCAM-1</b>	(ang. <i>vascular cell adhesion molecule</i> ) – cząsteczka adhezyjna komórek śródbłonna

W przypadku powszechnego używania skrótów anglojęzycznych w literaturze, zwroty te pozostawiono w oryginalnym brzmieniu.

## WSTĘP

Do głównych czynników ryzyka wystąpienia kamicy żółciowej (*cholelithiasis*) należą: płeć żeńska, liczne ciążę i otyłość. Innymi czynnikami są: insulinooporność, uwarunkowania genetyczne i wiek [97, 154, 160, 180, 213]. Zachorowalność wzrasta znacznie w 5 i 6 dekadzie życia. Ma to związek ze zmniejszoną aktywnością fizyczną, błędami dietetycznymi, często nadwagą i zaburzeniami metabolicznymi oraz przewlekłym stosowaniem leków wpływających na metabolizm cholesterolu. Z wiekiem zmniejsza się także synteza kwasów żółciowych a zwiększa sekrecja cholesterolu do żółci [238]. W Polsce zapadalność na kamice żółciową oceniana jest na średnio 11-15% populacji (18% u kobiet, 8% u mężczyzn), co zbliżone jest do częstości występowania tego schorzenia w krajach Europy Zachodniej i USA [134, 238, 248]. W materiale autopsyjnym schorzenie to wykazano w znacznie większym odsetku badanych Polaków (36% kobiet i 14% mężczyzn) [224]. Obserwacje kliniczne wskazują, że kamica żółciowa występuje częściej u osób otyłych, zwłaszcza, jeśli jest to otyłość wieloletnia, występująca już w młodości. Otyłość występująca przed 25 r.ż. jest czynnikiem ryzyka kamicy niezależnie od płci [6, 81]. Wiek uznano za niezależny czynnik rozwoju kamicy cholesterolowej pęcherzyka żółciowego, co uwarunkowane jest zwiększeniem wydzielania żółci i jelitowej absorpcji cholesterolu, zmniejszeniem syntezy i sekrecji kwasów żółciowych w wątrobie oraz zmniejszeniem kurczliwości pęcherzyka żółciowego postępujących z wiekiem [260].

Tworzenie kamieni żółciowych jest rezultatem czynników genetycznych i środowiskowych. Dokładne mechanizmy powstawania kamieni żółciowych i przyczyny zapalenia pęcherzyka żółciowego (pż) nie są w pełni poznane. Etiologia kamicy żółciowej jest trudna do ustalenia, choć przyjmowane jest wiele sugestywnych hipotez. Patomechanizm powstawania kamieni różni się zasadniczo w zależności od typu złogów [237].

Szczególnie grupa młodych pacjentów z kamicy żółciową budzi zainteresowanie lekarzy, ponieważ obserwuje się rosnącą liczbę przypadków kamicy wśród coraz młodszych pacjentów [15, 118, 151, 155]. Przyczyna tego zjawiska jest słabo poznana. Najczęstszymi czynnikami ryzyka kamicy

pęcherzyka żółciowego u młodzieży (średnia wieku 14,8 lat) były: płeć żeńska, nawyki żywieniowe, otyłość i zaburzenia funkcji wątroby [151].

W kamicy pęcherzyka żółciowego opisano różne zmiany histopatologiczne ściany narządu, określane jako zapalenie ostre, przewlekłe, ziarniniakowe, cholesteroloza, hyperplazja gruczołów, dysplazja i rak pęcherzyka żółciowego [13].

Istnieje wiele hipotez dotyczących udziału samej reakcji zapalnej w patogenezie kamicy żółciowej. Obserwowano zróżnicowany w zależności od fazy zapalenia, wzrost stężenia cytokin prozapalnych (IL-1, TNF- $\alpha$  i IL-6) w surowicy krwi pacjentów z kamcią żółciową [251, 252]. Na mysim modelu *cholelithiasis* dowiedziono związku otyłości i zwiększonej ekspresji tkankowej cytokin prozapalnych [160]. Ekspozycja hodowanych komórek nabłonka pęcherzyka żółciowego na IL-1 $\alpha$  oraz TNF- $\alpha$  bezpośrednio uszkadzała funkcje absorpcyjne i sekrecyjne tych komórek, co mogło ułatwiać powstawanie kamieni [191].

Badania ostatnich lat wskazują na kluczową rolę białek z grupy S100 (głównie S100A8, A9, A12) produkowanych przez fagocyty (makrofagi i granulocyty obojętnochłonne) w inicjowaniu i utrzymywaniu się stanu zapalnego w przewodzie pokarmowym. Białka te są endogennymi aktywatorami wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Stymulują produkcję molekuł adhezyjnych, chemokin i cytokin prozapalnych (m.in. TNF- $\alpha$ ). Regulują funkcje cytoszkieletu komórkowego w czasie migracji makrofagów. Indukują kontakt makrofagów i komórek śródbłonka. Wykazują aktywność chemotaktyczną w stosunku do neutrofilów i monocytów (S100A8) [66, 67]. Obserwowano wzrost surowiczych i tkankowych poziomów tej grupy białek S100 w chorobach zapalnych jelit u dzieci [143]. Okazało się, że także białko S100B (typowe dla komórek układu nerwowego) odgrywa rolę w inicjowaniu i utrzymywaniu się stanu zapalnego w chorobach przewodu pokarmowego [59]. Rola białek S100 produkowanych przez fagocyty w patogenezie *cholelithiasis* jest słabo poznana i brakuje danych w dostępnym piśmiennictwie. Jedno z białek S100 (S100A4) uznano za czynnik prognostyczny w raku pęcherzyka żółciowego [169].

Poznanie funkcji białek S100 związanych z inicjowaniem i utrzymywaniem się stanu zapalnego oraz ich korelacji z tkankową ekspresją cytokin prozapalnych



w patogenezie *cholelithiasis* jest ciekawe zarówno z poznawczego, jak i praktycznego punktu widzenia dla stworzenia możliwości ewentualnej immunoterapii tego schorzenia.

## **1. Zapalenie pęcherzyka żółciowego (*Cholecystitis*) – zmiany histopatologiczne**

### **1.1. Ostre zapalenie pęcherzyka żółciowego (*cholecystitis acuta*, ACC)**

Ostre zapalenie pż (*cholecystitis acuta*) najczęściej współistnieje z kamicią i nazywane jest wówczas ostrym kamiczym zapaleniem pż [199]. Ściana pęcherzyka żółciowego ulega zmianom morfologicznym typowym dla zapalenia ostrego. Dochodzi do obrzęku, przekrwienia z wysiękiem początkowo surowiczo-krwistym, następnie ropnym. Widoczna jest zakrzepica drobnych naczyń krwionośnych z owrzodzeniami błony śluzowej [199, 236]. W początkowych stadiach choroby zwiększa się naciek z granulocytów obojętnochłonnych aż do powstania ropowicy. W miarę upływu czasu granulocyty stopniowo znikają, a pojawiają się limfocyty, komórki plazmatyczne i makrofagi. Rozrasta się tkanka łączna doprowadzając do zgrubienia i zeszywnienia ściany pż. Przyczyną zapalenia pż jest najprawdopodobniej działanie składników żółci, które przenikają do ściany narządu po jej uszkodzeniu przez kamień lub w następstwie rozciągnięcia. Później dołącza się zakażenie bakteryjne [199] Z drugiej strony zaburzenia kurczliwości pęcherzyka wraz z przesyleniem żółci cholesterolem i wypadaniem kryształów cholesterolu mają kluczowe znaczenie w litogenezie [180]. Ostre zapalenie pż może przekształcić się w przewlekłe zapalenie, wodniak i ropniak pż. Może dojść do przedziurawienia (perforacji) pęcherzyka żółciowego [199]

### **1.2. Przewlekłe zapalenie pęcherzyka żółciowego (*cholecystitis chronica*, CCC)**

Kamicy pęcherzyka żółciowego najczęściej towarzyszy przewlekłe zapalenie narządu (95% przypadków), które prowadzi do pogrubienia ściany z przerostem

mięśniówki, stłuszczeniem narządu i inkrustacją kamieniami [184, 199, 250]. Nasilony proces zapalny połączony ze zwiększoną ilością tkanki tłuszczowej w pż powoduje w efekcie nieprawidłową budowę ściany narządu i obniżoną jego kurczliwość. Należy podkreślić, że w pęcherzyku takim może rozwijać się rak [78, 121, 184, 244].

Zmiany mikroskopowe w przewlekłym kamiczym *cholecystitis* obejmują różnego stopnia nacieki zapalne i różnie zaawansowane włóknienie ściany [13]. Opisywano prawidłowy, atroficzny, przerośnięty lub ze zmianami meta- i/lub dysplastycznymi nabłonek pż. Może dojść do gruczołowej i mięśniowej hyperplazji (ang. *adenomatous hyperplasia*) i obecności licznych zachyłków Rokitansky'ego-Aschoffa [13].

Istnieje wiele odmian morfologicznych CCC. Cholesteroloza występuje w 20% przypadków i cechuje się występowaniem makrofagów obładowanych estrami cholesterolu (tzw. komórki piankowate, ang. *foamy cells*) [58]. Zmiany te przyjmują nieraz postać tzw. polipów cholesterolowych błony śluzowej pż [236]. Odmianą przewlekłego cholecystitis jest również tzw. *xantogranulomatous cholecystitis* z nadmierną akumulacją piankowatych makrofagów oraz wplecionych pomiędzy nimi komórek limfoidalnych (głównie limfocytów T) [70, 105, 164, 170]. W powstawaniu tych zmian prawdopodobnie uczestniczą antygeny bakteryjne, zwłaszcza *Escherichia coli* [164, 209].

Rola makrofagów w patogenezie kamiczego cholecystitis jest jedynie częściowo opisana. Do wykrywania i szacowania liczby tych komórek stosowano różne techniki badawcze [8, 105, 132]. Obecność markerów makrofagów tkankowych, a zwłaszcza  $\alpha$ -1-antytrypsyny i  $\alpha$ -1-antychymotrypsyny obserwowano zarówno w prawidłowej, jak zapalnie zmienionej błonie śluzowej pż [8]. Niektórzy z badaczy wykazali znacząco więcej komórek tucznych i makrofagów w kamiczych pęcherzykach żółciowych z minimalnymi zmianami zapalnymi (uznanymi za „prawidłowe”) w porównaniu z pęcherzykami z cechami zapalenia przewlekłego [105].

W błonie śluzowej kamiczego pęcherzyka żółciowego obecne są również nacieki z komórek tucznych [105]. Tkankowe komórki tuczne (mastocyty, ang. *mast cells*) odgrywają rolę w reakcjach alergicznych, angiogenezie, odporności

nieswoistej i początkowych etapach swoistej odpowiedzi immunologicznej organizmu [137, 162]. Zasadniczy ich podział u człowieka wynika z obecności obojętnych proteaz serynowych (tryptaza i chymaza). Tryptaza wydaje się uczestniczyć w funkcjach prozapalnych mastocytów, natomiast chymaza jest bardziej zaangażowana w reakcje immunologiczne [263]. Badania wykazały, że aktywacja mastocytów prowadzi do produkcji chemokin i cytokin [27, 162]. Wykazano, że komórki tryptazododatnie, a chymazo-ujemne w błonie śluzowej oskrzeli są źródłem interleukiny (IL)-5 i IL-6, a IL-4 była obecna w obu rodzajach tych komórek [26, 27]. Wykazano również wzrost liczby mastocytów produkujących TNF- $\alpha$  w biopsjach oskrzeli pacjentów z astmą [26]. TNF- $\alpha$  na poziomie mRNA i białka ulegał konstytutywnej ekspresji w ludzkich jelitowych MC [23].

Podjęto próby opisanie udziału komórek tucznych zarówno w fizjologii, jak i w wielu chorobach zapalnych i niezapalnych przewodu pokarmowego człowieka [92, 96, 137], w tym w chorobach pęcherzyka żółciowego [8, 71, 88, 132]. Większą liczbę mastocytów w porównaniu z kontrolą obserwowano w zaostrzeniach stanu przewlekłego i w pierwotnym stwardniającym zapaleniu dróg żółciowych [88] oraz w błonie śluzowej jelita grubego u pacjenta z chorobą Hirschsprunga [96]. Większą liczbę komórek tucznych w blaszce właściwej błony śluzowej (*lamina propria*) uwidoczono w objawowej kamicy z porównaniu z pacjentami z dyskinezą żółciową [71]. Przytaczane korelacje pomiędzy liczbą komórek tucznych a nasileniem zmian zapalnych i/lub zaawansowaniem włóknienia w drogach żółciowych nie są jednoznaczne [71, 88, 92]. W patogenezie chorób pęcherzyka żółciowego bierze się pod uwagę różne mechanizmy patofizjologiczne z udziałem mastocytów, takie jak: degranulacja komórek tucznych, uwalnianie śluzu *via* histamina i receptory H<sub>2</sub>, oraz produkcja prostaglandyn [105]. Komórki tuczne zawierają liczne czynniki chemotaktyczne, które mogą być odpowiedzialne za akumulację licznych eozynofików w naciekach zapalnych obserwowanych w przewlekłym *cholecystitis* [69] i eozynofilowym *gastroenterocolitis* [125].

Do morfologicznych wariantów przewlekłego zapalenia pęcherzyka zaliczamy także *follicular cholecystitis* z licznymi grudkami chłonnymi we wszystkich warstwach ściany pęcherzyka oraz *diffuse lymphoplasmacytic cholecystitis* [60].

Natomiast tzw. eozynofilowe *cholecystitis* częściej pojawia się w bezkamiczych zapaleniach pęcherzyka [44]. Opisane zostało po raz pierwszy w 1949r. i choć częściej dotyczy bezkamiczych zapaleń pż, opisano przypadki przewlekłego zapalenia eozynofilowego pż także u pacjentów z kamicą żółciową [223]. Zapalenie eozynofilowe cechuje się obecnością bardzo licznych eozynofiliów ( $\geq 90\%$ ) w naciekach zapalnych w ścianie narządu [44, 69, 262]. Niektórzy autorzy uznają ten typ zapalenia za wyjątkowo rzadki [208], inni wskazują na rosnącą liczbę wykrywalności przewlekłego zapalenia pż z naciekami zbudowanych z eozynofiliów w połączeniu z innymi komórkami (neutrofile, limfocyty) [44]. Obfite nacieki z eozynofiliów wykazano częściej u młodszych pacjentów (do 25 rż.) w porównaniu ze starszymi (ok. 50 lat) z kamicą żółciową i przewlekłym *cholecystitis* [118].

Inne opisywane postacie histologiczne przewlekłego zapalenia pż to *cholecystitis granuloma* [90] i *ceroid granuloma* [5] z obecnością w ścianie rozszianych lub ogniskowych złogów obojętnego tłuszczu i barwnika lipofuscyny (ceroid). W tych ostatnich zmianach w ścianie pęcherzyka wykazywano także antygeny *E. coli*, sugerując etiologię infekcyjną zmian [164]. Przewlekłe zapalenie pż niekiedy powiązane jest z rozszianym zwapnieniem ściany narządu (pęcherzyk „porcelanowy”) [121, 224].

## 2. Cytokiny – wiadomości ogólne

Cytokiny są cząsteczkami białkowymi wpływającymi na wzrost, proliferację i aktywację komórek biorących udział w odpowiedzi immunologicznej oraz komórek hemopoetycznych [82, 115]. Działają w stężeniach piko- i femtomolowych. Uczestniczą w generowaniu, koordynacji i zakończeniu odpowiedzi immunologicznej i zapalnej organizmu [1, 100]. Mogą wybiórczo pobudzać odpowiedź komórkową lub humoralną, co w połączeniu z ich liczbą (ponad 100 opisanych cytokin i wciąż odkrywane nowe) powoduje, że powstaje niezwykle skuteczny, ale także bardzo skomplikowany i czuły system powiązań pomiędzy komórkami układu odpornościowego, tzw. sieć cytokin. Sytuację dodatkowo komplikuje fakt, że cytokiny wpływają nie tylko na leukocyty, ale także na inne komórki organizmu, stymulując powstawanie gorączki, regulując morfogenezę komórek i tkanek, czy też biorąc udział w procesach patologicznych działając cytotoksycznie. Dodatkowo należy wziąć pod uwagę oddziaływanie pomiędzy cytokinami. Fakty te nakazują spojrzeć na cytokiny nie tylko jako na białka działające lokalnie, ale także jako na grupę cząsteczek o kluczowym znaczeniu dla funkcjonowania organizmu [1, 47, 49, 50].

Cechą wspólną wszystkich cytokin jest to, że są wydzielane przez leukocyty [1, 49, 50]. Ze względu na komórki produkujące cytokinę, zaszeregowane zostały do limfokin (produkowane przez limfocyty) oraz monokin (produkowane przez monocyty i makrofagi). Ten podział jest obecnie mało używany, ponieważ limfokiny mogą być wydzielane także przez monocyty i makrofagi, zaś monokiny - przez limfocyty. Nie uwzględnia on także pokrewieństw budowy pomiędzy białkami. Bardziej precyzyjne są więc podziały oparte na funkcjach danej grupy cytokin, które związane są często z istnieniem także znacznych podobieństw strukturalnych [207].

Niektóre cytokiny często są określane jako interleukiny (IL), co ma odzwierciedlać ich działanie pomiędzy różnymi populacjami leukocytów („*between leukocytes*”) [49]. Jak wspomniano nazwa ta jest nieco przestarzała, gdyż wiele interleukin może być wydzielane przez inne typy komórek (np. keratynocyty, fibroblasty) i mogą działać nie tylko na leukocyty, ale na każdy inny typ komórek. Najważniejsze interleukiny to: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4,

IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 i IL-18. Pozostałe interleukiny (znanych jest już ponad 25) pełnią mniej istotne funkcje lub ich działanie wydaje się być problematyczne [73].

Ze względu na podobieństwa w budowie wyróżnia się następujące grupy cytokin: cytokiny typu I (hematopoetyny), cytokiny typu II (interferony oraz rodzina IL-10), chemokiny i nadrodzinę czynnika martwicy nowotworu (ang. *Tumor Necrosis Factor*, TNF) [82].

Cytokiny mogą działać na te same komórki, które je wydzielają (działanie autokrynowe), na komórki znajdujące się w najbliższym sąsiedztwie (działanie parakrynowe) lub na komórki znajdujące się w innych narządach (działanie endokrynowe) [195, 196]. Cechuje je zjawisko plejotropii, czyli zdolność oddziaływania na wiele różnych komórek i wywoływania w nich różnych efektów oraz redundancji, czyli możliwość wywierania takiego samego efektu przez różne cytokiny. Cytokiny tworzą zintegrowaną, zsynchronizowaną sieć komunikacyjną wpływającą na dojrzewanie, aktywację i migrację komórek układu odpornościowego [115]. Działanie poszczególnych cytokin obejmuje efekt synergistyczny, antagonistyczny lub addytywny. W sprzężeniu zwrotnym dodatnim, cytokina wydzielana przez jedną komórkę stymuluje wydzielanie innej cytokiny z drugiej komórki. Z kolei ta druga cytokina stymuluje wydzielanie pierwszej. W sprzężeniu zwrotnym ujemnym, jedna z cytokin powoduje wydzielanie innej cytokiny, która z kolei hamuje wydzielanie pierwszej z nich [82].

Sieć cytokin powstaje w wyniku istnienia szeregu cytokin i odpowiadających na ich działanie komórek (lub tkanek) docelowych [36]. Interakcja między nimi zachodzi poprzez łączenie się danej cytokiny ze specyficznym dla niej błonowym receptorem. Receptory odznaczają się bardzo znaczną czułością, dlatego stężenia cytokin rzędu pikomoli już wywierają efekt w komórkach docelowych, który polega na wpływie poprzez wewnątrzkomórkowe mechanizmy sygnałowe na ekspresję pewnych genów. Receptory dla cytokin (5 typów) składają się z zewnątrzkomórkowych fragmentów zbudowanych są z charakterystycznych domen, które odpowiedzialne są m. in. za swoistość wiązania ligandów i mają wpływ na sposób, w jaki przekazywane będą sygnały

po związaniu cytokiny. Domeny wewnątrzkomórkowe natomiast są bezpośrednio odpowiedzialne za inicjowanie sygnałów w komórce. Część zewnątrzkomórkowa jest połączona z odcinkiem cytoplazmatycznym przez fragmenty transbłonowe receptora.

Działanie sieci cytokin polega również na tym, że dana cytokina może wpływać na wytwarzanie i działanie całego szeregu innych cytokin. Nie każda komórka jest w stanie reagować na daną cytokinę, nie każda także może tę cytokinę produkować. Działanie sieci cytokin jest zatem uzależnione od wielu czynników, będących kombinacją ilości cytokin, receptorów dla cytokin i rodzajów komórek. Nawet drobne zmiany w jednym miejscu sieci cytokinowej mogą wywoływać całkowicie inne reakcje układu odpornościowego [129].

### **2.1. Wybrane cytokiny prozapalne (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) – znaczenie w patogenezie zapalenia pęcherzyka żółciowego (*cholecystitis*)**

Prace na temat roli cytokin w zapaleniu pęcherzyka żółciowego można podzielić na dwie zasadnicze grupy. Jedna dotyczy oceny tkankowej produkcji cytokin jako mediatorów stanu zapalnego. Druga grupa (większa) ocenia surowicze stężenia tych rozpuszczalnych cząsteczek, indukowanych stanem zapalnym i urazem operacyjnym (cholecystektomia) [191, 192, 193, 214, 251]. Opisano komórkowe źródła cytokin prozapalnych oraz przytaczano korelacje między wydzielaniem tych mediatorów a innymi mediatorami stanu zapalnego oraz danymi klinicznymi w *cholecystitis*. Dowiedziono udziału cytokin prozapalnych w progresji zapalenia pęcherzyka żółciowego, w obniżaniu kurczliwości jego mięśniówki i uszkodzaniu właściwości absorpcyjno-sekrecyjnych nabłonka pęcherzyka żółciowego [184].

W modelach zwierzęcych z eksperymentalnie wywoływaną kamicą pęcherzyka żółciowego (dieta litogenna), zapalenie narządu występowało wcześniej i poprzedzało formowanie się kamieni [191, 193].

Z modelu zwierzęcego (szczury) znany jest związek pomiędzy zakażeniem, stanem zapalnym a wzrostem trójglicerydów we krwi po podawaniu cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1), sugerując że zmiany w metabolizmie lipidów mogą odgrywać rolę w odpowiedzi gospodarza na zakażenie i zapalenie [62]. Zakłada

się potencjalny wpływ przewlekłego stanu zapalnego (i stłuszczenia ściany pż) oraz ewentualnej nadekspresji cytokin prozapalnych na mechanizmy kancerogenezy, choć nie zostało to dokładnie rozpracowane [250].

Mało prac dotyczy opisów prób terapii anty-cytokinowej w chorobach pęcherzyka żółciowego, choć wiadomo, że blokowanie działania cytokin prozapalnych znacząco redukuje zachorowalność i śmiertelność związaną ze wstrząsem septycznym i innymi powikłaniami zakażenia i stanu zapalnego [48].

### 2.1.1. Interleukina-1 (IL-1)

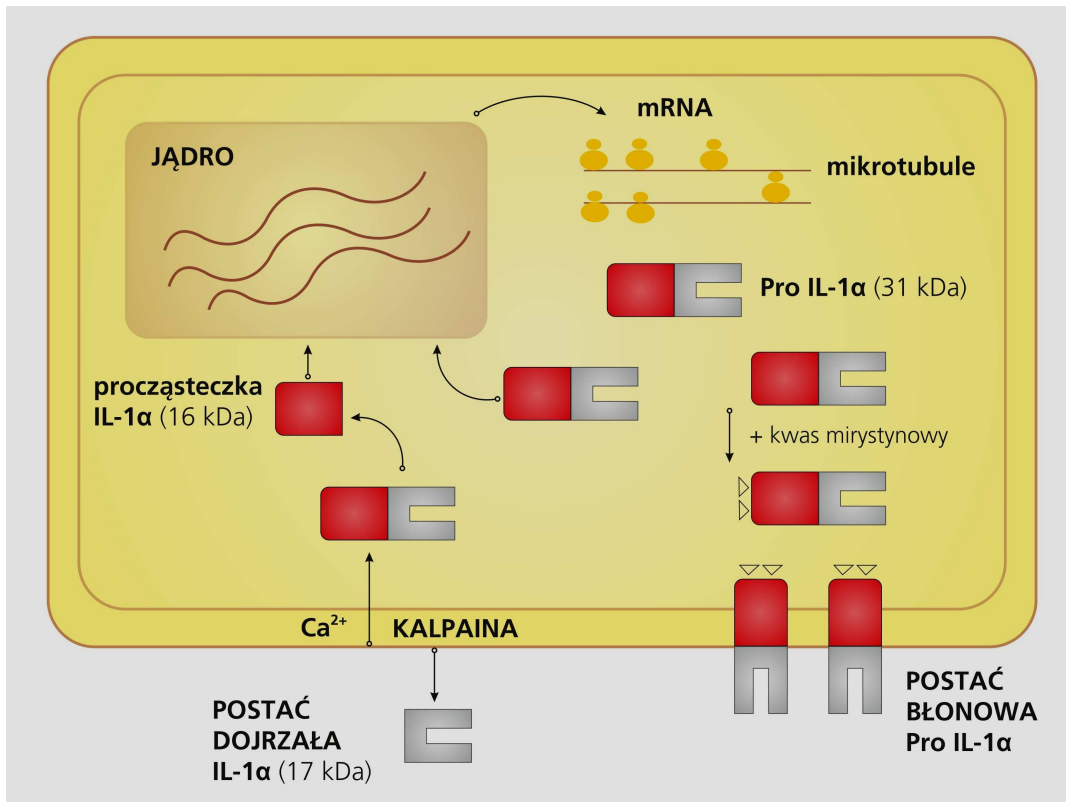
Interleukina 1 została opisana po raz pierwszy w latach 40-tych XX wieku jako ciepłochwienne białko, a odkryta w płynie wysiękowym, który podany ludziom lub zwierzętom powodował gorączkę. Stąd oryginalna nazwa IL-1 to endogenny pirogen [9, 53]. W 1972r. Gery i Waksman oraz Fritz Bach nazwali to białko czynnikiem aktywującym limfocyty (ang. *lymphocyte activating factor*, LAF) [47, 53, 76, 77]. Dopiero później odkryto, że interleukina ta składa się z dwóch różnych białek – interleukiny 1 $\alpha$  i interleukiny 1 $\beta$  [156]. Oba cDNA IL-1 zostały sklonowane w 1984r., IL-1 $\beta$  cDNA z ludzkich monocytów krwi [10], a IL-1 $\alpha$  z linii hodowanych komórek mysich o nazwie P388D [147]. Kolejne badania uzupełniały szczegóły genomowej organizacji IL-1 [przeгляд tematu: 47].

Aktualnie wiemy, że IL-1 i związany z nią system genów jest układem zaangażowanym zarówno w obronę organizmu przed infekcją, a także pełni funkcję regulatora różnicowania i proliferacji komórek. Do układu genów IL-1 należą: interleukina 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), interleukina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), receptor I (IL-1R), receptor II (IL-1RII), antagonist receptorowy (IL-1RA) i konwertaza (ang. *ICE-interleukin-1 converting enzyme*) (zwana także kaspazą 1) [204].

W genomie człowieka znajdują się dwa różne geny kodujące interleukinę: IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , wywodzące się od wspólnego genu (proIL-1), które powstały prawdopodobnie w wyniku duplikacji [49, 57]. Geny IL-1 sklonowano w 1985r. i zmapowano na chromosomie 2 (2q14;2q21) [261]. Ludzki gen *IL-1 $\beta$*  zawiera 7,8 kpz, a ludzki gen *IL-1 $\alpha$*  – 10,5 kpz [38, 72]. Każdy z genów zawiera 7 eksonów kodujących mRNA tej interleukiny. Gen *IL-1 $\alpha$*  nie ma motywu TATA typowego dla genów indukowanych, natomiast zawiera dwa promotory, bliższy - 200 pz i dalszy -4,2 kpz. Gen IL-1 $\alpha$  w odróżnieniu od IL-1 $\beta$  ma motyw TATA,



a regiony regulatorowe tego genu znajdują znacznie powyżej miejsca inicjacji transkrypcji. Białka kodowane przez obydwie geny są syntetyzowane jako białka prekursorowe o masie 31 kDa, które w wyniku działania proteaz stają się postaciami dojrzałymi o masie 17 kDa [49]. IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$  mają tylko 25% homologii w sekwencji aminokwasów, jednakże ich struktura przestrzenna wykazuje znaczne podobieństwo, a dotyczy to w szczególności aminokwasów odpowiedzialnych za tworzenie struktur wiążących receptor [49]. Enzymy odpowiedzialne za aktywację IL-1 $\alpha$  i  $\beta$  to odpowiednio kalpaina i ICE (Rycina 1).



**Rycina 1.** Etapy wydzielania IL-1 $\alpha$  z komórki. Część cząsteczki ProIL-1 $\alpha$  w cytoplazmie (po dołączeniu kwasu mirystynowego) ulega translokacji do błony komórkowej, tworząc formę błonową. Może być także przekształcana w formę dojrzałą przy udziale kalpajny (proteaza cysteinowa) i jonów Ca<sup>2+</sup> i uwalniana do przestrzeni pozakomórkowej. Wewnątrzkomórkowa ProIL-1 $\alpha$  lub procząsteczka o m. cząst. 16kDa mogą się wiązać z DNA jądra komórkowego. Rycina według C.A. Dinarello (1996) [49], zmodyfikowana.

W przeciwieństwie do IL-1 $\alpha$ , druga postać IL-1 musi zostać zaktywowana w wyniku enzymatycznego działania proteazy (ICE) na pierwotny produkt translacji. Oba białka mają miejsca glikolizacji, co nie ma wpływu na aktywność IL-1, ale pełni rolę przy wiązaniu się błonowej IL-1 na makrofagach [49, 82]. Po stymulacji ludzkich monocytów przez LPS, 90% wytwarzanej IL-1 to postać  $\beta$ . Jest ona główną postacią wydzielaną na zewnątrz komórki prawdopodobnie za pomocą kompleksu kaspazy 1 i proces ten jest ściśle związany z cięciem proteolitycznym proIL-1 $\beta$  [49].

Większość syntetyzowanej IL-1 $\alpha$  pozostaje w cytoplazmie, a niewielka część wędruje na powierzchnię komórki, gdzie przekształca się w postać błonową [28]. Wewnątrzkomórkowy czas półtrwania wynosi dla IL-1 $\alpha$  15 godzin, a dla IL-1 $\beta$  2,5 godziny. Należy dodać, że IL-1 $\beta$  jest wydzielana w sposób ciągły począwszy od 2 godziny syntezy, a wydzielanie IL-1 $\alpha$  jest opóźnione o około 10 godzin [56]. Modyfikacja potranslacyjna IL-1 $\alpha$  poprzez dodanie reszty kwasu mirystynowego do reszty lizynowej (ok. 10-15% IL-1), ułatwia transport białka na powierzchnię komórki [229, 230, 231]. Ta błonowa postać IL-1 $\alpha$  jest biologicznie aktywna i występuje przede wszystkim na powierzchni monocytów i limfocytów B po stymulacji *in vitro* [49]. Pozostała pula IL-1 pozostaje w cytoplazmie, jest nieoznaczalna w surowicy i w innych płynach ustrojowych, z wyjątkiem ostrych stanów chorobowych, podczas których występuje masowa śmierć komórek [259]. Nadekspresja odcinanego N-końca interleukiny 1 (o masie cząst. 16 kDa) zawierającego sekwencję liderową kierującą białko do jądra komórki powoduje transformację nowotworową komórek [231], a obniżenie jego ekspresji w komórkach linii FK 506 hamowało powstawanie nowotworów indukowanych antraliną [266]. Potencjalna rola błonowej i/lub cytoplazmatycznej lokalizacji IL-1 jest omawiana w piśmiennictwie [47, 48, 49]. I tak, lokalizacja wewnątrzkomórkowa wiązana jest najczęściej z regulacją prawidłowego różnicowania komórkowego, szczególnie w komórkach nabłonkowych i ektodermalnych. Dotyczy to zwłaszcza keratynocytów zdrowej ludzkiej skóry, gdzie duże ilości konstytutywnie produkowanej IL-1 zostały udokumentowane [91]. Cytokina ta miałaby właśnie wpływać na końcowe różnicowanie się tych komórek.

Jedynie ok. 5% całkowitej proIL-1 $\alpha$  ma błonową lokalizację (postać glikozylowana i/lub z dołączonym kwasem mirystynowym) i choć udowodniono, że jest to postać aktywna, rola tej formy nadal jest mało znana [49]. Postać błonowa IL-1 $\alpha$  ma oddziaływać głównie na komórki znajdujące się w najbliższym sąsiedztwie [135]. Istnieje również koncepcja, że IL-1 $\alpha$  może działać jako autokrynowy czynnik wzrostu, co wynikać miałyby z cytoplazmatycznej lokalizacji proIL-1 $\alpha$ , wywierania bezpośredniego efektu poprzez wiązanie się do struktur jądra komórkowego, tworzenie kompleksów z IL-1RI i po internalizacji tychże, wspólnej translokacji do jądra komórkowego (podobnie do receptorów steroidowych) [49].

Na modelach zwierzęcych i w badaniach u ludzi wykazano, że IL-1 $\beta$  i IL-18 (ściśle powiązane strukturalnie i czynnościowo) uczestniczą w fundamentalnych procesach zapalnych, których nasilenie zwiększa się również z wiekiem pacjenta [52]. Zależność zwiększonej produkcji IL-1 (obu form), jak również TNF- $\alpha$  i IL-6 wraz z wiekiem pacjenta opisywano już w latach 90-tych XX wieku [49, 144].

Genowa ekspresja IL-1 w tkankach zdrowych osobników dotyczy głównie narządów dokrewnych (podwzgórze, przysadka mózgowa, nadnercza, nerwy obwodowe, naskórek) [49, 82]. Badania na ten temat nie zawsze były oparte o kompleksowe techniki biologii molekularnej (immunocytochemia i hybrydocytochemia), stąd nie zawsze obecność białka potwierdzono obecnością jego mRNA.

Zrozumiałe jest zainteresowanie ekspresją IL-1 w warunkach patologicznych. Dramatyczny wzrost produkcji tej cytokiny przez różne typy komórek obserwowano w odpowiedzi na różne infekcje i/lub toksyny bakteryjne [49, 82, 113]. IL-1 nie jest więc tylko „inter-leukiną”, ale cytokiną, której właściwości biologiczne dodatkowo nakładają się z właściwościami innych cytokin (np. TNF, IL-6) [49, 82].

Jak wspomniano IL-1 jest jednym z głównych regulatorów odpowiedzi immunologicznej i zapalnej, oddziałując na prawie wszystkie typy komórek [56, 189]. Produkowana jest głównie przez monocyty i tkankowe makrofagi. Ponadto jej produkcję wykazano w granulocytach obojętnochłonnych krwi,

mikrogleju centralnego układu nerwowego, astrocytach, komórkach *endothelium*, komórkach mięśniowych gładkich, fibroblastach, komórkach pokrywających ścięgna, komórkach dendrytycznych skóry, keratynocytach, komórkach nabłonka (dziąsło, szyjka macicy), mezangium kłębuszka nerkowego, limfocytach T i B [2, 47, 172]. Do komórek produkujących IL-1 należą także komórki nabłonka jelitowego i hepatocyty [47, 117].

Wśród właściwości immunologicznych IL-1 bardzo ważna jest indukcja wytwarzania IL-2 i jej receptora. IL-1 pobudza również produkcję IFN- $\gamma$  przez limfocyty T i IL-6 przez makrofagi, komórki śródbłonka i fibroblasty [82]. Wpływa także na proliferację oraz różnicowanie limfocytów B. Indukuje wzmożone wydzielanie neutrofilów i monocytów, pobudzając głównie uwalnianie czynników stymulujących kolonizację: G-CSF, GM-CSF i M-CSF [49, 82]. Cytokina ta wzmacnia również uwalnianie histaminy przez bazofile, degranulację eozynofiliów i wytwarzanie prostaglandyn pobudzając syntezę fosfolipazy A2 (uwalniającej kwas arachidonowy z fosfolipidów błon komórkowych). Oddziałując na śródbłonek, wzmacnia jego przepuszczalność, indukuje aktywność prokoagulacyjną, między innymi przez zwiększenie syntezy inhibitora aktywatora plazminogenu, stymuluje wytwarzanie czynnika aktywującego płytki (PAF), a także wzmacnia przyleganie limfocytów i neutrofilów do komórek śródbłonka [49]. Działając na makrofagi może wzmacniać autokrynową swoją produkcję [82].

Ciekawe są wyniki badań pozwalające zrozumieć wpływ układu immunologicznego na produkcję śluzu przez zmieniony zapalnie nabłonek przewodu pokarmowego [40]. Pokazują one, że produkowana przez stymulowane makrofagi IL-1 oraz rekombinowana ludzka IL-1 $\beta$ , powoduje zwiększone uwalnianie śluzu z komórek kubkowych nabłonka jelitowego u myszy [40].

Na modelu szczurzym dowiedziono także wpływu IL-1 na metabolizm lipidów. Podobnie jak TNF- $\alpha$ , IL-1 w dawkach wywołujących gorączkę, anoreksję, czy wzrost sekrecji ACTH, powodowała przejściowy (17 godzinny) wzrost trójglicerydów we krwi [62]. W przeciwieństwie do TNF- $\alpha$  (*via* wzrost wątrobowej syntezy lipidów), interleukina-1 wywoływała ten efekt poprzez zwiększenie lipolizy [62].

IL-1 wpływa na ośrodkowy układ nerwowy, co przejawia się podwyższoną temperaturą ciała. Efekt ten wyływa z pirogenego działania cytokiny, obok TNF, IL-6 i interferonów [39, 51, 53]. Wpływa też na procesy snu [49].

Przyjmuje się, że IL-1 jest syntetyzowana *de novo* w komórce pod wpływem indukcji określonymi czynnikami biologicznymi [56]. Do czynników indukujących wydzielanie IL-1 należą przede wszystkim lipopolisacharydy bakterii Gram-ujemnych [7, 172], inne produkty mikroorganizmów aktywujące receptory PRRs (ang. *pattern recognition receptors*), inne cytokiny (IL-2, interferony, TNF) oraz fragmenty dopełniacza C5a [50, 56]. Bakterie Gram-dodatnie, a szczególnie gronkowce i paciorkowce, wytwarzające polipeptydowe egzotoksyny, również stymulują produkcję IL-1 i TNF. Induktorami produkcji IL-1 są również wirusy oraz syntetyczne adjuwanty ze ścian bakterii. Na produkcję IL-1 wpływają także naturalnie występujące w organizmie substancje, takie jak: składniki dopełniacza, trombina, sole żółciowe, metabolity androgenów i same cytokiny, które mogą inicjować transkrypcję i translację IL-1 [47, 50, 51].

Tkankowa produkcja IL-1 ma znaczenie w procesach patologicznych, takich jak włóknienie, destrukcja macierzy pozakomórkowej oraz napływ komórek układu odpornościowego do miejsc zapalenia [47, 50, 51].

Wzrost surowiczych stężeń IL-1 (głównie IL-1 $\beta$ ) opisywano w różnych schorzeniach u człowieka, m.in. w zakażeniach: wirusowych (np. HIV-1), bakteryjnych, grzybiczych, pasożytniczych, w guzach litych i białaczkach, w chorobie Alzheimera, chorobach autoimmunologicznych, urazach wielonarządowych, u pacjentów hemodializowanych, w chorobie niedokrwiennej serca, zapaleniach wątroby o różnej etiologii, w astmie, po naświetlaniu UV, zapaleniu trzustki, zapaleniu przyzębia, odrzuceniu przeszczepów, po zastosowaniu wysokich dawek w terapii IL-2. Należy dodać, że wzrost surowiczych stężeń IL-1 $\beta$  w rozległych oparzeniach, czy wstrząsie, jest jednak niższy niż wzrost innych cytokin prozapalnych (IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$ ) [przeгляд tematu: 49].

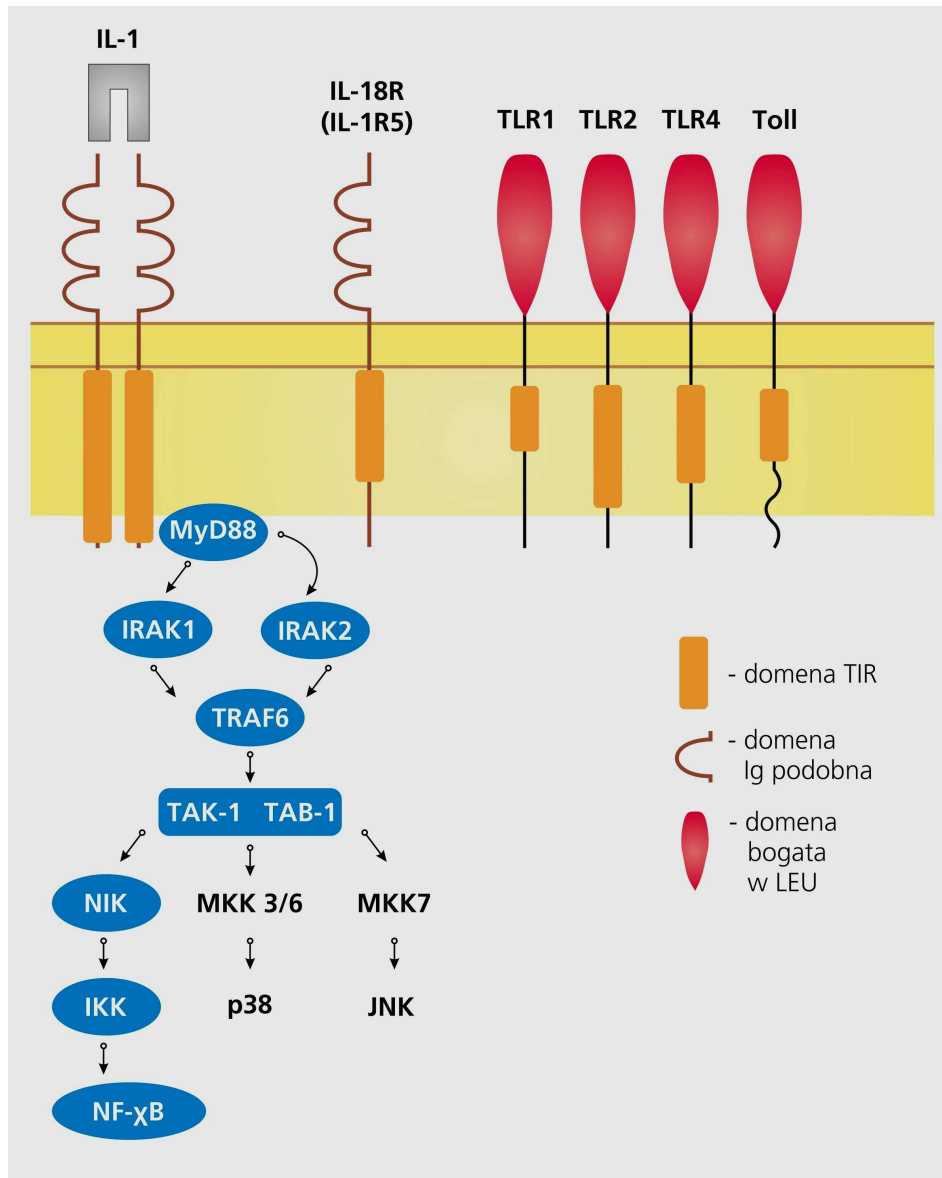
Wykrywanie IL-1 $\alpha$  w surowicy krwi jest rzadkie ze względu na przeważającą lokalizację cytoplazmatyczną. Udaje się to jedynie w wyjątkowych warunkach *in vitro* i *in vivo* i prawdopodobnie jest skutkiem śmierci komórek [49, 82].

Krótką charakterystykę molekularną IL-1 $\alpha$  przedstawiono w **Tabeli 1**.

#### **2.1.1.2. Receptory rodziny IL-1**

Aktualnie znamy około 10 receptorów dla rodziny IL-1. Receptory dzielimy na dwie ogólne grupy: pierwsza obejmuje receptory, które zawierają domeny immunoglobulinowe na zewnątrz komórki, a druga zawiera receptory z grupy Toll, które w zewnątrzkomórkowej domenie zawierają powtórzenia bogate w leucynę, odpowiedzialne głównie za odpowiedź na metabolity mikroorganizmów [82].

Wspólną cechą wszystkich receptorów IL-1, a także receptorów TLR u ssaków, jest obecność cytoplazmatycznej domeny zwanej TIR (ang. *Toll-IL-1-receptor domain*, Toll-IL-1R). Zidentyfikowano również białko cytozolowe mające domenę TIR-MyD88 (ang. *myeloid differentiaton antygen 88*) oraz tzw. domenę śmierci. Pełni ono funkcję adaptorową w kaskadzie przekazującej sygnał z receptora IL-1 [31] (**Rycina 2**).



**Rycina 2.** Drogi sygnałowe aktywowane przez receptory IL-1. Cytoplazmatyczne odcinki receptorów rodziny IL-1 posiadają domeny TIR (ang. *Toll IL-1 receptor*). W bardzo krótkim czasie indukowana jest ekspresja kilkuset genów. Rycina według J. Gołąb i M. Jakóbiś (2008) [82], zmodyfikowana.

Najlepiej poznane są dwa typy receptora IL-1: typ I receptora IL-1 (IL-1R1), który przewodzi sygnały oraz typ II (IL-1R2), który wiąże IL-1, ale nie przekazuje sygnału wewnątrz komórki [9]. Geny dla obu receptorów leżą na długim ramieniu chromosomu 2 [189].

IL-1R1 ma większe powinowactwo do IL-1 $\alpha$ , a IL-1R2 ma większe powinowactwo do IL-1 $\beta$ . IL-1R1 znajduje się na większości komórek odpowiadających na IL-1, natomiast IL-1R2 występuje głównie na neutrofilach, monocytach i limfocytach B [82]. Po związaniu IL-1 z IL-1R1, tworzy się kompleks białkowy o wysokiej sile wiązania przy udziale dodatkowego białka (IL-1R-AcP) [53]. Heterodimeryzacja cytozolowej domeny IL-1R1 i IL-1R-AcP prawdopodobnie odpowiada za inicjację transdukcji sygnału [49]. W ciągu kilku minut od związania ligandu aktywowane są liczne wewnątrzkomórkowe białka, które indukują ekspresję kilkuset genów, w tym genów innych cytokin, m.in. TNF, IL-2, IL-3, IL-6. Aktywowana jest ekspresja samej IL-1 i jej receptora [49].

Zewnątrzkomórkowe („rozpuszczalne”) fragmenty IL-1R1 (IL-1sR1) i IL-1R2 (IL-1sR2) krążą we krwi w warunkach zdrowia i choroby, działając jak naturalne bufory wiążące IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  lub IL-1Ra (antagonista receptora IL-1) [49]. IL-1R2 jak wspomniano nie przewodzi sygnału i wydaje się być tak zwanym receptorem „wabikiem” dla interleukiny 1, co jest unikalne w biologii cytokin [9, 82].

Ciekawostką związaną z IL-1 i jej receptorami jest występowanie rozpuszczalnego antagonisty receptora IL-1 (sIL-1Ra), produkowanego przez aktywowane (np. LPS) monocyty krwi obwodowej [8, 57]. IL-1Ra jest strukturalnie podobny do IL-1 $\alpha$  i  $\beta$  (26% homologii) i wiąże się z IL-1R blokując receptory IL-1R1 i IL-1R2 [49, 57]. Istnieją próby wykorzystania go, podobnie jak rozpuszczalnego receptora dla IL-1, do hamowania reakcji zapalnych w niektórych chorobach [82]. IL-1Ra, podobnie jak rozpuszczalne receptory dla IL-1, próbuje się podawać pacjentom z reumatoidalnym zapaleniem stawów, colitis ulcerosa, w niektórych zapalnych chorobach przyzębia, w hamowaniu reakcji przeszczep przeciwko gospodarzowi, a także we wstrząsie septycznym [49, 82].



### 2.1.1.3. Interleukina-1 a kamica żółciowa

IL-1 $\alpha$  jako wewnątrzkomórkowa cytokina posiada właściwości zarówno typowej cząsteczki o działaniu prozapalnym, jak i czynnika transkrypcyjnego [51, 52]. Na modelu zwierzęcym (świnka morska) wykazano, że zapalenie pęcherzyka żółciowego jest stymulowane bezpośrednio IL-1 $\alpha$ , jak i *via* LPS, który uwalnia IL-1 $\alpha$  [187]. Eksperymentalnie zademonstrowano znaczący wzrost aktywności mieloperoksydazy (MPO) i ilości IL-1 (markery stanu zapalnego) w ścianie pęcherzyka żółciowego u myszy podczas podawania diety (bogatej w cholesterol i kwas cholowy) indukującej formowanie się kamieni cholesterolowych. W czasie 6-tygodniowego okresu obserwowano również stopniowy wzrost grubości błony śluzowej pęcherzyka żółciowego. Ilość IL-1 wzrosła w tym czasie siedmiokrotnie, a MPO 2-3-krotnie [193]. W innym modelu *in vivo* wykazano, iż zarówno IL-1 $\alpha$ , jak i TNF- $\alpha$  wpływają destrukcyjnie na właściwości absorpcyjne i wydzielnicze nabłonka pęcherzyka żółciowego, co sprzyja powstawaniu kamieni żółciowych [191]. W pęcherzyku żółciowym psa po zastosowaniu diety litogennej obserwowano wzrost grubości błony śluzowej pż. Towarzyszył temu również wzrost aktywności mieloperoksydazy i ilości IL-1 $\alpha$ . Podanie żółci od psów z kamieniami barwnikowymi zdrowym świnkom morskim, powodowało nasilenie stanu zapalnego a osłabiało funkcje absorpcyjne komórek nabłonka pęcherzyka żółciowego u tych drugich zwierząt [192]. Na mysim modelu *cholelithiasis* pokazano, że otyłość połączona ze spożywaniem dużej ilości oczyszczonych węglowodanów powoduje stłuszczenie ściany pęcherzyka i zwiększa lokalną ekspresję IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  [160]. Dowiedziono związku uwalniania tych cytokin z osłabieniem funkcji mięśni gładkich pż i właściwości absorbcyjnych nabłonka pęcherzyka żółciowego [184].

Na modelu hodowanych komórek nabłonka pęcherzyka żółciowego chomików wykazano ponadto, że podawanie cytokin prozapalnych (w tym IL-1 $\beta$ ), indukuje syntazę tlenku azotu, która zwiększa produkcję tlenku azotu (ang. *nitric oxide*, NO) i indukuje uszkodzenia DNA prawidłowych komórek nabłonka pęcherzyka żółciowego. Genotoksyczne właściwości NO indukowane cytokinami prozapalnymi mogą być włączone w proces kancerogenezy w odpowiedzi na przewlekłe zapalenie dróg żółciowych [124].

W surowicy krwi pacjentów z kamicą żółciową (zaliczonej w tym opracowaniu do nawracających przewlekłych schorzeń przewodu pokarmowego) obserwowano zróżnicowany w zależności od fazy zapalenia, wzrost stężenia różnych cytokin prozapalnych [251, 252]. Największy wzrost cytokin, w tym IL-1 $\beta$  obserwowano w zaostrzeniu objawów kamicy pż [251].

Biorąc pod uwagę zachowanie się surowicznych stężeń IL-1 $\beta$  [8, 18] oraz IL-1 $\alpha$  [116] związanych z samym zabiegiem operacyjnym (model systemowej odpowiedzi zapalnej), wykazywano wyższe stężenie obu form cytokin po “otwartej” cholecystektomii w porównaniu z zabiegiem laparoskopowym [116, 138]. Nie wszyscy autorzy obserwowali znaczące różnice w surowicznych stężeniach IL-1 $\beta$  pomiędzy pacjentami operowanymi laparoskopowo i klasycznie [18]. Jednak i ci badacze obserwowali znaczący wzrost stężeń w porównaniu z czasem przed operacją oraz normalizację stężeń tej cytokiny po 7 dniach od zabiegu [18].

Badano również stężenia surowicze antagonisty receptora IL-1 (IL-1Ra) u pacjentów operowanych z zastosowaniem laparoskopowej oraz tzw. “minilaparotomicznej” cholecystektomii, bez uzyskania znaczących różnic w obu grupach pacjentów [29].

### **2.1.2. Interleukina 6 (IL-6)**

W latach osiemdziesiątych XX wieku odkryto obecność czynnika wpływającego na różnicowanie limfocytów B w komórki wydzielające immunoglobuliny i nazwano go czynnikiem 2 stymulującym komórki B (BSF2) [167]. W 1986r. sklonowano jego cDNA [98]. Równocześnie zidentyfikowano białka, które wykazywały różne właściwości biologiczne, np. czynnik wzrostu komórek *hybrydoma* i *plazmocytoma*, czynnik 2 indukujący różnicowanie prekursorów mieloidalnych w makrofagi i granulocyty [122, 168, 218]. Okazało się, że wszystkie te białka są identyczne i nadano im wspólną nazwę – interleukina 6 [123].

IL-6 jest glikolizowanym polipeptydem zbudowanym ze 184 aminokwasów o masie cząst. 21-28 kDa, zbudowanym z 4 długich helis  $\alpha$  połączonych pętlami [98]. Gen kodujący IL-6 znajduje się na chromosomie 7 (7p15-p21) i zawiera 5

egzonów [109]. W promotorze genu są sekwencje wiążące takie czynniki transkrypcyjne jak: NF- $\kappa$ B, AP-1, C/EBP i CREB. Regulują one transkrypcję genu IL-6 w sposób zależny od typu komórki i czynnika aktywującego, przy czym CREB jest represorem, a pozostałe czynniki aktywatorami transkrypcji [3, 179, 186, 254].

IL-6 jest wytwarzana przede wszystkim przez monocyty i makrofagi, ale także przez: fibroblasty, komórki śródbłonka, limfocyty T i B, keratynocyty i chondrocyty [122, 272]. Głównym czynnikiem indukującym jej wytwarzanie jest IL-1, a także interferony, TNF, LPS oraz wirusy DNA i RNA [91, 93, 122]. Cytokina ta działa na komórki docelowe za pośrednictwem receptora klasy I, będącego typem receptorów dla hematopoetyn, należącym do podklasy gp130, obecnego na komórkach zarówno szeregu limfoidalnego, jak i nielimfoidalnego [122].

Działanie biologiczne IL-6 jest wielokierunkowe, co można zauważyć choćby na podstawie historycznych nazw tej cytokiny i trudno przytoczyć precyzyjnie wszystkie funkcje tej cytokiny. W aspekcie interesującego mnie w obecnej pracy wpływu IL-6 na układ immunologiczny, można ogólnie podać za najważniejszymi badaczami, że IL-6 wywołuje antygenowo-specyficzne efekty i bierze udział w reakcjach zapalnych [123]. Wpływa przede wszystkim na limfocyty B jako czynnik stymulujący ich końcowe różnicowanie się do komórek produkujących immunoglobuliny różnych klas [166]. Wykazano jej wpływ również na limfocyty T poprzez pobudzenie do produkcji interleukiny 2 i jej receptora. Wraz z IL-1 aktywuje także limfocyty T rozpoznające antygeny oraz stymuluje powstawanie i różnicowanie limfocytów cytotoksycznych Tc w obecności IL-2. Może indukować zarówno limfocyty T aktywowane jak i spoczynkowe [173, 240, 241]. Wykazano stymulujący wpływ tej cytokiny na aktywację limfocytów T. IL-6 indukuje śródbłonkową ekspresję molekuł adhezyjnych oraz produkcję przez komórki *endothelium* białka MCP-1 (ang. *monocyte chemoattractant protein-1*), chemokiny odpowiedzialnej za rekrutację monocytów [198]. Wykazano, że myszy z nokautem genu *IL-6* wykazują zaburzenia w zakresie akumulacji leukocytów w miejscu zapalenia [198].

W zakresie wpływu na hemopoezę, IL-6 wraz z interleukiną 3 pobudza proliferację i różnicowanie się pluripotencjalnych komórek macierzystych i komórek progenitorowych wielu szeregów, przede wszystkim megakariocytarnego oraz, w mniejszym stopniu, erytroidalnego i granulocytarno-makrofagowego [107]. IL-6 należy także do tzw. pozytywnych regulatorów wzrostu, która wraz z czynnikiem stymulującym powstawanie kolonii GM-CSF, M-CSF, G-CSF, IL-1 oraz IL-3, stymuluje proliferację i różnicowanie komórek krwiotwórczych, a także ich apoptozę [122, 123]. IL-6 wywiera wpływ również na prawidłowy przebieg procesu neoangiogenezy *in vivo* [79].

IL-6 jest wczesnym i czułym, ale niespecyficznym wskaźnikiem reakcji zapalnych toczących się w organizmie [215]. W stanach zapalnych wzrasta nawet 100-krotnie. Jest głównym stymulatorem syntezy białek ostrej fazy w wątrobie, zwłaszcza białka CRP [122]. Wykazano indukujący wpływ IL-6 także na syntezę fibrynogenu,  $\alpha$ -1-antychymotrypsyny,  $\alpha$ -1-antytrypsyny, surowiczego amyloidu A i wielu innych białek ostrej fazy. Białka te syntetyzowane są głównie przez hepatocyty, ale i inne komórki (śródbłonek, fibroblasty, adipocyty) [33, 123]. IL-6 uczestniczy również w regulacji stężenia transferyny, ceruloplazminy i haptoglobiny, wpływając przez to na transport jonów żelaza i miedzi w organizmie. Ma również działanie pirogenne i wraz z IL-1, TNF i interferonami podwyższa temperaturę ciała, stymulując produkcję prostaglandyn [122]. Indukuje syntezę glikokortykosteroidów poprzez wpływ na wydzielanie kortykotropiny i ACTH. Stymuluje proliferację komórek mezangium w proliferacyjnym mezangialnym kłębuszkowym zapaleniu nerek [122, 123].

Podobnie jak w przypadku innych cytokin prozapalnych, wysokie stężenie IL-6 obserwuje się we krwi i innych płynach ustrojowych w zapaleniach, urazach, rozległych oparzeniach, chorobach z towarzyszącym przewlekłym procesem zapalnym lub autoimmunologicznym (RZS, łuszczyca) oraz w nowotworach [122, 123, 214, 253]. Reakcja ostrej fazy jest elementem odporności nieswoistej i obejmuje zmiany zachodzące najwcześniej w odpowiedzi na uszkodzenie tkanek [74]. Jak wspomniano stężenie IL-6 zwiększa się w przypadku oparzeń, posocznicy i chorób tkanki łącznej. Odzwierciedla stopień i rozległość oparzeń oraz okres gojenia się rany. Koreluje z wielkością martwicy oraz ze stężeniem

białek ostrej fazy. Jest przydatnym markerem w diagnostyce zakażeń bakteryjnych i posocznicy [74], a także czynnikiem rokowniczym we wczesnym stadium ostrego zapalenia trzustki [36]. Wykazano również wyraźne zwiększenie stężenia IL-6 u pacjentów po transplantacji, zwłaszcza z powikłaniami zapalnymi [183]. IL-6 odgrywa także ważną rolę w patogenezie i rozwoju nowotworów [153]. Produkcję tej cytokiny wykazano także w wielu guzowych liniach komórkowych [12, 139, 148]. Ułatwia ona wzrost guza poprzez hamowanie procesów apoptozy komórek nowotworowych oraz indukcję angiogenezy w podścielisku guza. Wykazano jej wpływ na proliferację komórek raka jelita grubego i innych nowotworów, zwłaszcza tych o wysokim stopniu zróżnicowania [153].

Istnieją badania, które udowodniły, że w wielu schorzeniach zapalnych i autoimmunologicznych występuje nadprodukcja IL-6 [109]. Zwiększone stężenie IL-6 stwierdzono u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów [145] oraz w innych chorobach o podłożu immunologicznym, m.in. chorobie Crohna [185] i chorobie Castelmana [181]. Scheller i wsp. (2005) potwierdzili udział rozpuszczalnej postaci receptora sIL-6R w rozwoju chorób o podłożu zapalnym: zapaleniu otrzewnej, jelita grubego czy reumatoidalnym zapaleniu stawów [211]. Wykazano, że przeciwciała monoklonalne blokujące IL-6 lub IL-6R można stosować w leczeniu chorób o podłożu zapalnym i autoimmunologicznym [145, 201].

Charakterystykę molekularną IL-6 przedstawia **Tabela 1**.

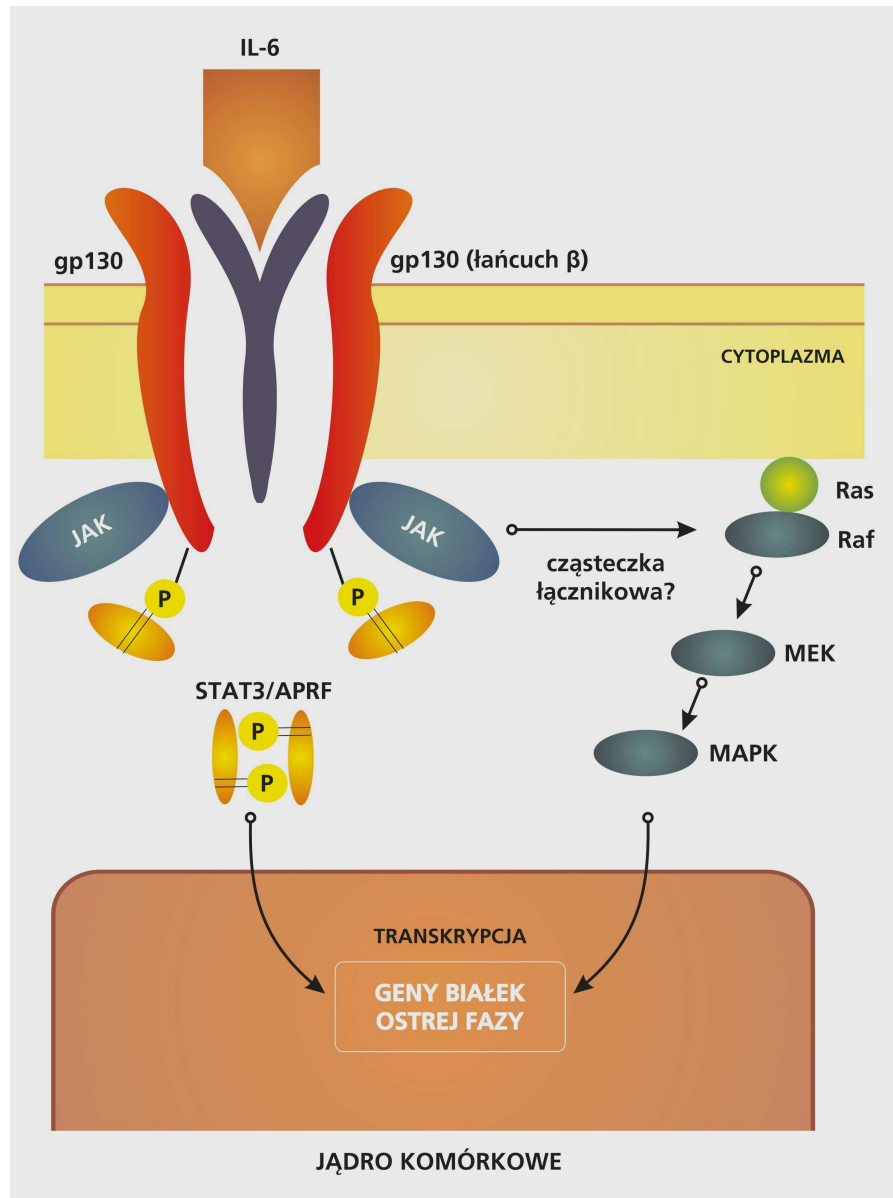
#### **2.1.2.1. Receptory IL-6**

System receptorowy IL-6 ma unikalną budowę. Pierwotnie opisano, że składa się on z dwóch polipeptydowych łańcuchów: 80 kDa receptora IL-6 oraz 130 kDa cząsteczki sygnałowej (gp 130) [239]. Aktualnie wiadomo, że receptory dla grupy cytokin o podobnym działaniu (m.in. IL-6, IL-11, rzęskowego czynnika neutrofowego, kardiotropiny 1), składają się z różnych łańcuchów  $\alpha$  (80 kDa) wiążących ligand i identycznego łańcucha  $\beta$  (gp 130, CD130), nie wiążącego ligandu, ale przenoszącego sygnał do wnętrza komórki [82]. Pod względem funkcjonalnym opisuje się dwa rodzaje receptorów dla tej cytokiny: IL-6R

o małym powinowactwie, który po związaniu z IL-6 tworzy kompleks z gp130 i zapoczątkowuje aktywację kinaz tyrozynowych JAK (z rodziny Janus) oraz rozpuszczalną postać receptora (sIL-6R), wiążącą się z IL-6, a następnie z białkiem gp130, co prowadzi do transdukcji sygnału i przeniesienia go do wnętrza komórki [113, 123, 211] **(Rycina 3)**.

Kompleks receptorowy składa się z jednego łańcucha IL-6R o masie cząst. 80 kDa oraz 2 cząsteczek gp130. Co ciekawe, IL-6 i jej receptor mogą tworzyć kompleks składający się z 2 cząsteczek IL-6 i dwóch cząsteczek IL-6R oraz dwóch cząsteczek białka gp130 [123, 200].

W ciągu kilku minut po stymulacji IL-6, aktywacja kinaz tyrozynowych, indukuje fosforylację tyrozyny i rekrutację białka STAT3, które ulega dimeryzacji i translokacji do jądra komórkowego, wpływając na ekspresję genów związanych m.in. z reakcją ostrej fazy [123].



**Rycina 3.** Schemat aktywacji komórek przy udziale IL-6 i jej receptora (IL-6R i cząsteczka gp130). Dwie zasadnicze ścieżki sygnałowe prowadzą do nasilania ekspresji białek ostrej fazy. Rycina według T. Kishimoto i wsp. (1995) [122] i T. Kishimoto (2006) [123], zmodyfikowana.

U człowieka gen kodujący łańcuch  $\alpha$  dla receptora IL-6 (IL-6R/CD126) znajduje się na chromosomie 1, a funkcjonalny gen kodujący kompleks gp130 na chromosomie 5 [99].

### 2.1.2.2. Rola IL-6 w zapaleniu pęcherzyka żółciowego

IL-6 jako cytokinę prozapalną cechuje wielokierunkowość biologicznych działań, w tym indukcja białek ostrej fazy w wątrobie i różnicowanie limfocytów B w komórki plazmatyczne, produkujące immunoglobuliny [123, 214]. Cytokina ta jest o tyle interesująca, że może być wydzielana (jako jedna z ważniejszych systemowych alarmowych cząsteczek sygnałowych) praktycznie przez komórki każdej uszkodzonej tkanki [214].

W kontekście badań nad udziałem IL-6 w patogenezie kamicy żółciowej, na modelu mysim wykazano, że sama otyłość przyczynia się do wzrostu lokalnej produkcji IL-6 (obok wzrostu wolnych kwasów tłuszczowych) w pęcherzyku żółciowym [160]. Dowiedziona jest rola całej rodziny receptorów IL-6 w przewlekłych zapalnych chorobach jelit u człowieka, które miałyby promować przejście fazy ostrej zapalenia w fazę przewlekłą, utrzymując stan chorobowy [200]. Nie ma dokładnych danych co do precyzyjnej roli systemu IL-6/IL-6R w chorobach pęcherzyka żółciowego u ludzi. Podobnie jak w przypadku IL-1 $\beta$  oraz TNF- $\alpha$ , w surowicy krwi pacjentów z kamicy żółciową obserwowano zróżnicowany w zależności od fazy zapalenia, wzrost stężenia IL-6 [251, 252]. Wzrost stężenia tej cytokiny dotyczył głównie wczesnych stadiów choroby [251]. Wyższe stężenia IL-6 obserwowano ponadto w zaostrzeniach kamicy żółciowej. Stężenie IL-6 w *cholelithiasis* wahało się od 30-90 pg/ml i było istotnie niższe niż stężenie TNF- $\alpha$  czy IL-12 [252].

Surowicze stężenia IL-6 badano również w kontekście urazu (naturalna tkankowa trauma) wywołanego różnym typem zabiegu chirurgicznego (otwarta vs. laparoskopowa cholecystektomia) [18, 89, 101, 110, 116, 138, 159, 194, 212]. Wszyscy badacze zgodnie wykazali, że wyższe stężenia surowicze IL-6 u operowanych pacjentów dotyczą "otwartej" cholecystektomii w porównaniu z zabiegiem laparoskopowym [89, 110, 138, 159, 212]. Stężenie IL-6 wydawało się być nawet czulszym wskaźnikiem odpowiedzi organizmu na "uraz" tkankowy niż systemowe stężenia norepinefryny czy epinefryny [138]. Niektóre z wyników badań przyniosły dowody na znaczące korelacje pomiędzy skumulowanymi odpowiedziami IL-1 $\alpha$  i IL-6 [116]. Porównywano również stężenia IL-6 u pacjentów operowanych na kamicy z zastosowaniem laparoskopowej oraz tzw. "mini-laparotomicznej" cholecystektomii (MC), uzyskując większy wzrost



(i bardziej stały) IL-6 u pacjentów operowanych z zastosowaniem metody MC. Wzrost ten utrzymywał się do ok. 7 dnia po zabiegu [29].

Inne badania dotyczące potencjalnej roli IL-6 w patogenezie *cholelithiasis* można łączyć z wynikami badań nad tkankową ekspresją tej cytokiny w komórkach nabłonkowych. Nadekspresję IL-6 opisano bowiem w wielu guzach litych oraz chorobach skóry [87, 139]. Szczególnie dużą ekspresję IL-6 opisywano w komórkach nabłonka wielowarstwowego płaskiego (keratynocyty) zdrowej i uszkodzonej skóry [87, 214]. IL-6 uznano nawet za regulator wzrostu komórek nabłonka i tworzenia połączeń międzykomórkowych [139]. Hipoteza, że IL-6 może odgrywać rolę w zmianach fenotypu komórek nabłonka pęcherzyka żółciowego i zaburzeniach funkcji absorpcyjnych i sekrecyjnych tych komórek sprzyjających kamicy żółciowej wymaga dalszych badań.

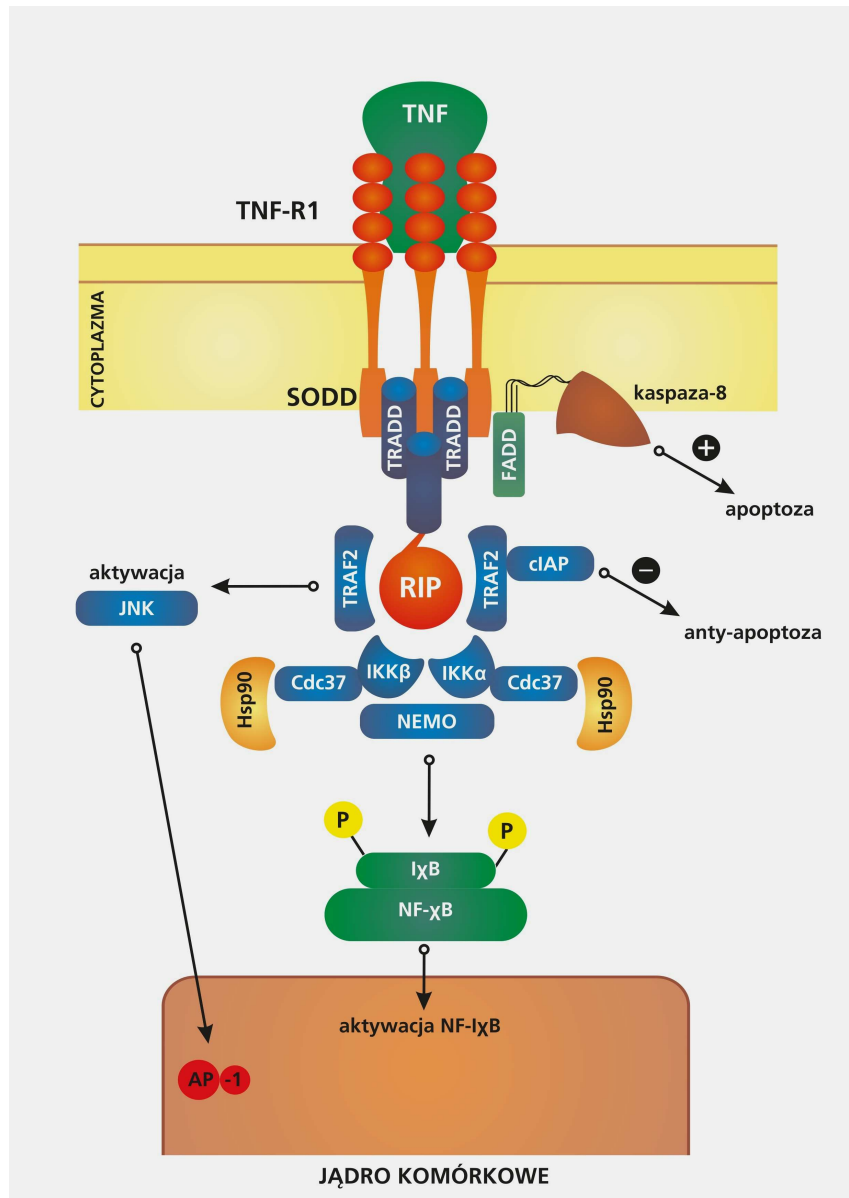
### **2.1.3. Czynniki martwicy nowotworów $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )**

TNF (ang. *Tumor Necrosis Factor*, czynnik martwicy guza, czynnik nekrozy nowotworów, kachektyna), cytokina z nadrodziny TNFSL (ang. *TNF superfamily ligands*) ma już ponad 100 letnią tradycję [149]. Nowojorski chirurg William Bradley Coley zaobserwował zanik mięsaka u chorego, u którego doszło do infekcji paciorkowcowej w postaci róży. Coley zakażał chorych na nowotwory początkowo żywymi szczepami bakterii, a następnie stosował nadsącz z hodowli bakterii *Streptococcus pyogenes* i *Serratia marcescens* (tzw. toksyna Coleya). Terapię zastosował u ponad 1000 chorych, a trwały efekt leczniczy osiągnął tylko u ok. 30 z nich. Pozytywne wyniki terapii w stosowaniu tejże toksyny wynikały z nasilenia reakcji zapalnej w wyniku wzmożonego wytwarzania cytokin, w tym TNF [41]. W 1968r. Gale Granger z Uniwersytetu Kalifornijskiego opisał substancję cytotoksyczną produkowaną przez limfocyty i nazwał ją limfotoksyną [127]. Następnie w 1975r. Carswell i wsp. opisali substancję cytotoksyczną produkowaną przez makrofagi i nazwali ją czynnikiem martwicy nowotworów [32, 130]. W 1984r. zsyntetyzowano limfotoksynę i TNF. Wtedy okazało się, że mają one podobną budowę cząsteczkową [182]. Limfotoksynę nazywa się obecnie TNF- $\beta$  (LT- $\alpha$ ), w odróżnieniu od TNF- $\alpha$  (zwanego po prostu TNF) [82]. Równolegle opisywano istnienie kachektyny

(białka powodującego wyniszczenie), a w 1985r. Bruce A. Beutler i Anthony Cerami doszli do wniosku, że TNF i kachektyna są identyczne i zostały nazwane TNF- $\alpha$  [19, 20, 21].

Obecnie wiemy, że TNF $\alpha$  należy do nadrodziny białek, składającej się z co najmniej 22 cząsteczek i zidentyfikowano dlań ponad 30 receptorów [82, 146]. W obecnej pracy skoncentruję się tylko na TNF $\alpha$ , zwłaszcza jego udziale w procesie zapalnym.

Aktywny TNF- $\alpha$  jest zbudowany z trzech identycznych łańcuchów polipeptydowych połączonych niekowalencyjnie (homotrimerów) [136, 242]. Prekursor TNF syntetyzowany jest jako białko przezbłonowe o masie cząsteczkowej 26 kDa (223 aa), a następnie w wyniku działania metaloproteinazy, enzymu konwertującego TNF- $\alpha$  zwanego TACE (ang. *TNF- $\alpha$  converting enzyme*) (lub ADAM17), uwalniany jest w postaci rozpuszczalnej formy (sTNF- $\alpha$ ) do środowiska [24]. Rozpuszczalna forma jest także homotrimerem i ma wielkość 17 kD (157 aa) [20, 24] **(Rycina 4)**.



**Rycina 4.** Schemat transdukcji sygnałów przekazywanych przez TNF- $\alpha$  i jego receptor TNF-R1. Rycina według G. Chen i Goeddel DV (2002) [35], zmodyfikowana.

Z biochemicznego punktu widzenia TNF- $\alpha$  jest glikoproteiną złożoną ze 182 aa będącą wynikiem obróbki potranslacyjnej 212 aa polipeptydu, kodowanego przez gen w pozycji 6p21.3. Cały gen TNF obejmuje wielkość 3 kb i zawiera 4 eksony i 3 introny [171, 174]. Istnieją również krótsze lub dłuższe izoformy produkowane przez różne tkanki. Geny dla TNF- $\alpha$  i obu limfotoksyn leżą jako

jedynie wśród cytokin w obrębie *locus* MHC klasy III, między HLA-B a HLA-DR [171].

TNF jest limfokiną o wielokierunkowym działaniu, głównie jednak związany jest z transdukcją sygnałów w odpowiedzi immunologicznej i procesie zapalnym, będąc podobnie jak IL-1 i IL-6, cytokiną prozapalną. Ponadto TNF- $\alpha$  działa jako pirogen, kiedy stymulowany jest przez IL-1. Może indukować śmierć komórkową, zwłaszcza komórek nowotworowych [20].

TNF- $\alpha$  produkowany jest głównie przez aktywne monocyty i makrofagi oraz w znacznie mniejszych ilościach przez inne komórki (adipocyty, keratynocyty, komórki mięśnia sercowego, fibroblasty, neutrofile, mastocyty, limfocyty T i B oraz hepatocyty) [63, 216]. Obok IL-6, duże ilości TNF wykazywano w zmianach łuszczykowych skóry oraz po naświetlaniu keratynocytów promieniami UV [82]. Wykazano indukcję ekspresji mRNA TNF- $\alpha$  w adipocytach w 4 różnych modelach otyłości i cukrzycy u szczurów [102]. Ekspresję TNF- $\alpha$  w hepatocytach, indukowaną zakażeniem wirusami hepatotropowymi (HBV, HCV) obserwowano zarówno w modelu *in vitro*, jak i *in vivo* [84, 117].

Najsilniejszym bodźcem do wytwarzania TNF- $\alpha$  jest lipopolisacharyd (LPS) ścian bakteryjnych, w mniejszym stopniu GM-CSF, M-CSF oraz sam TNF. Na produkcję TNF- $\alpha$  wpływa również IL-1 [1, 50]. LPS działając na makrofagi trzykrotnie wzmacnia ekspresję genu dla TNF- $\alpha$ . Poziom mRNA dla TNF wzrasta wówczas około 100-krotnie, natomiast wydzielanie dojrzałego białka aż 10 000-krotnie [1, 82]. W wyniku działania LPS w przebiegu ciężkich zakażeń bakteryjnych dochodzi do gwałtownego wzrostu wydzielania TNF, co może doprowadzić do wstrząsu septycznego, niewydolności wielu narządów i śmierci. Natomiast w stanach przewlekłych długotrwałe wydzielanie TNF prowadzi do kacheksji (stąd dawna nazwa kacheksyna, kachektyna) [1, 19].

Jak wspomniano, TNF- $\alpha$  jest jedną z głównych cytokin prozapalnych. Wykazuje wiele wspólnych efektów biologicznych z IL-1 oraz IL-6. Wiele działań biologicznych TNF- $\alpha$  jest również synergistycznych z innymi cytokinami, np. IL-1 [50].

Wpływ na układ odpornościowy wywiera zarówno bezpośrednio, jak i poprzez indukcję uwolnienia wielu cytokin oraz prostaglandyn i leukotrienów [50] (**Tabela 1**). Wykazano również wpływ TNF na proces angiogenezy, poprzez stymulację czynników proangiogennych, takich jak: VEGF, czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *fibroblast growth factor*, FGF), IL-8 oraz ich receptorów [22].

W wielu schorzeniach o podłożu zapalnym podjęto próby terapii z zastosowaniem inhibitorów TNF (przeciwciała monoklonalne anty-TNF, rozpuszczalne receptory dla tej cytokiny, leki hamujące wytwarzanie TNF np. talidomid). W przypadku schorzeń autoimmunizacyjnych oraz AIDS stosuje się przeciwciała monoklonalne blokujące TNF (infliksimumab, adalimumab) albo rozpuszczalne receptory dla tej cytokiny (TNFR1, p75) połączone z fragmentem Fc przeciwciała IgG (etanercept, lanercept) [176]. Leczenie inhibitorami TNF przynosi dobre efekty w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów oraz w chorobie Leśniowskiego-Crohna. Podejmowane są również badania kliniczne w zakresie terapii zaawansowanej niewydolności krążenia oraz w schorzeniu przeszczep przeciwko gospodarzowi [50, 82].

#### **2.1.3.1. Receptory dla TNF i limfotoksyn**

TNF- $\alpha$  wywiera wpływ na komórki łącząc się z odpowiednim receptorem na powierzchni błony komórkowej. Zidentyfikowano dwa typy takich receptorów [258]:

- TNFR1 (białko p55, CD120a, p55/60) – wiąże zarówno formę błonową jak i rozpuszczalną TNF;
- TNFR2 (białko p75, CD120b, p75/80) - wiąże głównie formę błonową TNF.

Gen kodujący TNFR1 u człowieka został zlokalizowany na chromosomie 12p13, a dla TNFR2 na chromosomie 1p36 [14]. Receptor ten znaleziono na powierzchni niemal każdej komórki jądrzastej.

Natomiast receptory TNFR2 wykazują ekspresję głównie na leukocytach i komórkach śródbłonna. Niektóre komórki (limfocyty, fibroblasty, komórki śródbłonna) mają na swojej powierzchni oba receptory dla TNF [258]. Z reguły nie obserwuje się korelacji między liczbą receptorów obecnych na komórce i jej odpowiedzią na TNF. Działanie obu receptorów TNF skutkuje translokacją czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B do jądra komórkowego, gdzie wiąże się on do regionów promotorowych różnych genów. Podobne geny *via* NF- $\kappa$ B są aktywowane także w wyniku połączenia IL-1 ze swoim receptorem [35, 50].

Wewnątrzkomórkowa część TNFR1 (p55) zawiera około 70-aa domenę określaną jako domena śmierci, rekrutującą powstanie białka zwanego MORT-1 [50]. Domena śmierci jest również obecna w wewnątrzkomórkowych odcinkach innych receptorów dla cząsteczek nadrodziny TNF indukujących apoptozę. Domena śmierci TNFR1 jest odpowiedzialna za aktywację dwóch niezależnych i przeciwstawnych szlaków w komórce – jeden prowadzi do apoptozy, a drugi do aktywacji NF- $\kappa$ B i indukcji ekspresji kilkudziesięciu genów [50, 258]. Cytoplazmatyczna forma TNFR1 (p55) rekrutuje także rodzinę wewnątrzkomórkowych białek związanych z domeną śmierci (ang. *TNFR-associated death domains*, TRADDs), które inicjują aktywację kaspaz (cysteinowe proteazy), etap istotny w drodze sygnałowej procesu programowanej śmierci komórki [35, 50, 258].

Unikalnych dla nadrodziny TNF domen śmierci nie wykryto w receptorach innych cytokin, np. IL-1RI oraz IL-1R-AcP, czy receptora IL-6 [50, 122].

Część cytoplazmatyczna receptora typu II TNF (TNFR2, p75) który, jak wspomniano, znajduje się głównie na komórkach układu limfatycznego, wiąże się bezpośrednio z TRAF1 (ang. *TNF-R-associated factor*)-1 i TRAF2. Białka te nie mają żadnej aktywności enzymatycznej (białka adaptorowe) i wiążą się z różnymi białkami uczestniczącymi w przekazywaniu sygnałów [108]. Wykrycie kolejnych białek z rodziny TRAF (TRAF3, TRAF4, TRAF5 i TRAF6), przyczyniło się do ujawnienia molekularnych mechanizmów dróg sygnałowych całej nadrodziny TNFR oraz rodziny receptora Toll/Interleukina-1 (Toll/IL-1R) [108]. TRAF2, TRAF5 i TRAF6 służą jako białka adaptorowe, które wiążą się do błonowych receptorów i uczestniczą w drogach sygnałowych z udziałem kinaz

białkowych A i C, prowadząc m. in. do aktywacji czynników transkrypcyjnych NF- $\kappa$ B i AP-1 [108].

Porównując receptory dla TNF i IL-1, należy dodać, że choć są one zupełnie inne pod względem budowy molekularnej, po-receptorowa kaskada wydarzeń jest zdumiewająco podobna. Nie dziwi więc fakt, że zarówno TNF, jak i IL-1 aktywują ten sam (lub bardzo podobny) zestaw genów [50].

Charakterystykę molekularną TNF- $\alpha$  przedstawiono w **Tabeli 1**.

### 2.1.3.2. TNF- $\alpha$ a kamica pęcherzyka żółciowego

W mechanizmach litogenezy podkreśla się rolę zaburzeń funkcji absorpcyjnych komórek nabłonka pęcherzyka żółciowego, wywołanych przez infekcje bakteryjne (głównie *E. coli*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*) i towarzyszący im proces zapalny [191]. Wykazano, że ekspozycja hodowanych komórek nabłonka pęcherzyka żółciowego na cytokiny prozapalne (w tym TNF- $\alpha$ ) prowadzi również do upośledzenia absorpcyjno-sekrecyjnych funkcji tych komórek [191]. Autorzy konkludują, że podobnie jak LPS czy PGE<sub>2</sub>, także cytokiny takie jak: IL-1 $\alpha$  i TNF- $\alpha$  wpływają bezpośrednio destrukcyjnie na funkcje komórek nabłonka pęcherzyka żółciowego [191]. Po stymulacji LPS obserwowano wzrost syntezy i wydzielania TNF- $\alpha$  (białko i mRNA) przez hodowane komórki nabłonka pęcherzyka żółciowego myszy [210]. Powstawanie mRNA TNF- $\alpha$  (ale nie białka) wykazywano również w komórkach nabłonka bez stymulacji antygenem bakteryjnym. Badania te wskazywały, że TNF- $\alpha$  może na drodze parakrynowej/autokrynowej pośredniczyć w funkcjach sekrecyjnych komórek nabłonka pż, a jego nasiloną synteza może mieć miejsce w warunkach stanu zapalnego i/lub sepsy [210]. Należy dodać, że stymulacja komórek nabłonkowych pż LPS, powodowała wzrost ekspresji nie tylko TNF- $\alpha$ , ale również IL-1 $\beta$  i IL-6, oraz wielu innych białek biorących udział w procesach zapalnych [210].

Przenosząc wyniki tych badań na warunki *in vivo* w przypadku chorób dróg żółciowych i pęcherzyka żółciowego, można sądzić że infekcja bakteryjna

(czy produkty bakterii, jak LPS) odgrywa istotną rolę w patogenezie stanu zapalnego dróg żółciowych i w konsekwencji może sprzyjać litogenezie. Komórki nabłonka obok funkcji protekcyjnej, mogą więc „odpowiadać” na obecność antygenów bakteryjnych właśnie produkcją (czy nadprodukcją) cytokin (w tym TNF- $\alpha$ ) i chemokin [210].

Dokładniejsza koncepcja udziału cytokin w patogenezie kamicy żółciowej bazowała na obserwacji pozytywnej zależności pomiędzy zakażeniem bakteryjnym (oraz TNF- $\alpha$ ) a nadprodukcją mucyn przez komórki nabłonka dróg żółciowych [64, 270].

Uszkodzający wpływ samego TNF- $\alpha$  na funkcję (sekrecyjną w tym przypadku) komórek nabłonkowych dróg żółciowych podkreślano w wielu badaniach dość wcześnie [37, 226]. I tak, badania Choi i wsp. (1999) wykazały, że LPS może stymulować sekrecję mucyn w komórkach nabłonka pęcherzyka żółciowego [37]. Następne badania wykazały, że LPS nasila wzrost produkcji mucyn w mysich prawidłowych komórkach nabłonka dróg żółciowych (ang. *murine-derived cultured biliary epithelial cells*, BECs), a dotyczy on mucyn: MUC2 i MUC5AC. Ten sam antygen bakteryjny powodował również wzrost produkcji TNF- $\alpha$  przez komórki nabłonkowe i uwalnianie go do podłoża hodowlanego. Sam TNF- $\alpha$  również indukował produkcję obu wspomnianych mucyn. Nadekspresję mucyn hamował inhibitor kinazy białkowej C (PKC) (calphostin C) [270]. Zdolność do indukowania nadprodukcji mucyn pokazały również badania Finzi i wsp. (2006) na ludzkich hodowanych komórkach pęcherzyka żółciowego. TNF- $\alpha$  indukował w nich nadekspresję receptora EGF (EGF-R). Ligandy dla EGF-R (EGF oraz transformujący czynnik wzrostu, TGF- $\alpha$ ) w obecności TNF- $\alpha$ , powodowały znaczący wzrost w produkcji glikoproteiny MUC5AC (białko i mRNA), a nie zmieniały ekspresji innych mucyn (MUC1, MUC3, MUC5B) [64].

Wzrost ekspresji TNF- $\alpha$  (i IL-1 $\beta$ ) w pęcherzykach żółciowych otyłych myszy na diecie bogatej w węglowodany potwierdziły badania Mathur i wsp. (2008). Autorzy dowodzą, że otyłość w połączeniu z dietą wysokowęglowodanową powoduje wzrost grubości pęcherzyka żółciowego oraz zwiększa w jego ścianie zawartość trójglicerydów i cholesterolu oraz produkcję wspomnianych cytokin [160].



Kontynuując ten wątek, należy podkreślić rolę TNF- $\alpha$  produkowanego przez adipocyty. Na 4 różnych modelach otyłości i cukrzycy u szczurów wykazano indukcję ekspresji mRNA TNF- $\alpha$  i białka w tych komórkach [102]. Badania te wskazywać miały na rolę TNF- $\alpha$  w otyłości, a także insulinooporności i cukrzycy, które towarzyszą otyłości [102]. Wiadomo, że właśnie otyłość (zwłaszcza u płci żeńskiej) oraz insulinooporność należą do kluczowych czynników ryzyka kamicy żółciowej [160, 213].

Na modelu hodowanych komórek nabłonka pęcherzyka żółciowego chomików wykazano, że podawanie cytokin prozapalnych (w tym TNF- $\alpha$  obok IL-1 $\beta$ ), indukuje produkcję tlenku azotu (ang. *nitric oxide*, NO), który indukuje uszkodzenia DNA prawidłowych komórek nabłonka pęcherzyka żółciowego. Genotoksyczne właściwości NO indukowane cytokinami prozapalnymi mogą być włączone w proces kancerogenezy w odpowiedzi na przewlekłe zapalenie dróg żółciowych [124]. Badania immunocytochemiczne i z użyciem hybrydyzacji *in situ* potwierdziły ekspresję TNF i jego receptora w kamicznym pż i tkance nowotworowej pęcherzyka żółciowego. Obserwowano wzrost ekspresji TNF w zależności od etapów rozwoju nowotworu pęcherzyka żółciowego (od hiperplazji, poprzez dysplazję do raka). Wzrost ekspresji genowej tej cytokiny korelował także z zaawansowaniem guza [220]. Ekspresja TNFR obecna była w komórkach *endothelium* oraz komórkach jednojądrzastych podścieliska guza, a negatywna w komórkach nabłonka pż i komórkach samego guza. Odkrycie to sugeruje, że TNF bierze udział w patogenezie raka pęcherzyka żółciowego wywołanego przez obecność kamieni żółciowych, a ekspresja TNF w komórkach raka może służyć jako marker zaawansowania nowotworu [220, 221].

W surowicy krwi pacjentów z przewlekłymi progresywnymi chorobami układu pokarmowego (w tym z kamcią żółciową), obserwowano znaczący wzrost surowicznych stężeń cytokin, w tym TNF- $\alpha$ , który znacznie przewyższał poziomy np. IL-1 $\alpha$  czy IL-6 (150-370 pg/ml vs. 30-80 pg/ml) [251, 252]. Wzrost stężenia TNF- $\alpha$  autorzy ci obserwowali zwłaszcza w późniejszych stadiach choroby [251].

Kolejną grupę badań, publikowanych szczególnie licznie pod koniec lat 90-tych XX wieku, stanowi określanie systemowej odpowiedzi zapalnej u pacjentów w zależności od wielkości naturalnej tkankowej traumy związanej z usunięciem pęcherzyka żółciowego (cholecystektomia) [29, 34, 89, 101, 138, 190].

Po operacji usunięcia pęcherzyka żółciowego generalnie obserwowano większe stężenia TNF- $\alpha$  w przypadku konwencjonalnej (otwartej) cholecystektomii w porównaniu z laparoskopową [34, 89, 101, 138,], choć w 4 dniu po operacji wzrost TNF- $\alpha$  zasadniczo nie różnił się pomiędzy grupami operowanych osób [194]. Niektórzy z autorów nie notowali różnic w stężeniu TNF- $\alpha$  w zależności od rodzaju zabiegu operacyjnego, choć sam zabieg operacyjny powodował znaczący wzrost stężenia tej cytokiny w porównaniu z wartością sprzed operacji [18]. Najwyższe stężenia mediatorów zapalenia (w tym TNF- $\alpha$ ) obserwowano z reguły w pierwszym dniu po operacji, większe po zabiegu konwencjonalnym w porównaniu z zabiegiem laparoskopowym [34]. Niektórzy z badaczy drugi pik w pooperacyjnych stężeniach cytokin prozapalnych, w tym TNF widzieli w 3 dniu [194]. Inni obserwowali z kolei obniżenie stężenia cytokin w 3 dniu po operacji (jednak stężenia wciąż wyższe niż w kontroli) [34]. Nie obserwowano korelacji pomiędzy stężeniem cytokin (w tym TNF- $\alpha$ ) a CRP [194] i różnic w stężeniu kortyzolu, czy CRP pomiędzy grupami [190]. Podsumowując wyniki wszystkich powyższych badań w przypadku leczenia kamicy, większość prac rekomenduje stosowanie w pierwszym rzędzie cholecystektomii laparoskopowej jako metody operacyjnej.

Jeśli chodzi o nieoperacyjne leczenie nawracających przewlekłych chorób przewodu pokarmowego podejmowano próby terapii monoklonalnymi przeciwciałami anti-TNF $\alpha$ , co wiązało się z przejściowymi widocznymi zmianami stężenia cytokin we krwi obwodowej [252]. Nie znaleziono jednak dokładniejszych opracowań na ten temat w kamicy pęcherzyka żółciowego.

### 3. Białka z rodziny S100

Białka S100 należą do rodziny liczącej 25 przedstawicieli i charakteryzują się wysoką homologią, tkankowo-specyficzną ekspresją oraz w większości niską masą cząsteczkową (9-14 kDa) [55, 75, 95, 157, 227]. 21 z ludzkich genów S100 jest rozmieszczonych w regionie chromosomu 1q21, regionu, który często ulega delecji, translokacji lub duplikacji w guzach, wskazując na ich potencjalną rolę w kancerogenezie [227].

Najwcześniej opisano białka S100A1 (zwane uprzednio S100/S100 $\alpha$ ) oraz S100B (wcześniej zwane S100 $\beta$ ). Grupa białek S100 obejmuje białka o bardzo zbliżonej budowie pierwszorzędowej, podlegające modyfikacjom potranslacyjnym.

Białka S100 wiążą dwa jony  $\text{Ca}^{2+}$  z różnym powinowactwem za pomocą tzw. motywów *EF-hand* [54, 55]. Niektóre z tych białek wiążą również jony  $\text{Zn}^{2+}$  oraz jony  $\text{Cu}^{2+}$  [94].

Białka S100 wpływają m.in. na aktywność enzymów, fosforylację białek, transkrypcję genów, reorganizację wszystkich składników cytoszkieletu oraz regulację homeostazy wapniowej. Mogą być wydzielane także na zewnątrz komórki i uczestniczyć w procesach komunikacji międzykomórkowej [54]. Charakterystyczną cechą białek S100, jak wspomniano, jest ich występowanie w określonych typach komórek i tkanek. Wykazano, że nasilenie i miejsce ekspresji białek S100 może zmieniać się w czasie rozwoju organizmu oraz w stanach chorobowych [112]. Białka z grupy S100 uważane są za marker różnicowania glejowego [46]. W normalnych tkankach, białko S100B najbardziej obficie występuje w komórkach glejowych centralnego i obwodowego układu nerwowego, w melanocytach, chondrocytach i komórkach tłuszczowych. Białko S100B jest typowym białkiem wydzielniczym astrocytów i uwalniane do przestrzeni pozakomórkowej, może wywierać zarówno efekt troficzny, jak i toksyczny (w zależności od stężenia) na komórki nerwowe i glejowe [217, 243]. Ze względu na swoje funkcje nazwane zostało C-reaktywnym białkiem mózgu („CRP” mózgu) [217]. Podwyższone stężenia S100B zostały wykazane m.in. u pacjentów z chorobą Alzheimera, w zespole Downa, schizofrenii, depresji oraz pourazowych uszkodzeniach mózgu [243].

Nadmierna produkcja tego białka przez astrocyty jest być może odpowiedzialna za zespoły neurodegeneracyjne u człowieka [243]. Natomiast białko S100A1 najliczniej reprezentowane jest w kardiomiocytach, komórkach mięśni szkieletowych oraz komórkach nabłonkowych ślinianek i nerek. Istnieje cała lista tkanek patologicznych, w których wykazano ekspresję białek S100, obejmująca także wiele nowotworów u człowieka [175, 227, 249].

W komórce białka S100 występują najczęściej w postaci niekonwalencyjnych dimerów. I tak np. S100B tworzy heterodimer z S100A11, S100A1 z S100B, S100A8 z S100A9, co ma prawdopodobnie znaczenie w ich aktywności biologicznej [75, 112].

Wśród białek S100 znajduje się podgrupa białek (S100A12, S100A8 i S100A9) ściśle związana z regulacją czynności układu immunologicznego, których ekspresja występuje w ostrych i/lub przewlekłych schorzeniach zapalnych [65] oraz różnych nowotworach u człowieka [86, 249]. Ze względu na właściwości wiązania jonów wapnia oraz wysoką ekspresję w granulocytach, podgrupę tę nazywa się także kalgranulinami. Rola tych białek w procesach zapalnych pomimo intensywnych badań, prowadzonych w ostatnich latach, pozostaje niejasna. Najczęściej uważa się, że nie jest to jedynie działanie prozapalne, ale efekt tych białek jest raczej plejotropowy [11, 75, 86, 94]. Tak więc podobne do cytokin działanie tej grupy białek S100 w zapaleniach, sugeruje ich rolę także w kancerogenezie na tle zapalenia [75]. Badania ostatnich lat na modelu mysim przypisują białkom S100A8/S100A9 rolę w otyłości i chorobach układu krążenia oraz miażdżycy. Kompleks ten moduluje w różnorodny sposób odpowiedź zapalną komórek szpikowych. I tak, w przypadku neutrofilów wywołuje efekt prozapalny, którego nie obserwuje się w przypadku makrofagów, efekt przeciwzapalny wykazano natomiast w przypadku komórek dendrytycznych [11]. Dalszych badań wymaga pełne zrozumienie roli tych białek produkowanych przez różne populacje komórkowe u człowieka, zwłaszcza w kontekście zastosowań terapeutycznych.

### 3.1. Ekspresja genu S100A8 i S100A9

Geny dla ludzkich białek S100A8 i S100A9 znajdują się na chromosomie 1q21, łącznie z innymi genami dla całej grupy białek S100 [75, 86]. Choć białka S100A8 i S100A9 mogą występować jako homodimery podobnie jak większość białek S100 [86, 227], to preferencyjnie tworzą one heterodimery S100A8/A9 [86]. Mogą także tworzyć tetramery indukowane jonami  $\text{Ca}^{+2}$  [227]. Heterodimer znany także pod nazwą kalprotektyna (inne nazwy: białko szpikowo-zależne, MRP8/14) został oryginalnie odkryty jako immunogenne białko, o m. cząst. 36 kDa wydzielane przez neutrofile i posiadający właściwości antybakteryjne [45, 67, 228]. Dość wcześnie konstytutywną ekspresję kalprotektyny wykazano nie tylko w neutrofilach, ale także komórkach dendrytycznych pochodzenia szpikowego, płytkach krwi, osteoklastach, hipertroficznym chondrocytach oraz trofoblastach [86]. Następne badania wykazały, że wysokie stężenia tych białek cechują niektóre stany zapalne. Mogą one działać jak czynniki chemotaktyczne i są konstytutywnie produkowane obok neutrofilów, także przez aktywowane monocyty i makrofagi [65, 203, 206]. Białka S100A8 i S100A9 nazywane są, jak podano wcześniej, także kalgranulinami, choć nie wszyscy autorzy uznają tę nazwę za prawidłową [66]. Kalgranuliną A nazywano białko S100A8 (inna nazwa: *myeloid-related protein 8*, MRP8), kalgranuliną B – S100A9 (zwana także MRP14) i kalgranuliną C – białko S10012 (*extracellular newly identified RAGE binding protein*, EN-RAGE) [66, 104]. Pod wpływem stymulacji antygenowej, białka S100A8/A9 mogą być produkowane także przez wiele innych typów komórek ludzkich i zwierzęcych (komórki śródbłonna mikronaczyń, fibroblasty, keratynocyty) [86]. Sugeruje się, że S100A8 i S100A9 produkowane przez aktywowane komórki śródbłonna, fibroblasty i keratynocyty pełnią głównie rolę wewnątrzkomórkową, w odróżnieniu od stymulowanych monocytów/makrofagów, które uwalniają te kalgranuliny na zewnątrz komórki [86].

Jak wspomniano, heterodimer S100A8/A9 szczególnie obficie występuje w neutrofilach i stanowi ok. 40%-50% rozpuszczalnej frakcji cytozolu [45]. Oba białka ulegają translokacji do cytoszkieletu i błony komórkowej w momencie podwyższonego wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia [202]. Wykazano, że kalprotektyna reguluje aktywność kinaz kazeinowych I i II,

a także RNA-polimeraz I i II. Ekspresja S100A8 i S100A9 oraz regulacja wspomnianych kinaz kazeinowych zachodzi tylko w makrofagach w odpowiednim stadium funkcjonalnym, co jest prawdopodobnie związane z odpowiedzią na stany zapalne [112]. Genowa indukcja S100A8 w makrofagach jest zależna od IL-10 i wzmacniana przez czynniki immunosupresyjne [86].

Kompleks S100A8/A9 odpowiada za wrodzoną odporność i rekrutację leukocytów do miejsc zapalenia. Odpowiada za adhezję i transmigrację leukocytów przez śródbłonki naczyń. Jest ważnym mediatorem różnych procesów w przewlekłej fazie zapalenia [65, 66, 67]. Ze względu na funkcje we wrodzonej odporności i produkcję w odpowiedzi na uszkodzenie tkanki (stres komórkowy), białka S100A8 i S100A9 zwane są również „endokinami”, „alarminami” lub białkami DAMP (ang. *damage associated molecular pattern proteins*). Wydzielane są przez aktywowane lub uszkodzone komórki, a swoje efekty prozapalne wywołują poprzez interakcję z cząsteczkami receptorowymi PRRs [67]. Wykazano, że efekt prozapalny *in vitro* wywołują w tych samych stężeniach, jakie znajdowano w miejscach zapalenia [66]. Białka S100A8 i S100A9, prócz fosforylacji, mogą ulegać oksydacji oraz mieć dołączane grupy siarkowe i nitrozyłowe (SNO). Taka forma białka (S100A8-SNO) hamuje aktywację komórek tłuszczowych i ogranicza samo zapalenie, regulując napięcie mięśniówki naczyń w miejscach zapalenia tkankowego [86].

W warunkach *in vitro* wykazano bezpośrednie działanie antybakteryjne i przeciwgrzybicze „wolnych” kalgranulin i to w stosunku do wielu patogenów, m.in. *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *Borrelia burgdorferi*, *Listeria monocytogenes* i *Candida albicans* [104]. Sugerowane mechanizmy zewnątrzkomórkowego działania ludzkiego białka S100A8 obejmują: nasilanie chemotaksji (neutrofilów, monocytów) i ekspresji integrzyn, zwiększanie komórkowego metabolizmu oraz procesów oksydacyjnych [86]. Białko S100A9 dodatkowo (prócz podanych wcześniej) ma wpływać na migrację fagocytów, indukowanie bólu spowodowanego zapaleniem, wywoływanie zmian miażdżcowych, potęgowanie funkcji makrofagów. Cały heterodimer S100A8/A9 obejmuje wszystkie powyższe funkcje oraz dodatkowo bierze udział w migracji

makrofagów, transporcie kwasu arachidonowego, procesach apoptozy, nasilaniu odkładania się amyloidu oraz aktywacji komórek śródbłonna [86].

Jeśli chodzi o procesy zapalne, kalprotektyna może zarówno propagować zapalenie, jak i wykazywać działanie przeciwzapalne. To ostatnie działanie wykazano u szczurów [86]. W antybakteryjnym działaniu kalgranulin z pewnością odgrywa rolę także sekwestracja  $Zn^{+2}$  i  $Mn^{+2}$  przez te białka [104].

Nadekspresja białek S100A8/A9 została opisana w wielu schorzeniach u ludzi i to zarówno chorobach o etiologii zapalnej i autoimmunologicznej (mukowiscydoza, reumatoidalne zapalenie stawów, przewlekłe zapalenie oskrzeli, przewlekłe choroby zapalne jelit, toczeń układowy, stwardnienie rozsiane, uogólniona miażdżyca), jak i w nowotworach (raki piersi, płuc, żołądka, jelita grubego, trzustki, i prostaty) [67, 75, 112, 234]. Szczególnie ścisły związek dotyczyć ma ekspresji białka S100A9 i nowotworów o charakterze gruczolowym (piersi, płuc i tarczycy) [przeгляд tematu: 75]. Obecność wysokich stężeń obu białek w surowicy krwi chorych z zapaleniami, sugeruje że białka S100A8/A9 mogą stanowić potencjalne biomarkery zapalenia, służyć do monitorowania aktywności choroby i badania odpowiedzi na leczenie [65]. Szczególnie istotne jest również podkreślenie roli obu kalgranulin w patogenezie nowotworów u człowieka, które rozwijają się na podłożu przewlekłego stanu zapalnego [75].

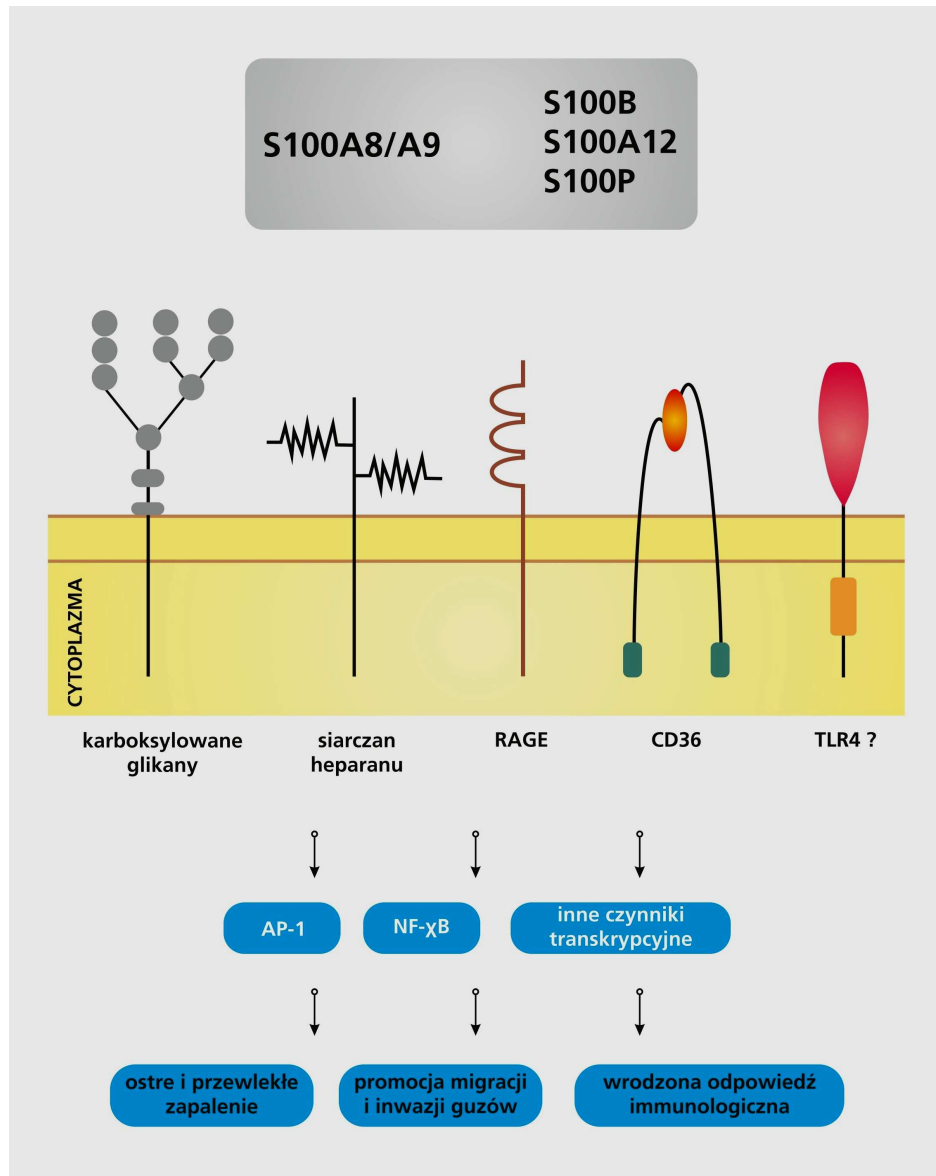
Obserwowano indukcję ekspresji S100A8/A9 w warunkach eksperymentalnych *in vitro* w mysich komórkach śródbłonna mikronaczyń i makrofagach wywołaną przez podanie TNF- $\alpha$  oraz IL-1 [265, 268]. Z drugiej strony wykazano również, że białka S100A8/A9 nasilają ekspresję TNF- $\alpha$  w komórkach śródbłonna naczyń u ludzi [255]. Ponadto wykazano, że TNF- $\alpha$  aktywuje ekspresję S100A8 i S100A9 w keratynocytach naskórka [17]. W piśmiennictwie opisano również, że S100A8/A9-pozytywne makrofagi produkują i wydzielają TNF- $\alpha$  [120].

### 3.2. Receptory dla białek S100A8 i S100A9

Kalgranuliny wydzielane są przez komórki z pominięciem siateczki endoplazmatycznej i aparatu Golgiego, gdyż nie posiadają sygnałowego peptydu. Uwalnianie to może być stymulowane bodźcami prozapalnymi, poprzez aktywację kinazy białkowej C (PKC) lub wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia po kontakcie z aktywowanymi komórkami śródbłonna. Bakteryjny LPS i cząsteczka C5a powoduje szybkie wydzielanie S100A8 i S100A9 z neutrofilów i monocytów w procesie zależnym od komórkowej tubuliny [104]. Sugeruje się, że ludzkie S100A8 i S100A9 uwalniane są do przestrzeni pozakomórkowej w wyniku śmierci komórki [256].

Heterodimer S100A8/S100A9 i inne białka z rodziny S100 (S100B, S100A12, S100P) posiadają na błonach komórek docelowych wiele potencjalnych receptorów i/lub koreceptorów. W badaniach *in vitro* wykazano, że S100A8/S100A9 łączą się z siarczanem heparanu oraz karoboksylowanymi glikanami [197]. Ponadto cząsteczka CD36 i receptor dla końcowych produktów glikozylacji (ang. *receptor of advanced glycation end products*, RAGE) wydają się być dwoma innymi potencjalnymi receptorami dla obu kalgranulin [75]. Białka S100A8 i S100A9 są prawdopodobnie ligandami także dla TLR-4 (ang. *toll-like receptor 4*). Na modelu mysim wykazano interakcję pomiędzy S100A8 i rekombinowanym TLR4 [257] **(Rycina 5)**.





**Rycina 5.** Model działania białek z rodziny S100 i ich receptorów w ostrym i przewlekłym zapaleniu, inwazji guzów oraz wrodzonej odporności. Rycina według C. Gebhardt i wsp. (2006) [75], zmodyfikowana.

### 3.3. Rola białek S100A8/A9 w chorobach przewodu pokarmowego

Białka S100A8 i S100A9 są wytwarzane głównie przez komórki nacieków zapalnych. Stężenia tych białek w krążeniu są podwyższone szczególnie w stanach zapalnych, przebiegających z infiltracją neutrofilami i/lub aktywowanymi monocytami/makrofagami [86, 233]. Choć wzrost surowiczych stężeń kalgranulin nie pozwala na diagnostykę konkretnej jednostki chorobowej, niektórzy z autorów sugerują, że mogą być one niespecyficznymi markerami aktywacji fagocytów [65, 66]. Badanie stężeń kalgranulin pochodzących z lokalnych źródeł zapalenia (np. stolec, płwocina) może być pomocne w diagnozowaniu takich jednostek chorobowych, jak stany zapalne jelit czy astma oskrzelowa [67, 68, 86]. Kompleks S100A8/A9 obecny w stolcu („kałowa” kalprotektyna) zaproponowany został jako marker stanów zapalnych jelita [67, 131]. Rozpuszczalna forma kalprotektyny (w odróżnieniu od postaci błonowej) wywiera efekt bakteriostatyczny i wykazuje szereg właściwości cytokinopodobnych w lokalnym mikrośrodku [233].

Jak wspomniano, uważa się, że kalgranuliny są uwalniane z cytoplazmy „umierających” bądź obumarłych neutrofilów do płynnej zawartości ropnia [126]. Określono nawet pozytywną korelację pomiędzy zewnątrzkomórkowym stężeniem kalgranulin, gęstością neutrofilów i utratą vitalności tych komórek [104].

Zademonstrowano immunocytochemiczną ekspresję białek S100A8/S100A9 w fagocytach nacieków zapalnych jelita cienkiego [150].

W przewlekłych chorobach jelit (aktywna choroba Crohna, wrzodziejące zapalenie jelita grubego) oraz tkankach jelita z objawami nadwrażliwości, wykazano wzrost wydzielania głównie białka S10012, w mniejszym stopniu białek S100A8/A9 [67]. Ujawniono, że więcej białek pochodziło ze zmian zapalnych jelita grubego w porównaniu z cienkim. Jest to dyskutowane przez autorów pracy. Ponadto wszystkie badane białka S100 indukowały wzrost sekrecji cząsteczek adhezyjnych i chemokin przez hodowane komórki śródbłonna mikronaczyń (ang. *intestinal microvascular endothelial cells*, HIMECs), izolowane z prawidłowej tkanki jelita grubego [67]. Badania te wskazują, że bezpośrednie uwalnianie białek S100 z fagocytów w miejscach

zapalenia, odzwierciedla sekrecję tychże z naciekowych neutrofilów (S100A12) oraz monocytów lub komórek nabłonkowych (MRP8/14) [67].

Obserwowano wzrost zarówno surowiczych, jak i tkankowych poziomów białek S100 (kalprotektyny i S100A12) także w chorobach zapalnych jelita grubego u dzieci [143]. Obserwowano korelację stężenia S100A12 w błonie śluzowej z aktywnością zapalną jelit. Ekspresja S100A8, S100A9 oraz S100A12 była obfita w całej zapalnie zmienionej błonie śluzowej (*lamina propria* i nabłonek) w porównaniu z ekspresją dotyczącą tylko komórek *lamina propria* w materiale kontrolnym [143]. Obecność białek S100A8/A9 oraz S100A12 wykazano również w błonie śluzowej żołądka z zakażeniem *Helicobacter pylori* u dzieci, a nie było ekspresji tychże w kontrolnej błonie śluzowej [142]. Sugeruje się, że białka te działają jako wrodzone antybakteryjne proteiny ograniczające zakażenie w błonach śluzowych ściany jelita.

Wykazano także zwiększoną ekspresję białka S100B na poziomie mRNA i białka u pacjentów z nieleczoną chorobą trzewną. Źródłem komórkowym tego białka w dwunastnicy były jelitowe komórki zwojowe. Dowiedziono roli tego przedstawiciela rodziny S100 w indukowaniu produkcji syntazy tlenu azotu i produkcji azotynu. Ekspozycja na gliadynę znacząco zwiększała produkcję białka S100B, syntazy tlenu azotu i produkcję azotynu [59].

Zwiększoną ekspresję S100A9 i S100A8 w porównaniu z kontrolą, wykazano także u 70% pacjentów z rakiem jelita grubego. Badanie immunocytochemiczne pozwoliło na udokumentowanie kolokalizacji S100A8 i S100A9 w komórkach (makrofagi i neutrofile) wzdłuż inwazyjnego marginesu tkanki nowotworowej [234].

Rola białek S100 produkowanych przez fagocyty w patogenezie *cholelithiasis* jest słabo poznana i brakuje danych w dostępnym piśmiennictwie. Jedno z białek S100 (S100A4) uznano za czynnik gorszej prognozy w raku pęcherzyka żółciowego. Obserwowano krótszy czas przeżycia pacjentów z pozytywną ekspresją S100A4. Białko to scharakteryzowane zostało jako cząsteczka indukująca przerzuty, regulująca ruchliwość i nasilająca inwazyjność komórek nowotworowych [169].

Podsumowując, białka S100A8 i S100A9 pełnią głównie rolę prozapalną. Dokładne funkcje (w tym przeciwzapalne) mogą wynikać z posttranslacyjnych modyfikacji białek w warunkach oksydacyjnych środowiska. Być może zależą także od aktywności proteaz uwalnianych z aktywowanych fagocytów, wiązania jonów cynku, konkretnych komórek produkujących te białka oraz innych bliżej nieznanych czynników [86].

## ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Mechanizmy powstawania kamieni żółciowych u człowieka są tylko częściowo poznane. Istnieje również wiele hipotez dotyczących udziału samej reakcji zapalnej w patogenezie kamicy żółciowej.

Nieliczne dane literaturowe wskazują na zwiększone surowicze stężenia cytokin prozapalnych w zależności od fazy zapalenia pęcherzyka żółciowego u pacjentów z objawową kamicyą. Z badań tych nie wynika jednoznacznie jakie jest nasilenie ekspresji tych białek w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego objętego procesem zapalnym, gdyż nie wszystkie cytokiny produkowane przez komórki w lokalnym nacieku zapalnym, muszą być uwalniane do krwi czy do żółci.

Brakuje badań na temat roli białek z rodziny S100, produkowanych przez fagocyty nacieków zapalnych pęcherzyka żółciowego w litogenezie i/lub przebiegu reakcji zapalnej. Nie wiadomo również czy podobnie jak w innych chorobach przewodu pokarmowego, białka S100A8 i S100A9 mogą być markerami nasilenia zmian zapalnych w *cholecystitis*.

Podstawowym celem badań była ocena komórkowej ekspresji cytokin prozapalnych oraz białek z rodziny S100 w zapalnie zmienionych pęcherzykach żółciowych u pacjentów z kamicyą żółciową, ze szczególnym uwzględnieniem obszaru błony śluzowej, która stanowi element pierwotnego układu odporności w ścianie przewodu pokarmowego.

Szczegółowe cele pracy obejmują:

1. Histopatologiczną ocenę zmian morfologicznych oraz aktywności zapalnej (*grading*) w pęcherzyku żółciowym u pacjentów z ostrym i przewlekłym zapaleniem narządu,
2. Immunocytochemiczną analizę komórkowej ekspresji klasycznych cytokin prozapalnych (IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  i IL-6) oraz białek z rodziny S100 (S100B, S100A8 i S100A9) w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego u pacjentów z ostrym i przewlekłym kamiczym zapaleniem pęcherzyka żółciowego,

3. Immunocytochemiczną ocenę fenotypu komórek nacieków zapalnych w pęcherzyku żółciowym w kamiczym zapaleniu narządu,
4. Analizę porównawczą oraz korelacje pomiędzy tkankową ekspresją cytokin prozapalnych i białek z rodziny S100 a wybranymi danymi klinicznymi w obu grupach chorych, z uwzględnieniem grupy najmłodszych pacjentów (poniżej 25 roku życia) z objawową kamicą żółciową.

## MATERIAŁ I METODY

### 1. Pacjenci

Badane grupy pacjentów podzielono na dwie zasadnicze grupy: 16 pacjentów z ostrym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (ACC, ang. *acute calculous cholecystitis*) i 55 chorych z przewlekłym zapaleniem narządu (CCC, ang. *chronic calculous cholecystitis*). W grupie CCC wyróżniono dwie podgrupy – 35 pacjentów młodszych (do 25 r.ż.) oraz 20 pacjentów starszych (średnia wieku około 50 lat).

Rozpoznanie ostrego i przewlekłego zapalenia pęcherzyka żółciowego w przebiegu objawowej kamicy żółciowej postawiono zarówno na podstawie objawów klinicznych, jak i zmian morfologicznych usuniętego pęcherzyka żółciowego.

Wszyscy pacjenci zostali poddani cholecystektomii (w większości laparoskopowej) w Szpitalu im. T. Chałubińskiego w Ostrowie Wielkopolskim w latach 2003-2007. Podgrupę młodych pacjentów z CCC (n=35) stanowią wszyscy pacjenci  $\leq 25$  roku życia, których udało się zebrać w latach 2003-2007. Czas trwania objawów kamicy żółciowej w grupie z przewlekłym *cholecystitis* (CCC) wynosił od pół roku do 1 roku.

Z badanych grup chorych wykluczono pacjentów, którzy przechodzili jakieś inne operacje brzuszne przed cholecystektomią, chorych z układowymi chorobami tkanki łącznej, pacjentów nadużywających alkohol oraz stosujących przewlekle leki przeciwzapalne oraz inne, które mogłyby zmieniać proces gojenia ran czy sam proces zapalny.

Kamica pęcherzyka żółciowego została zdiagnozowana na podstawie klasycznych objawów klinicznych, badań laboratoryjnych, a rozpoznania histopatologiczne postawione na podstawie oceny skrawków parafinowych usuniętych pęcherzyków żółciowych (rutynowe barwienie hematoksyliną i eozyną, H+E). U wszystkich chorych przed zabiegiem operacyjnym wykonano badanie przedmiotowe i obrazowe metodą USG.

Dla obecnego opracowania wykorzystano podstawowe wyniki badań laboratoryjnych (biochemia, hematologia) oraz dane kliniczne dotyczące wieku,

płci, masy ciała i wzrostu pacjenta oraz innych towarzyszących schorzeń (nadciśnienie, cukrzyca).

U większości pacjentów nie wykonywano standardowo badań bakteriologicznych treści, pobieranej śródoperacyjnie, stąd poza dwoma przypadkami (w jednym posiew tlenowy jałowy, w drugim – wyhodowano bakterie *E. coli*), niemożliwe było wykorzystanie takich informacji do badania ewentualnych zależności.

Liczbę złożeń/kamieni żółciowych usuniętych w czasie zabiegu oszacowano w następującej skali ilościowej: 1 - obecność jednego kamienia niezależnie od wielkości; 2 - 2-20 kamieni; 3 - >20-100 kamieni; 4 - >100 kamieni. Wskaźnik masy ciała (ang. *Body Mass Index*, BMI) obliczano na podstawie wzoru  $BMI = \text{masa ciała (kg)} / \text{wzrost (m}^2\text{)}$ , przyjmując za otyłość wartość  $\geq 30$ .

Rozpoznanania histopatologiczne: *cholecystitis chronica* i/lub *cholecystitis acuta* ustalone zostały w oparciu o ocenę morfologii pęcherzyków żółciowych w barwieniu hematoksyliną i eozyną, wykonaną w ramach badań diagnostycznych w Pracowni Patomorfologii Szpitala im. T. Chałubińskiego w Ostrowie Wielkopolskim.

W ramach rozprawy doktorskiej preparaty histologiczne zostały poddane ponownym badaniom świetlnomikroskopowym (mikroskop Olympus BH-2) i ilościowej ocenie nasilenia zmian zapalnych (*grading*) oraz liczby komórek nacieków zapalnych, możliwych do oceny w rutynowym barwieniu histologicznym (H+E). To powtórne badanie w barwieniu H+E miało również na celu kwalifikację reprezentatywnego materiału do badań z zastosowaniem technik immunocytochemicznych. Szczególną uwagę zwracano na morfologię struktur błony śluzowej pęcherzyka żółciowego, a mianowicie nabłonek i blaszkę właściwą błony śluzowej (*lamina propria*).

## **2. Materiał tkankowy, stosowane odczynniki oraz metodyka badań**

**2.1.** Podstawowy materiał do badań stanowiły bloczki parafinowe, zawierające archiwalny materiał pooperacyjny od chorych z kamicą żółciową (n=16 z grupy ACC oraz n=55 z grupy CCC), utrwalony w 4% roztworze zbuforowanej



formaliny przez 24 godziny, a następnie zatapiony w parafinie. Seryjne skrawki o grubości około 5  $\mu\text{m}$  skrojone zostały na szkiełka SuperFrost/Plus.

**2.2.** Kontrolę pozytywną stanowił również materiał tkankowy utrwalony w 4% zbuforowanej formalinie i zatapiony w parafinie. Dysponowano fragmentami dziąseł od pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (n=6) oraz fragmentami odczynowych węzłów chłonnych (n=6). Wyniki uzyskane w materiale kontrolnym pozytywnym służyły jedynie do weryfikacji stosowanych w pracy przeciwciał na wykrywanie cytokin prozapalnych, białek z rodziny S100 oraz markerów komórek nacieków zapalnych (cząsteczki CD, tryptaza). Nie zostały poddane analizie ilościowej.

Materiał kontrolny pochodził z Prywatnej Praktyki Stomatologicznej (fragmenty dziąseł z przewlekłym zapaleniem przyzębia) oraz Katedry Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (odcynowe węzły chłonne).

Całość badań z wykorzystaniem skrawków parafinowych obejmowała:

1. Barwienie z zastosowaniem hematoksyliny i eozyny (H+E),
2. Reakcje immunocytochemiczne z użyciem przeciwciał mono- lub poliklonalnych na obecność zarówno fenotypów komórek nacieków zapalnych, jak i cytokin prozapalnych oraz białek z rodziny S100 (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Charakterystyka przeciwciał zastosowanych w pracy.

<b>Przeciwciało</b>	<b>Klon, kod lub nr białka w atlasie białek</b>	<b>Producent przeciwciał, zastosowane rozcieńczenie i typ przeciwciał</b>
<b>Anty-S100 (S100B)</b>	code No: Z 0311	DAKO, 1:400, królicze poliklonalne anty-ludzkie
<b>Anty-S100A8</b>	HPA024372	SIGMA-ALDRICH; 1:5000; królicze poliklonalne anty-ludzkie
<b>Anty-S100A9</b>	HPA004193	SIGMA-ALDRICH; 1:5000; królicze poliklonalne anty-ludzkie
<b>Anty-IL-1<math>\alpha</math></b>	klon 4414	R&D Systems, 1:100, mysie monoklonalne anty-ludzkie
<b>Anty-IL-6</b>	klon 6708.111	R&D Systems, 1:100, mysie monoklonalne anty-ludzkie
<b>Anty-TNF-<math>\alpha</math></b>	klon 2C8	R&D Systems, 1:50, mysie monoklonalne anty-ludzkie
<b>Anty-CD68</b>	klon PG-M1	DAKO, 1:100, mysie monoklonalne anty-ludzkie
<b>Anty-tryptase</b>	klon AA1	DAKOCytomation, 1:400, mysie monoklonalne anty-ludzkie
<b>Anty-CD3</b>	klon LN10	Novocastra Labs; 1:500, mysie monoklonalne anty-ludzkie
<b>Anty-CD8</b>	klon C8/144B	DAKOCytomation; 1:1; mysie monoklonalne anty-ludzkie
<b>Anty-CD4</b>	klon 4B12	DAKO; 1:80; mysie monoklonalne anty-ludzkie
<b>Anty-CD20</b>	klon LN10	Novocastra Labs; 1:200, mysie monoklonalne anty-ludzkie

### 2.3. Barwienie z zastosowaniem hematoksyliny i eozyiny (H+E)

Barwienie preparatów rutynową techniką H+E wykonano zgodnie z klasyczną procedurą opisaną w podręcznikach dotyczących technik histologicznych [30].

Klasycznej analizie histopatologicznej w mikroskopie świetlnym poddano wszystkie struktury obecne w preparacie, ze szczególnym uwzględnieniem elementów strukturalnych błony śluzowej. Szczególną uwagę zwracano na budowę nabłonka pż oraz na obecność wewnątrz nabłonkowych komórek nacieku zapalnego (m. in. komórki tuczne, makrofagi, granulocyty obojętnochłonne). W *lamina propria* oceniano rozmieszczenie nacieku zapalnego (ogniskowy, rozlany) i typ budujących go komórek (limfocyty, neutrofile, komórki tuczne, monocyty/makrofagi, eozynofile, inne), co dokładniej weryfikowały badania immunocytochemiczne.

### **2.3.1. Ocena intensywności nacieku zapalnego (*grading*) w ścianie pęcherzyka żółciowego**

Intensywność nacieku zapalnego określono w 4-stopniowej skali półilościowej, gdzie 3 punkty – oznaczały intensywny, w tym najczęściej rozlany naciek zapalny

oraz obecność grudek chłonnych samotnych lub liczniejszych; 2 punkty - średnio intensywny, ale także rozlany naciek zapalny; 1 punkt - pojedyncze rozproszone komórki nacieków zapalnych lub ułożone ogniskowo komórki nacieku; 0 punktów – tkanka pż, w których nie stwierdzano widocznych w mikroskopie świetlnym komórek nacieków zapalnych. Intensywność nacieku zapalnego oceniono osobno w samej *lamina propria* i określono go jako G1 (*grading* 1; 0-3) oraz w warstwie mięśniowej i surowiczej, który określono jako G2 (*grading* 2; 0-3). Sumą G1+G2 oznaczono całkowite nasilenie zmian zapalnych w ścianie pęcherzyka żółciowego.

### **2.3.2. Ocena półilościowa liczby eozynofili w ścianie pęcherzyka żółciowego**

W rutynowym barwieniu H+E szczególnie charakterystyczne i niekiedy bardzo liczne były eozynofile w naciekach zapalnych ściany pęcherzyka żółciowego i stąd poddano je analizie półilościowej z zastosowaniem arbitralnie przyjętej skali:

0 - brak widocznych eozynofili; 1 – do 10% komórek; 2 – 11-50 % komórek; 3 – 51-80% komórek; 4 – powyżej 80% komórek występujących w obrębie nacieków zapalnych w całej ścianie pż.

Oceny *grading* oraz liczby eozynofilów w ścianie pęcherzyka żółciowego pacjentów dokonano w mikroskopie Olympus BH-2 (pow. obiektywu 20x i 40x).

#### **2.4. Technika immunocytochemiczna ABC**

Do wykrywania i badania komórkowej lokalizacji białek markerowych komórek nacieku zapalnego, cytokin prozapalnych i białek S100 w błonie śluzowej pęcherzyków żółciowych wykorzystano klasyczną technikę ABC (strept(awidyna)-biotynyłowana peroksydaza) według opisu Hsu i wsp. [103].

Etapy reakcji immunocytochemicznej ABC były następujące: (1) odparafinowanie i nawodnienie preparatów w ksylenie i szeregu alkoholi o malejącym stężeniu (2x100%, 90%, 85%, 80%, 70%), płukanie w wodzie bieżącej - 10 min.; (2) blokowanie aktywności endogennej peroksydazy za pomocą 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w H<sub>2</sub>O destylowanej - 30 min. i płukanie w wodzie bieżącej - 10 min. oraz w wodzie destylowanej - 10 min.; (3) inkubacja w normalnej surowicy koziej (1:20, DAKO) - 30 min.; (4) inkubacja ze swoistymi przeciwciałami - 18 godz. w temperaturze 4<sup>o</sup>C, a następnie przez jedną godzinę w temperaturze pokojowej; (5) płukanie w roztworze soli fizjologicznej zbuforowanej fosforanami (PBS) - 3x3 min.; (6) inkubacja z biotynyłowanymi przeciwciałami (LSAB2, DAKO) - 20 min. i płukanie w PBS - 3x3 min.; (7) inkubacja z kompleksem streptawidyna - biotynyłowana peroksydaza (LSAB2, DAKO) - 20 min. i płukanie w PBS - 3x3 min.; (8) inkubacja z 3-3' diaminobenzzydynam (DAB, DAKO) - 7 min., płukanie w wodzie bieżącej - 10 min. i w wodzie destylowanej - 10 min.; (9) odwodnienie w szeregu alkoholi o wzrastającym stężeniu (70%, 85%, 90%, 95%, 2x100%) i ksylenie; (10) zamknięcie preparatów za pomocą balsamu kanadyjskiego i szkiełek nakrywkowych. Wybrane preparaty podbarwiano hematoksyliną (2 minuty), następnie płukano w wodzie bieżącej i destylowanej (10 minut) jako etap poprzedzający odwodnienie preparatów. Za każdym razem przeprowadzano również kontrolę negatywną polegającą na zastąpieniu swoistych przeciwciał przez surowice odpowiedniego gatunku w 0,05M Tris-HCl, pH~7,6 z dodatkiem 0,1% albumin bydlęcych (BSA) i 15mM azydku sodu.

Większość stosowanych w pracy swoistych przeciwciał (z wyjątkiem anti-S100B oraz anti-IL-1 $\alpha$ ) wymagała dodatkowego odsłaniania determinant

antygenowych. Polegało to na tym, że po odparafinowaniu i nawodnieniu, preparaty gotowano w 10mM buforze cytrynianowym w kuchence mikrofalowej o mocy 700W przez 18 min., płukano w PBS, a następnie przeprowadzano reakcję według standardowej procedury.

Podobnie jak obrazy preparatów histologicznych w barwieniu H+E, preparaty z uzyskaną reakcją przy użyciu metody immunocytochemicznej ABC, oceniano przy pomocy mikroskopu optycznego Olympus BH-2 z wbudowaną kamerą cyfrową. Rejestrowano i archiwizowano kolorowe obrazy mikroskopowe w powiększeniu obiektywu 40x (co najmniej 10 pól z każdego preparatu histologicznego danego pacjenta) o wielkości 2560x1920 pikseli przy użyciu programu komputerowego LUCIA Image 5\_0, zapisując je w formacie jpg. na dysku twardym komputera. W przypadku ekspresji immunocytochemicznej cytokin prozapalnych (IL- $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), badanych białek z rodziny S100, tryptazo-dodatnich komórek tucznych i CD68-dodatnich makrofagów (reakcja cytoplazmatyczna), dokumentowano obrazy mikroskopowe w obszarze błony śluzowej (nabłonek i *lamina propria*).

Ekspresja markerów fenotypowych komórek nacieków zapalnych (CD20, CD3, CD8, CD4) (reakcja błonowa) oceniana była w miejscach największych nasileń tych komórek („hot spot”) w ścianie całego pęcherzyka żółciowego, jednak wykluczano z oceny ilościowej reakcję w samotnych grudkach chłonnych. W przypadku oceny ilościowej tych komórek, ostateczny wynik z zastosowaniem techniki wizualizacji przestrzennej dotyczy także średniej z 10 pól widzenia pod powiększeniem obiektywu mikroskopu 40x.

Ocenie ilościowej poddano kolorowe obrazy z pozytywną reakcją immunocytochemiczną (metoda ABC). W sumie analizie ilościowej z zastosowaniem metody wizualizacji przestrzennej poddano 6490 obrazów. Wśród tych obrazów mikroskopowych, 4990 obejmowały obszar *lamina propria* z pozytywną cytoplazmatyczną reakcją na wykrywanie trzech cytokin prozapalnych, białek z rodziny S100, tryptazy oraz cząsteczki CD68. Kolejne 1500 obrazów dotyczyło pozytywnej reakcji błonowej na wykrywanie markerów limfocytów (CD20, CD3, CD8 i CD4) w całej ścianie pż. W razie nieobecności danego markera w materiale tkankowym (negatywna reakcja

immunocytochemiczna), nie wykonywano dokumentacji fotograficznej, a do analizy statystycznej podawano wartości zerowe dla takich chorych. Obrazy o wielkości 2560x1920 pikseli wykonane oryginalnie w programie LUCIA Image 5\_0 zostały skonwertowane do wielkości 640x480 pikseli do dalszej „obróbki”.

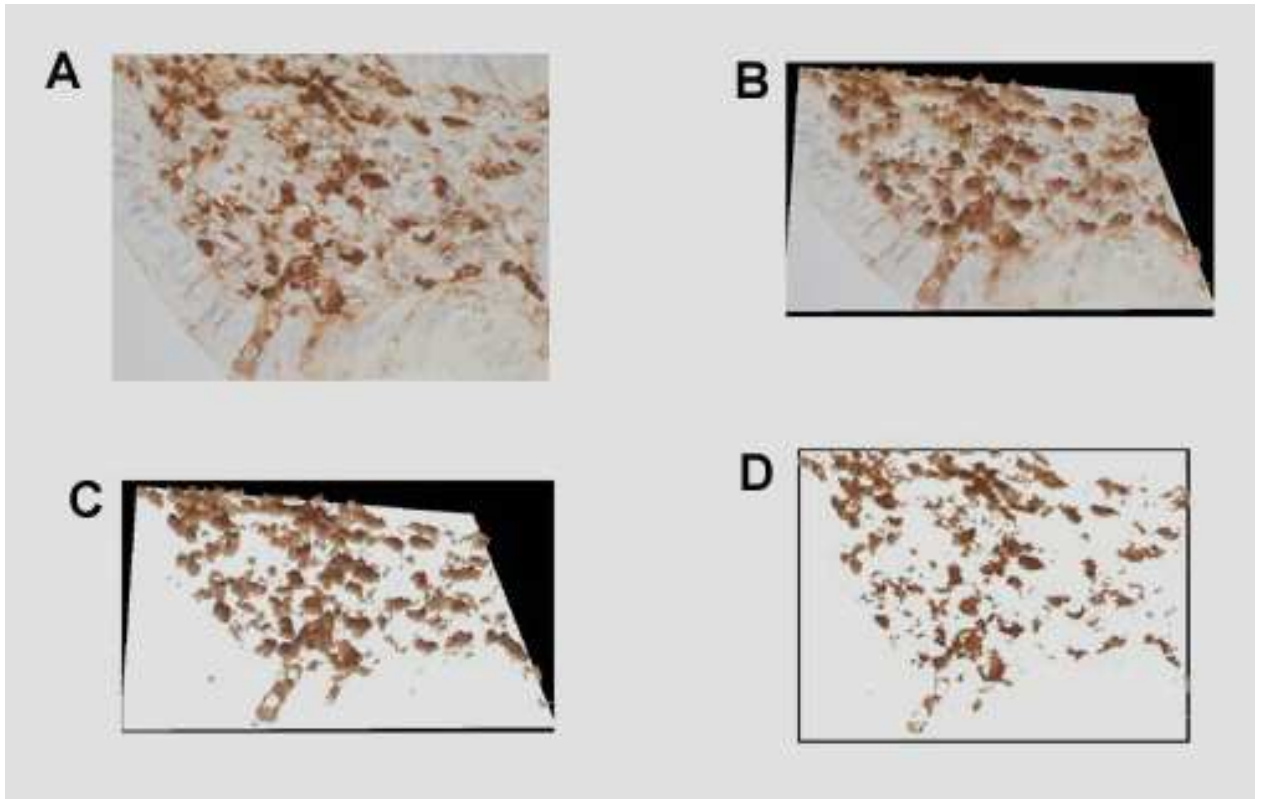
#### **2.4.1. Analiza ilościowa reakcji immunocytochemicznej z zastosowaniem metody wizualizacji przestrzennej**

Analiza morfometryczna została wykonana dzięki współpracy z Zakładem Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej Katedry Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (kierownik: prof. dr hab. med. Elżbieta Kaczmarek) z zastosowaniem metody opartej na wizualizacji przestrzennej ekspresji immunocytochemicznej markerów na obrazach mikroskopowych, opracowanej i wdrażanej do programu komputerowego A4D zaprogramowanego w języku C++ przez Strzelczyka [114]. Zastosowanie metodyki wizualizacji przestrzennej do obrazów mikroskopowych spowodowało zmianę płaskiego obrazu na trójwymiarowy z wykorzystaniem jego jasności jako trzeciej współrzędnej (współrzędnej przestrzennej). Na utworzonych w ten sposób obrazach przestrzennych, oprócz badanych obiektów, znajduje się wiele innych elementów, które należało usunąć do poziomu tła. W tym celu zastosowano trzy filtry: (1) **filtr jasności**, wybierający te elementy obrazu, których poziom jasności nie przekracza wyznaczonej wartości progowej z histogramu jasności, charakterystycznej dla analizowanej reakcji; (2) **filtr barwny**, w którym barwa zakodowana jest jako kąt o wartości od 0-360 stopni, zmieniając się od barwy czerwonej poprzez zieloną i niebieską, ponownie do czerwieni. Pozwala to wydzielić z obrazu reakcję barwną w odpowiednim kolorze, który jest mieszaniną trzech podstawowych kolorów w przetwarzaniu obrazów: czerwonego, zielonego i niebieskiego; (3) **filtr nasycenia**, który pozwala usunąć szare tło z obrazów kolorowych. Filtry te nie zmieniają zawartości oryginalnego obrazu, lecz jedynie maskują niepotrzebne elementy, np. artefakty powstałe na preparacie mikroskopowym. Dodatkowo za pomocą filtru wygładzającego mediany, zostały usunięte szумы wprowadzone przez niedoskonałość przetwornika kamery CCD używanej do rejestracji obrazów mikroskopowych.

W programie A4D obliczono w kolejności:

1. średnie pole powierzchni całej błony śluzowej na zarejestrowanym obrazie (w pikselach i  $\mu\text{m}^2$ ) u każdego pacjenta i całej grupy pacjentów,
2. średnie pole reakcji immunocytochemicznej konkretnego markera przypadające na pole powierzchni całej błony śluzowej (w pikselach i  $\mu\text{m}^2$ ) u każdego pacjenta i całej grupy pacjentów,
3. średnie pole reakcji immunocytochemicznej konkretnego markera przypadające na pole powierzchni całej błony śluzowej u każdego pacjenta i całej grupy pacjentów, przeliczano i określano także w procentach (%) (**Rycina 6**).

Wyniki uzyskane za pomocą programu wizualizacji przestrzennej A4D porównano z wynikami progowania kolorów w przestrzeni HSI uzyskanymi programem ImageJ (public domain, NHI, Bethesda, MD) zastosowanym do tych samych zdjęć. W tym celu zainstalowano do wersji podstawowej programu ImageJ wtyczkę Color Thresholder, dostępną na stronie internetowej <http://rsb.info.nih.gov/ij>. Błąd metody pomiaru ekspresji reakcji immunocytochemicznej szacowano na podstawie wartości błędu standardowego różnic między pomiarami wykonanymi na tych samych 250 obrazach mikroskopowych, ale dwoma różnymi technikami (A4D i ImageJ). Błąd standardowy średniej wartości pomiarów wynosi 97 pikseli, co stanowi 0,97% wartości średniego pola powierzchni ekspresji reakcji wyznaczonego metodą wizualizacji przestrzennej. Można więc przyjąć, że błąd metody nie przekracza 1%.



**Rycina 6.** Okna robocze programu A4D. Segmentacja progowa barwnej reakcji immunocytochemicznej (brązowy kolor) na przykładzie ekspresji białka S100A8 w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego u pacjenta z objawową kamica żółciową.

- A** – obraz uzyskany w mikroskopie świetlnym połączonym z kamerą cyfrową. Powiększenie obiektywu 40x. Technika ABC, podbarwienie jąder komórkowych hematoksyliną.
- B** – „uprzestrzennienie” płaskiego obrazu mikroskopowego (A)
- C** – wyodrębnienie (segmentacja) reakcji immunocytochemicznej na wykrywanie białka S100A8 z przestrzennego obrazu (C)
- D** – projekcja „uprzestrzennionej” reakcji na płaszczyznę jako ostateczny wynik automatycznej segmentacji obrazu immunocytochemicznego białka S100A8 do pomiaru jego powierzchni oraz udziału procentowego w polu błony śluzowej pęcherzyka żółciowego.



Wyniki uzyskane w obu programach analizy obrazów (LUCIA Image 5\_0 oraz A4D) eksportowano do formatu programu Microsoft Excel, który jest kompatybilny z programem Statistica PL v. 9, w celu przeprowadzenia analizy statystycznej.

W rozdziale „Wyniki” tej pracy przedstawiono wartości średniej ekspresji immunocytochemicznej danego markera wyrażone w % reakcji na całą błonę śluzową.

### **3. Metody statystyczne**

Obliczenia statystyczne wykonano dzięki współpracy z Zakładem Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej Katedry Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (kierownik: prof. dr hab. med. Elżbieta Kaczmarek).

W pierwszym etapie analizy statystycznej weryfikowano zgodność wszystkich uzyskanych wyników z rozkładem Gauss'a przy pomocy testu Shapiro-Wilka.. Następnie obliczono parametry statystyki opisowej (średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe, medianę oraz wartość minimalną i maksymalną). Wyniki porównywano w grupach ACC i CCC oraz podgrupach: młodzi vs. starsi pacjenci (zmiennie niepowiązane) z zastosowaniem testu Manna-Whitneya (test nieparametryczny dla zmiennych niepowiązanych dla dwóch grup). W przypadku zmiennych powiązanych zastosowano test Wilcoxon. Korelację Pearsona i rang Spearmana zastosowano do skojarzenia wartości zmiennych. Testem dla dwóch wskaźników struktury oceniano różnice między procentową wykrywalnością wybranych cech między grupami. Wyniki uznano za istotne statystycznie na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy programu Statistica PL v. 9.

### **4. Zagadnienia etyczne**

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu (21/09) z dnia 8 stycznia 2009 roku.

## WYNIKI

### 1. Analiza wybranych danych klinicznych

Wiek pacjentów z ostrym zapaleniem narządu (ACC) wahał się od 18 do 76 lat (średnia  $58,06 \pm 17,65$  lat), a grupy CCC od 16 do 51 lat (średnia  $31,6 \pm 13,52$  lat) (różnica statystycznie istotna). W grupie ACC zarówno kobiety, jak i mężczyźni byli starsi od pacjentów obojga płci w grupie CCC (**Tabela 3**). W obrębie grupy CCC - pacjenci do 25 r.ż. mieli średnią wieku  $21,60 \pm 2,5$ , a pacjenci starsi -  $49,10 \pm 1,21$ , co także dawało różnicę statystycznie istotną ( $p=0,0001$ ).

W grupie z ostrym zapaleniem pęcherzyka żółciowego liczba pacjentów z otyłością ( $BMI \geq 30$ ) wynosiła 6 (38%), w grupie z CCC natomiast 15 (27%). Nie była to znacząca różnica ( $p=0,3957$ ). Wartość BMI także nie różniła się istotnie pomiędzy pacjentami obu grup (ACC vs. CCC). Natomiast u pacjentów z przewlekłym zapaleniem pż, istotnie większe BMI wykazano u pacjentów starszych w porównaniu z młodszymi (**Rycina 7**). Nie było różnic płciowych w obrębie każdej z grup pacjentów w zakresie wartości indeksu masy ciała (**Tabela 3**).

W grupie pacjentów z przewlekłym zapaleniem pż dominowały kobiety (80%). W grupie ACC było 7 kobiet i 9 mężczyzn. Więcej pacjentów z grupy ACC w porównaniu z CCC miało nadciśnienie tętnicze jako chorobę współistniejącą (44% vs. 33%), ale nie była to różnica znamienne. Trzech pacjentów z grupy CCC, a 2 pacjentów z grupy ACC chorowało na cukrzycę (**Tabela 3**).

W grupie młodych chorych (do 25 r.ż.) z grupy CCC, u których stwierdzano nadwagę i/lub otyłość również występowało nadciśnienie tętnicze (poza jednym pacjentem). Nie było przypadków nadmiernego odchudzania się czy niedożywienia pacjenta, jako innych czynników ryzyka kamicy żółciowej.

Średnia liczba krwinek białych (WBC), wykonywana przed cholecystektomią w grupie z ostrym zapaleniem pęcherzyka żółciowego ( $13,84 \pm 4,48 \times 10^9/l$ ) była istotnie wyższa w porównaniu ze średnią liczbą WBC pacjentów z CCC ( $9,05 \pm 3,85 \times 10^9/l$ ). Porównując średnią wartość WBC u pacjentów młodszych

i starszych z CCC, również większą liczbę WBC mieli pacjenci starsi w porównaniu z młodszymi (**Tabela 4, Rycina 8**).

Średnia grubość ściany pęcherzyka żółciowego u pacjentów z CCC i ACC była podobna. Nie było również różnic płciowych w grubości ściany pęcherzyka żółciowego w obrębie każdej z grup ACC i CCC (**Tabela 3**). Podobnie nie było różnic istotnych w grubości ściany pż w obu podgrupach pacjentów (młodzi i starsi) w grupie CCC (**Tabela 4**).

Pacjenci z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego mieli istotnie więcej kamieni żółciowych w porównaniu z pacjentami z grupy ACC. Nie wykazano takich różnic pomiędzy młodszymi i starszymi pacjentami z podgrupy CCC ( $p=0,1824$ ) (**Tabela 4, Rycina 9**). Nie wykazano istotnych różnic w liczbie złogów żółciowych pomiędzy kobietami i mężczyznami w obrębie grup (ACC i CCC) (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Porównanie wybranych danych klinicznych pacjentów (kobiety/mężczyźni) z ostrym (ACC) i przewlekłym (CCC) zapaleniem pęcherzyka żółciowego.

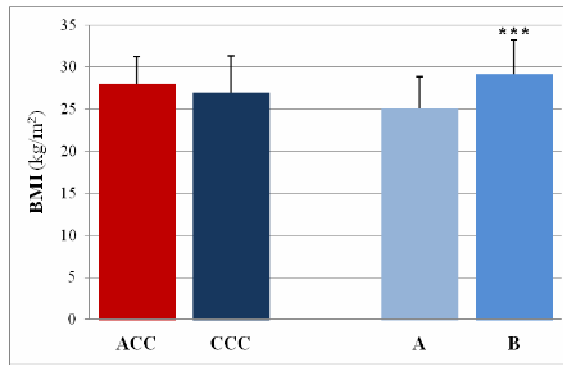
Cecha statystyczna		Grupa ACC (n=16)	Grupa CCC (n=55)	p testu
Wiek całej grupy (lata)		58,06±17,65	31,6±13,52	<b>0,0001</b>
Liczba pacjentów	♀	7 (44%)	44 (80%)	<b>0,0048</b>
	♂	9 (56%)	11 (20%)	<b>0,0048</b>
Wiek (lata)	♀	51,57±23,71	30,98±13,20	<b>0,0488</b>
	♂	63,11±9,87 <sup>NS</sup>	34,09±15,14 <sup>NS</sup>	<b>0,0001</b>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	♀	27,96±4,01	26,42±4,43	0,3901
	♂	27,96±2,84 <sup>NS</sup>	27,04±4,22 <sup>NS</sup>	0,5811
Liczba pacjentów z cukrzycą w całej grupie		2 (12,5%)	3 (0,05%)	<b>0,0193</b>
Liczba pacjentów z nadciśnieniem tętniczym w całej grupie		7 (44%)	18 (33%)	0,4183
Liczba złogów żółciowych*	♀	1,86±0,69	2,27±1,09	0,4765
	♂	1,44±0,53 <sup>NS</sup>	2,18±0,87 <sup>NS</sup>	0,0674
Grubość ściany pęcherzyka żółciowego (mm)	♀	5,86±1,42	5,61±2,01	0,4765
	♂	6,11±1,24 <sup>NS</sup>	5,50±2,21 <sup>NS</sup>	0,1119
Grading 1 (G1)*	♀	2,71±0,49	1,43±0,66	<b>0,0001</b>
	♂	1,89±0,78**	1,55±0,69 <sup>NS</sup>	0,3702
Grading 2 (G2)*	♀	2,86±0,38	1,82±0,69	<b>0,0008</b>
	♂	2,56±0,53 <sup>NS</sup>	2,09±0,54 <sup>NS</sup>	0,1308
Liczba eozynofiliów (skala półilościowa)	♀	1,71±0,95	0,57±0,73	<b>0,0046</b>
	♂	1,67±0,87 <sup>NS</sup>	1,00±1,10 <sup>NS</sup>	0,1754

**Objaśnienia:** W Tabeli podano wartości średnich±SD (odchylenie standardowe) i/lub parametry wyrażone liczbą przypadków z odsetkiem w nawiasie; p – poziom istotności; \* - parametry ocenione w skalach półilościowych (Materiał i Metody); \*\* - p=0,040 pomiędzy G1 u kobiet i mężczyzn w grupie ACC; NS – różnica nieistotna statystycznie pomiędzy wartością u kobiet i mężczyzn

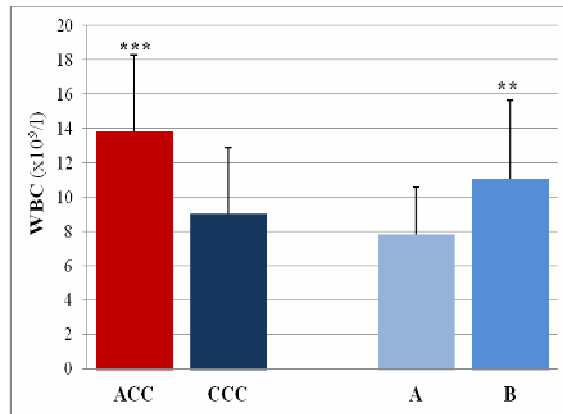
**Tabela 4.** Wybrane dane kliniczne i liczba eozynofiliów w naciekach zapalnych u pacjentów z ostrym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (ACC) i przewlekłym zapaleniem narządu (CCC).

Cecha	Grupa	n	Średnia	SD	Min.	Max.	p testu
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	ACC	16	27,96	3,28	22,49	33,44	0,2314
	CCC	55	26,54	4,35	18,53	34,19	
	<i>młodzi</i>	35	25,04	3,84	18,53	32,41	<b>0,0004</b>
	<i>starsi</i>	20	29,17	4,01	19,85	34,19	
Leukocyty (WBC; x10 <sup>9</sup> /l)	ACC	16	13,84	4,48	8,50	26,50	<b>0,0001</b>
	CCC	55	9,05	3,85	4,20	18,40	
	<i>młodzi</i>	34	7,83	2,78	4,20	16,30	<b>0,0079</b>
	<i>starsi</i>	20	11,11	4,55	5,20	18,40	
Grubość ściany pęcherzyka żółciowego (mm)	ACC	16	6,00	1,28	4,50	8,80	0,0975
	CCC	55	5,59	2,03	3,00	11,50	
	<i>młodzi</i>	35	5,63	2,07	3,00	11,50	0,8692
	<i>starsi</i>	20	5,51	2,02	3,00	10,00	
Liczba kamieni żółciowych*	ACC	16	1,63	0,62	1,00	3,00	<b>0,0460</b>
	CCC	55	2,25	1,04	1,00	4,00	
	<i>młodzi</i>	35	2,43	1,12	1,00	4,00	0,1824
	<i>starsi</i>	20	1,95	0,83	1,00	4,00	
Liczba eozynofiliów w naciekach zapalnych pęcherzyka żółciowego*	ACC	16	1,69	0,87	0,00	3,00	<b>0,0002</b>
	CCC	55	0,65	0,82	0,00	3,00	
	<i>młodzi</i>	35	0,86	0,91	0,00	3,00	<b>0,0373</b>
	<i>starsi</i>	20	0,30	0,47	0,00	1,00	

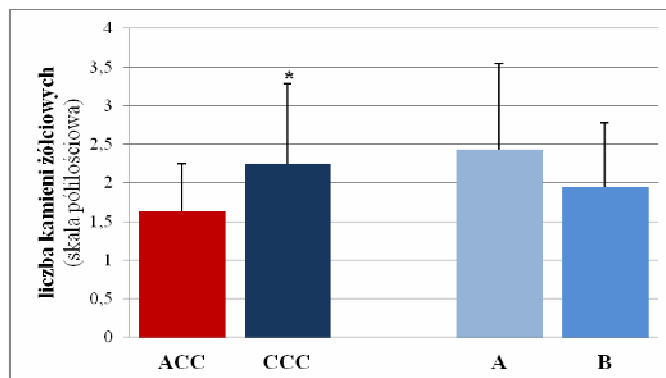
**Objaśnienia:** p – poziom istotności; \* - ocena w skali półilościowej (Materiał i Metody); czcionką wyboldowaną zaznaczono różnice statystycznie istotne



**Rycina 7.** Porównanie wartości **BMI** u pacjentów z ostrym (ACC) i przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (CCC) oraz w grupie pacjentów do 25 r.ż. (A) i 50-latków (B) z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (CCC); \*\*\*-p=0,0004



**Rycina 8.** Porównanie liczby **leukocytów** (WBC) we krwi w chwili przyjęcia do szpitala u pacjentów z ostrym (ACC) i przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (CCC) oraz w grupie pacjentów do 25 r.ż. (A) i 50-latków (B) z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (CCC); \*\*- p=0,0079; \*\*\*- p=0,0001.



**Rycina 9.** Porównanie liczby **złogów żółciowych** u pacjentów z ostrym (ACC) i przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (CCC) oraz w grupie pacjentów do 25 r.ż. (A) i 50-latków (B) z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (CCC); \*- p=0,0460

## 2. Badanie histopatologiczne

### 2.1. Zmiany morfologiczne w ostrym zapaleniu pęcherzyka żółciowego (grupa ACC)

W grupie z ostrym zapaleniem pęcherzyka żółciowego, analizowanej w ramach obecnej pracy zebrano 16 pacjentów. Wśród pacjentów młodych do 25 r.ż. rozpoznanie ostrego zapalenia pęcherzyka żółciowego postawiono tylko u dwóch pacjentek. U jednej z nich rozpoznano ropne, u drugiej – zgorzelinowe *cholecystitis*. U pozostałych pacjentów z grupy ACC, u 8/14 pacjentów rozpoznano *cholecystitis gangrenosa*, u 3/14 *cholecystitis partim gangrenosa*, u 3/14 -cechy *cholecystitis purulenta* (u 2 z nich – *cholecystitis partim purulenta*).

Zmiany histologiczne w pęcherzykach żółciowych u pacjentów z grupy ACC przedstawiono na mikrofotografiach **(A-H)** zebranych w **Tablicę 1**.

W błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego u tych pacjentów obserwowano zmiany zarówno w samym nabłonku, jak i w strukturach blaszki właściwej błony śluzowej (*lamina propria*). Błona śluzowa często była obrzęknięta z widocznymi strawionymi przez neutrofile komórkami nabłonka i/lub obfitymi naciekami z tych komórek zlokalizowanymi tuż pod nabłonkiem **(A)**. Choć nie można było potwierdzić tego we wszystkich przypadkach w rutynowym barwieniu H+E, uszkodzenia dotyczyły najprawdopodobniej także błony podstawnej. Odczyn regeneracyjny nabłonka były również widoczne i w większości bardzo nasilone **(B)**. Poza neutrofilami pomiędzy komórkami nabłonka obserwowano także inne komórki „zapalenia”, takie jak: monocyty/makrofagi, komórki dendrytyczne, komórki tuczne oraz pojedyncze limfocyty **(C)**.

Błaszczkę właściwą błony śluzowej cechował rozrost komórek zrębu, co dawało poszerzenia zrębu „kosmkowatych” uwypukleń błony śluzowej. „Kosmkowate” uwypuklenia błony śluzowej często były bardzo dobrze unaczynione, z obecnością licznych wylewów krwawych. Co ciekawe u niektórych pacjentów, *lamina propria* była nacieczona także limfocytami **(C)** oraz licznymi eozynofilami **(D)**. Między tymi komórkami obserwowano także duże monocyty i proliferujące fibroblasty. Eozynofile jako komórki nacieków zapalnych występowały

### Tablica 1.

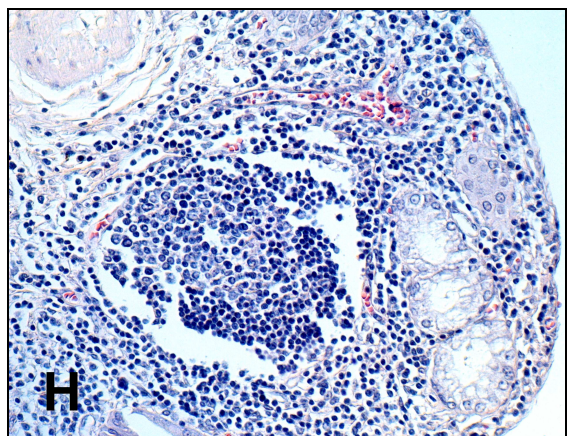
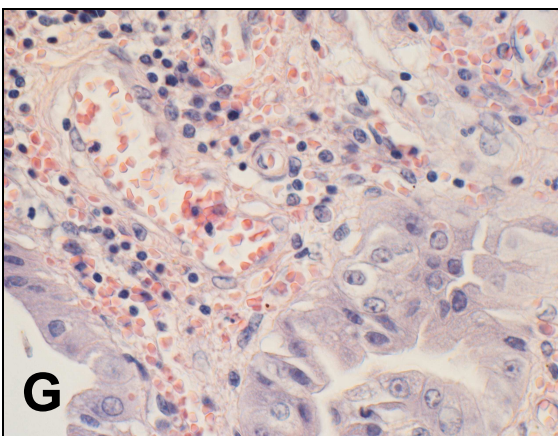
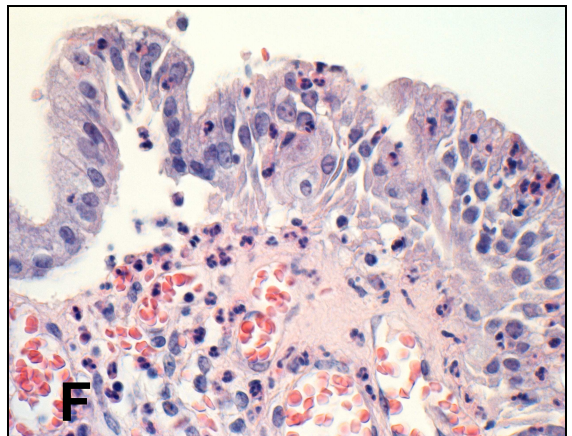
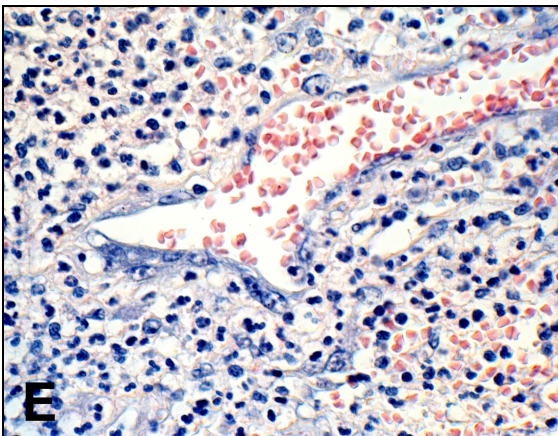
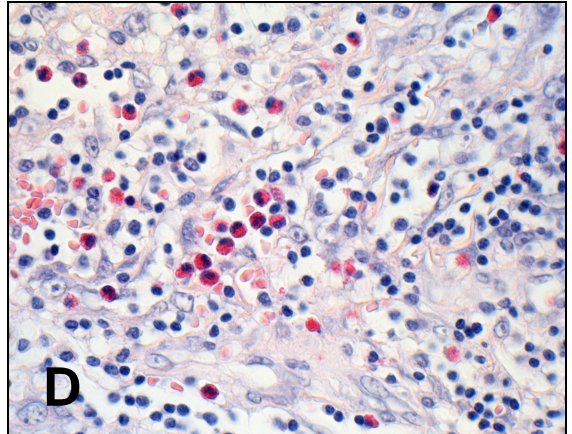
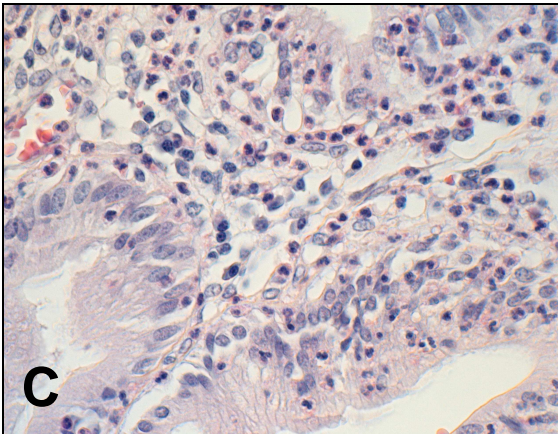
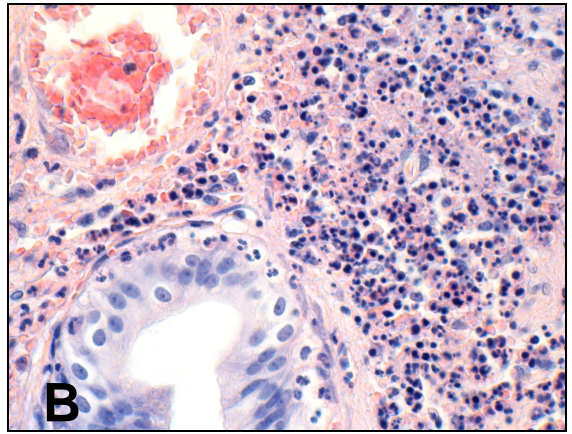
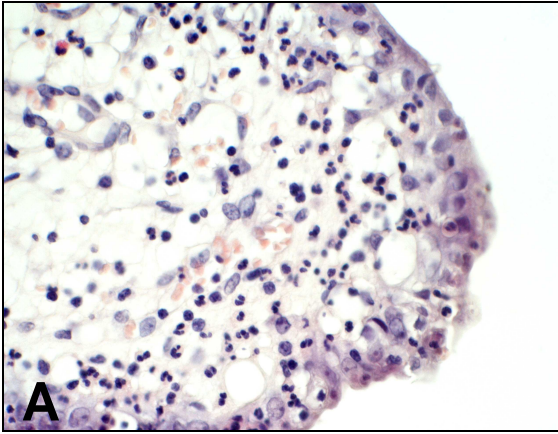
#### Zmiany morfologiczne w ostrym kamiczym zapaleniu pęcherzyka żółciowego (grupa ACC).

Rutynowe barwienie histologiczne (H+E).

Powiększenie obiektywu x40 **(A-G)**, x20 **(H)**.

Fragment obrzękniętej błony śluzowej pęcherzyka żółciowego z częściowo strawionymi przez neutrofile komórkami nabłonka **(A)**. Obfite nacieki zapalne leukocytarne i martwica w *lamina propria* **(B)**. Oprócz neutrofilów, makrofagów **(A, B)**, limfocytów **(C)**, obecne także liczne eozynofile **(D)**. W błonie mięśniowej i surowiczej nacieki zapalne złożone głównie z neutrofilów i limfocytów, często w pobliżu naczyń **(E)**. Obecne także fragmenty znacznie uszkodzonego nabłonka pęcherzyka żółciowego, niekiedy z oderwanymi komórkami. Cechy proliferacji drobnych naczyń **(F)**. Liczne naczynia krwionośne, cechy przekrwienia i krwinkotoki w *lamina propria* **(B, E-G)**. Samotne grudki chłonne, obecne zarówno w *lamina propria*, jak i w głębszych warstwach ściany pż **(H)**.



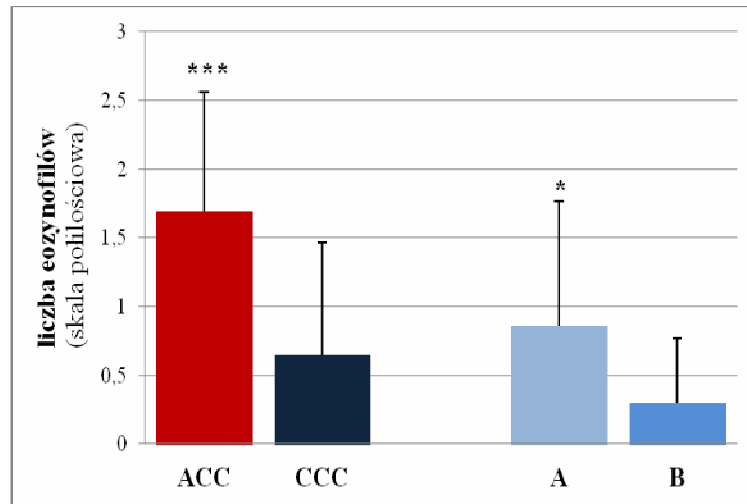


w zróżnicowanej liczbie w zależności od pacjenta, od pojedynczych do bardzo licznych, najczęściej położonych ogniskowo **(D)**. W błonie mięśniowej i surowiczej – nacieki zapalne złożone były głównie z neutrofilów i ogniskowo położonych limfocytów **(E)**. Nacieki zapalne obecne były często w okolicy naczyń krwionośnych, podobne co do składu komórkowego do tych w *lamina propria*, choć rzadziej wśród nich obserwowano neutrofile i/lub eozynofile. Naczynia żyłne o cechach żyłek pozawłosowatych z wysokim śródbłonkiem (ang. *high endothelial venules*, HEVs) w całym zebranym materiale tkankowym z ACC nie były zbyt liczne. Nieliczne HEVs obecne były niekiedy tuż pod nabłonkiem pęcherzyka żółciowego, choć częściej w głębszych warstwach ściany pż.

W pż z cechami *cholecystitis gangraenosa* obserwowano fragmenty znacznie uszkodzonego nabłonka pęcherzyków żółciowych, niekiedy z oderwanymi komórkami **(F)** i nasilonym odczynem regeneracyjnym w obrębie tych komórek **(G)**. Widoczne były również duże pola martwicy w obrzękniętej błonie śluzowej wraz z obfitymi naciekami leukocytarnymi. W ścianie pęcherzyka żółciowego obserwowano także tworzące się mikroropnie lub tworzące bardziej nasilone ogniska ropne. Obserwowano proliferację licznych drobnych naczyń krwionośnych i krwinkotoki **(G)**. Tkanka łączna błony surowiczej również wykazywała cechy przekrwienia i wylewów krwawych. Z krwinek białych, w świetle naczyń najczęściej widoczne były neutrofile. Obserwowano także samotne grudki chłonnne, zarówno w *lamina propria*, jak i w głębszych warstwach ściany pż **(H)**.

Średnia liczba eozynofiliów w grupie pacjentów z ACC wynosiła  $1,69 \pm 0,87$  i była ona istotnie wyższa w porównaniu z pacjentami z przewlekłym zapaleniem narządu ( $0,65 \pm 0,82$ ) **(Tabela 4, Rycina 10)**. Określając różnice płciowe w liczbie eozynofiliów w obu grupach chorych, nie obserwowano różnic ilościowych w liczbie eozynofiliów pomiędzy kobietami i mężczyznami. Natomiast istotnie więcej tych komórek wykazano u kobiet z grupy ACC ( $1,7 \pm 0,95$ ) w porównaniu z kobietami z grupy CCC ( $0,57 \pm 0,73$ ) ( $p=0,0046$ ). Nie było takich różnic pomiędzy odpowiednimi grupami mężczyzn **(Tabela 3)**. W samej grupie CCC, istotnie więcej eozynofiliów wykazano u pacjentów do 25

r.ż. ( $0,86\pm 0,91$ ) w porównaniu z grupą 50-latków ( $0,30\pm 0,47$ ) ( $p=0,0373$ ) (Tabela 4, Rycina 10).



**Rycina 10.** Porównanie liczby **eozynofiliów** w ścianie pęcherzyka żółciowego u pacjentów z ostrym (ACC) i przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (CCC) oraz w grupie pacjentów do 25 r.ż. (A) i 50-latków (B) z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (CCC); \*-  $p=0,0373$ ; \*\*\*-  $p=0,0002$

## 2.2. Zmiany morfologiczne pęcherzyka żółciowego w przewlekłym zapaleniu pęcherzyka żółciowego (grupa CCC)

Reprezentatywne zmiany histologiczne w pęcherzykach żółciowych u pacjentów z obu podgrup CCC pokazano na mikrofotografiach (A-H) zebranych w **Tablicę 2**.

### 2.2.1. Pacjenci do 25 roku życia

U 35 pacjentów z tej podgrupy chorych w rutynowym barwnieniu H+E materiału pooperacyjnego pż rozpoznano przewlekłe zapalenie pęcherzyka żółciowego (*cholecystitis chronica*, CCC), które potwierdzono w ramach obecnej pracy. (przykładowe mikrofotografie: **A-C**).

U większości pacjentów obserwowano niezmienny (morfologicznie prawidłowy) nabłonek jednowarstwowy walcowaty, pokrywający blaszkę

właściwą błonę śluzową pęcherzyka żółciowego (**A**). Cała błona śluzowa tworzyła charakterystyczne dla pęcherzyka żółciowego, uwypuklenia do światła narządu. Nabłonek fragmentarycznie pokryty był śluzem, a jedynie w pojedynczych przypadkach obserwowano złuszczenie się komórek do światła pęcherzyka żółciowego. U jednego pacjenta płci męskiej w obrębie nabłonka obserwowano pojedyncze komórki kubkowe (cechy metaplastyki jelitowej) oraz kilka ognisk hiperplazji gruczołów cewkowo-pęcherzykowych (cechy metaplastyki oddźwiernikowej) z wnikaniem ich w głębsze warstwy ściany pż pomiędzy mięśniówką (rozrost gruczołowo-mięśniowy). Komórki nabłonka spoczywały z reguły na niezmiennych błonach podstawnych, choć dokładna ocena tych struktur nie była możliwa na poziomie mikroskopu świetlnego i rutynowego barwienia. Obserwowano pojedyncze komórki nabłonka o kształcie sześciennym lub płaskim. Cechy te uznano za wzmożony odczyn regeneracyjny nabłonka. Nie obserwowano typowych cech dysplazji nabłonka w żadnym pęcherzyku żółciowym tej grupy pacjentów.

Zachyłki Rokitansky'ego-Aschoffa z wgłębieniami do błony mięśniowej, obserwowane były u 9/35 (26%) chorych.

Tkanka łączna *lamina propria* tworzyła z reguły silnie unaczyniony zrąb „kosmkowy” pod nabłonkiem, w nielicznych przypadkach z rozrostem komórek właściwych tkanki łącznej. Miała typową budowę dla tego typu tkanki łącznej niekiedy z silnie rozbudowaną siecią naczyń krwionośnych. Niektóre z naczyń odpowiadały w strukturze żyłkom postkapilarnym z wysokim śródbłonkiem (HEVs), jednak nie były one zbyt liczne.

W *lamina propria* obserwowano zmienne w liczbie i rodzaju komórki nacieków zapalnych. Najczęściej były to limfocyty, komórki tuczne, eozynofile i monocyty/makrofagi. Widoczne były również pojedyncze granulocyty obojętnochłonne (**B**).

U 7/35 (20%) pacjentów w ścianie pż występowały samotne grudki chłonne, ale u pięciu pacjentów z tej grupy lokalizowały się w samej *lamina propria*, a u dwóch pozostałych w głębszych warstwach ściany pż. U 10/35 pacjentów (28%) zaobserwowano eozynofile jako dominujący typ komórek nacieku zapalnego (≥80% komórek w nacieku zapalnym, 4 punkty w skali półilościowej)

**(C).** U dwóch chorych w *lamina propria* obserwowano nieliczne komórki ksantomatyczne z jasną cytoplazmą, będące makrofagami obciążonymi lipidami (cholesterolem) tzw. lipofagi (ang. *foamy cells*), które zlokalizowane były tuż pod nabłonkiem. Nacieki zapalne o podobnym składzie komórkowym jak w *lamina propria*, obecne były także w pozostałych warstwach ściany pęcherzyka żółciowego, szczególnie w błonie mięśniowej. Często zlokalizowane były okołonaczyniowo.

W *lamina propria* obserwowano także pojedyncze gruczoły śluzowe cewkowo-pęcherzykowe (jasnokomórkowe) u 15/35 badanych (43% badanych). Przerost tych gruczołów z tzw. rozrostem gruczołowo-mięśniowym obecny był u dwóch pacjentów z tej podgrupy (5,7%), w tym u jednego z jednoczesną obecnością komórek kubkowych w nabłonku pż.

Jak wspomniano pacjenci do 25 r.ż. mieli istotnie większą liczbę eozynofiliów w naciekach zapalnych w ścianie pęcherzyka żółciowego w porównaniu z pacjentami starszymi (**Rycina 10**).

### **2.2.2. Pacjenci starsi (średnia wieku około 50 lat)**

Analiza w ramach obecnej pracy potwierdziła rozpoznanie histopatologiczne przewlekłego zapalenia pęcherzyka żółciowego (CCC) u wszystkich 20 pacjentów z tej podgrupy. Zmiany morfologiczne w pż tej podgrupy chorych przedstawiono na mikrofotografiach **D-H** zebranych w **Tablicę 2**.

Choć w większości przypadków nabłonek pęcherzyka żółciowego miał typową morfologię i składał się z jednej warstwy komórek walcowatych, częściej niż u młodych pacjentów, obserwowano fragmenty atroficznego i/lub regeneracyjnego nabłonka. U 4/20 pacjentów (20%) obserwowano cechy metaplastyki jelitowej nabłonka (obecność zmiennej liczby komórek kubkowych) **(D)**. Częściej w porównaniu z grupą młodych pacjentów, obserwowano ogniskowe odwarstwienia komórek nabłonka i ich złuszczenie do światła pęcherzyka żółciowego. Wewnątrz nabłonkowe nacieki z komórek jednojądrzastych (głównie neutrofilów oraz limfocytów) obserwowano dość

## Tablica 2.

### Zmiany morfologiczne w przewlekłym kamicznym zapaleniu pęcherzyka żółciowego (grupa CCC).

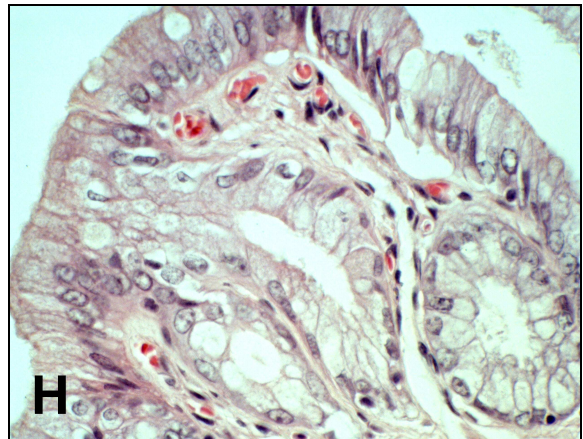
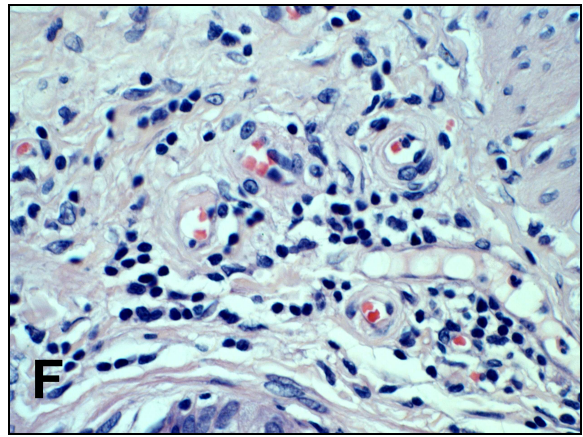
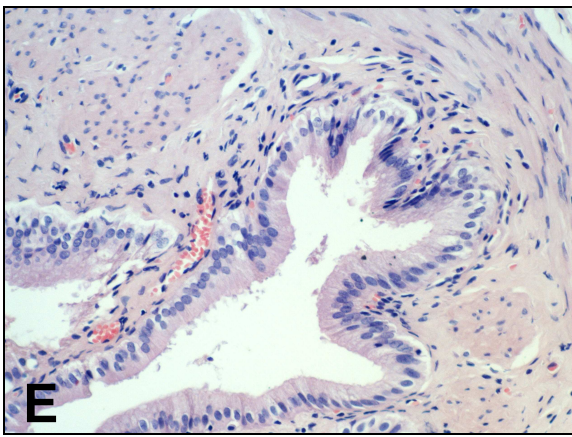
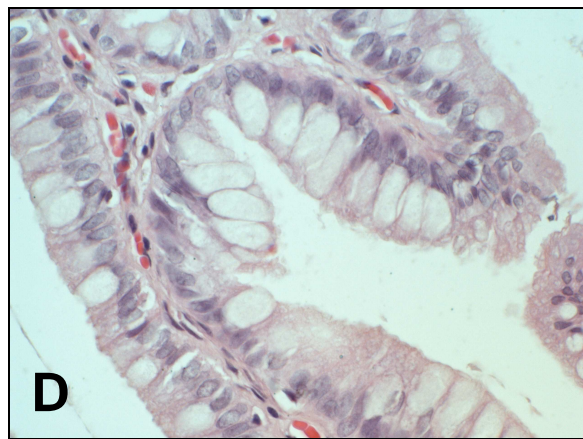
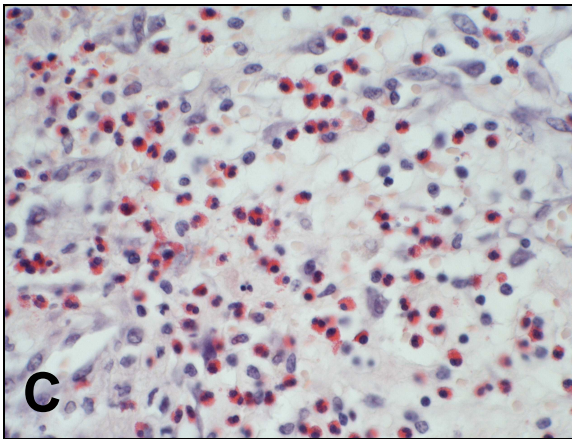
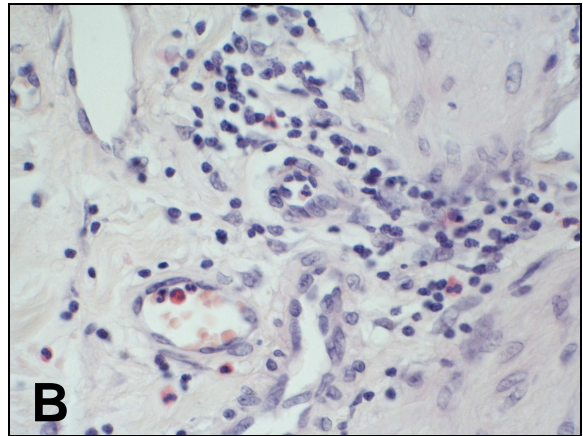
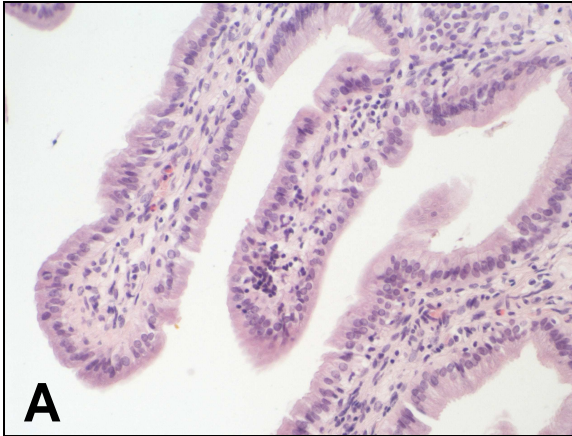
Rutynowe barwienie histologiczne (H+E).

Powiększenie obiektywu x40.

**(A-C)** Fragmenty pęcherzyka żółciowego u pacjentów do 25 r.ż.

**(D-H)** Fragmenty pęcherzyka żółciowego u pacjentów ok. 50 r.ż.

Morfologicznie prawidłowy nabłonek jednowarstwowy walcowaty pokrywający blaszkę właściwą błony śluzowej pęcherzyka żółciowego **(A)**. Nacieki zapalne (limfocyty, monocyty/makrofagi, komórki tuczne i eozynofile) w *lamina propria* **(B)**. Eozynofile jako dominujący typ komórek nacieku zapalnego **(C)**. Cechy metaplazji jelitowej nabłonka pęcherzyka żółciowego (obecność komórek kubkowych) **(D)**. Pogłębione zachyłki Rokitansky'ego-Aschoffa i cienka *lamina propria* **(E)**. Naczynia tętnicze o małej średnicy z wyraźnie pogrubiałą ścianą (zmiany miażdżycowe) **(F)**. Podnabłonkowe pole zbudowane z makrofagów obciążonych lipidami (komórki piankowate, ang. *foamy cells*) **(G)**.



rzadko. Niezmienione komórki nabłonka oraz te z widocznymi cechami patologii, spoczywały z reguły na prawidłowych błonach podstawnych.

Pogłębione zachyłki Rokitansky'ego-Aschoffa obserwowane były u wszystkich, z wyjątkiem dwóch pacjentów (90%) **(E)**.

Tkanka łączna *lamina propria* tworzyła pod nabłonkiem silnie unaczyniony zrąb. Fragment ten cechowała znaczna fibroplazja i/lub obrzęk. Rozbudowana była sieć naczyń krwionośnych różnego kalibru. Naczynia włosowate cechowały się z reguły prawidłową budową. Częste były naczynia tętnicze o małej średnicy z wyraźnie pogrubiałą ścianą (zmiany miażdżycowe). Odpowiadały one naczyniom typowym dla przewlekłych procesów zapalnych i występowały u większości chorych. Cecha ta była najbardziej charakterystyczną cechą morfologiczną dotyczącą zmian w unaczynieniu *lamina propria* tej grupy pacjentów **(F)**. Pojedyncze z tych naczyń miały zamknięte światło (w tym przez zakrzepy), co dawało obszary niedokrwienia. Kilku pacjentów miało wszystkie naczynia tętnicze w *lamina propria* nieprawidłowe, z ewidentnie pogrubiałą ścianą i widoczną ich kolagenizacją. Część z naczyń krwionośnych stanowiły HEVs, które obserwowano u 4/20 pacjentów (20%).

Cechą *lamina propria* dużej grupy pacjentów starszych były nacieki z makrofagów obciążonymi lipidami (cholesterolem) (ang. *foamy cells*), tworzące niekiedy całe pola pod nabłonkiem (cholesteroliza pęcherzyka żółciowego) **(G)**. Szczególnie obfite nacieki zbudowane z makrofagów (tworzące tzw. polipy cholesterolowe) obserwowano u 6/20 pacjentów (30%). Limfocyty jako komórki nacieku zapalnego (rzadsze niż makrofagi) zlokalizowane były zarówno pod nabłonkiem, jak i w głębiej położonych warstwach *lamina propria*, często także dookoła naczyń krwionośnych **(H)**. Samotne grudki chłonne obserwowano w błonie śluzowej u 8/20 (40%) pacjentów. W odróżnieniu od grupy poprzedniej, u pacjentów starszych obserwowano raczej pojedyncze eozynofile w składzie nacieków zapalnych (poza jednym pacjentem). Nacieki zapalne zbudowane w przewodzie z limfocytów i monocytów, podobnie jak u młodych chorych, obserwowano także w pozostałych warstwach ściany pęcherzyka żółciowego. Widoczna była również proliferacja komórek tkanki łącznej i cechy neoangiogenezy



z proliferacją komórek *endothelium*. U 45% pacjentów w *lamina propria* obserwowano w większości pojedyncze gruczoły śluzowe cewkowo-pęcherzykowe. U pięciu pacjentów (25%) obserwowano cechy hiperplazji gruczołów jasnokomórkowych w *lamina propria*, wśród których u dwóch z nich można było uwidocznić cechy rozrostu gruczołowomięśniowego (ogniska metaplazji nabłonka typu odźwiernikowego) z jednoczesną obecnością ognisk licznych komórek kubkowych w nabłonku pż (metaplazja jelitowa).

Zarówno u młodych pacjentów, jak i u 50-latków z kamicą żółciową obserwowano niekiedy złogi żółciowe w świetle pęcherzyka lub w obrębie zachyłków Rokitansky'ego-Aschoffa.

## 2.3. Analiza półilościowa nasilenia zmian zapalnych (*grading*) w ścianie pęcherzyka żółciowego

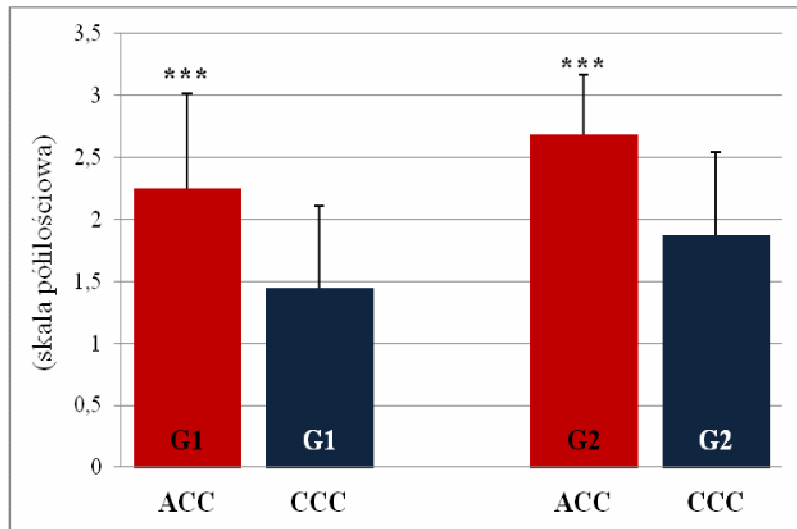
### 2.3.1. Porównanie aktywności zapalnej u pacjentów z grupy ACC i CCC

Średnie nasilenie zmian zapalnych (*grading*) w *lamina propria* (G1) u pacjentów z ACC było istotnie wyższe w porównaniu z grupą CCC. Obserwowano także istotne różnice w nasileniu zmian zapalnych w głębszych warstwach ściany pęcherzyka żółciowego (G2) oraz sumarycznym *grading* (G1+G2) pomiędzy grupami (większe w grupie z ostrym *cholecystitis*) (Tabela 5, Rycina 11).

**Tabela 5.** Analiza porównawcza nasilenia zmian zapalnych (*grading*) w grupie ACC i CCC (test Manna-Whitneya).

Cecha statystyczna	Grupa	n	Średnia	SD	Mediana	Moda	Liczność mody	Min.	Max.	p testu
<b>Grading 1 (G1)*</b>	ACC	16	2,25	0,77	2	3	7	1	3	<b>0,0010</b>
	CCC	55	1,45	0,66	1	1	29	0	3	
<b>Grading 2 (G2)*</b>	ACC	16	2,69	0,48	3	3	11	2	3	<b>0,0001</b>
	CCC	55	1,87	0,67	2	2	30	1	3	
<b>Całkowity Grading (G1+G2)*</b>	ACC	16	4,94	1,06	5	6	6	3	6	<b>0,0001</b>
	CCC	55	3,33	1,07	3	3	21	2	6	

**Objaśnienia:** \* - parametry oceniane w skali półilościowej (patrz Materiał i Metody); p – poziom istotności; SD – odchylenie standardowe; n – liczba pacjentów; czcionką wyboldowaną zaznaczono różnice statystycznie istotne



**Rycina 11.** Porównanie aktywności zapalnej (*grading*, **G**) w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego (G1) oraz w głębszych warstwach ściany pż (G2) u pacjentów z ostrym (ACC) i przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (CCC).

### 2.3.2. Porównanie wartości *grading* u pacjentów młodszych i starszych w obrębie grupy CCC

Porównując nasilenie zmian zapalnych w obrębie samej grupy CCC pomiędzy młodszymi i starszymi pacjentami, nie wykazano istotnych różnic w aktywności zapalnej (*grading*) ani w samej błonie śluzowej, ani w głębszych warstwach ściany pęcherzyka żółciowego (**Tabela 6**).

**Tabela 6.** Analiza porównawcza nasilenia zmian zapalnych (*grading*) w grupie młodszych (do 25 r.ż.) i starszych pacjentów z CCC (test Manna-Whitneya).

Cecha statystyczna	Grupa CCC	n	Średnia	SD	Mediana	Moda	Liczność mody	Min.	Max.	p testu
<b>Grading 1 (G1)*</b>	młodszy	35	1,40	0,60	1	1	20	0	3	0,5039
	starszy	20	1,55	0,76	1,5	1	9	0	3	
<b>Grading 2 (G2)*</b>	młodszy	35	1,80	0,68	2	2	18	1	3	0,3346
	starszy	20	2,00	0,65	2	2	12	1	3	
<b>Całkowity Grading (G1+G2)*</b>	młodszy	35	3,20	0,96	3	3	14	2	5	0,3802
	starszy	20	3,55	1,23	3	3	7	2	6	

**Objaśnienia:** \* - parametry oceniane w skali półilościowej (patrz Materiał i Metody); p – poziom istotności; SD – odchylenie standardowe; n – liczba pacjentów

Biorąc pod uwagę różnice płciowe w aktywności zapalnej (*grading*) różnych warstw ściany pęcherzyka żółciowego, większe nasilenie zmian zapalnych w błonie śluzowej (parametr G1) wykazano u kobiet z grupy ACC w porównaniu z kobietami z grupy CCC. Podobnie istotnie większa była aktywność zapalna w głębszych warstwach ściany pęcherzyka żółciowego (mięśniówka, surowicówka) (G2) u kobiet z ostrym zapaleniem pęcherzyka żółciowego w porównaniu z przewlekłym zapaleniem narządu (**Tabela 3**).

### 3. Analiza komórkowej ekspresji wybranych cytokin prozapalnych

Przedstawione wyniki badań nad ekspresją trzech cytokin prozapalnych uzyskano przy użyciu klasycznej immunocytochemicznej techniki ABC. Dodatkowo odślaniano determinanty antygenowe poprzez wcześniejsze gotowanie preparatów w kuchence mikrofalowej w roztworze buforu cytrynianowego. Preparaty oceniano bezpośrednio w mikroskopie świetlnym OLYMPUS BH2, w powiększeniu obiektywu 40x i oszacowano ilościowo z wykorzystaniem techniki wizualizacji przestrzennej (Materiał i Metody).

Dla porównania jakościowych odczynów immunocytochemicznych na badane cytokiny prozapalne, wykonano badania kontrolne w materiale tkankowym uzyskanym z dziąseł pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia oraz odczynowych węzłów chłonnych (kontrola pozytywna).

#### 3.1. Lokalizacja komórkowa interleukiny 1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ )

Komórkową ekspresję IL-1 $\alpha$  analizowano w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego od 16 pacjentów z grupy ACC i 55 pacjentów z grupy CCC. Wykazano pozytywną ekspresję o zmiennym nasileniu u wszystkich pacjentów (100%) niezależnie od grupy chorych.

Przykładowe mikrografie **(A-H)** z immunocytochemiczną lokalizacją interleukiny 1 $\alpha$  przedstawiono w **Tablicy 3**.

Ekspresja dotyczyła cytoplazmy komórek i manifestowała się reakcją barwną o zróżnicowanym nasileniu. Komórkami immunopozytywnymi były zarówno komórki nabłonka pęcherzyka żółciowego **(A)**, jak i komórki nacieku zapalnego zlokalizowane w *lamina propria*, niekiedy tuż pod nabłonkiem **(B)**. Ekspresja IL-1 $\alpha$  w blaszce właściwej błony śluzowej dotyczyła głównie monocytów/makrofagów, ale najprawdopodobniej również limfocytów **(C)** oraz komórek *endothelium* naczyń **(D)**. Szczególnie nasilona reakcja dotyczyła makrofagów, rozsianych w *lamina propria* pęcherzyka żółciowego lub skupionych pod nabłonkiem pod postacią *foamy cells* u kilku pacjentów z grupy CCC **(E)**. W obu grupach pacjentów dominowała jednak obecność tej cytokiny

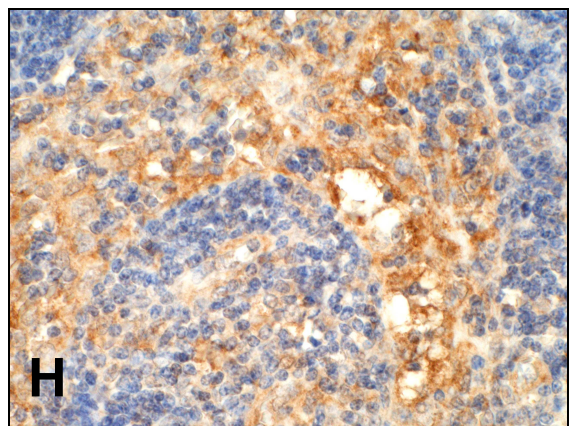
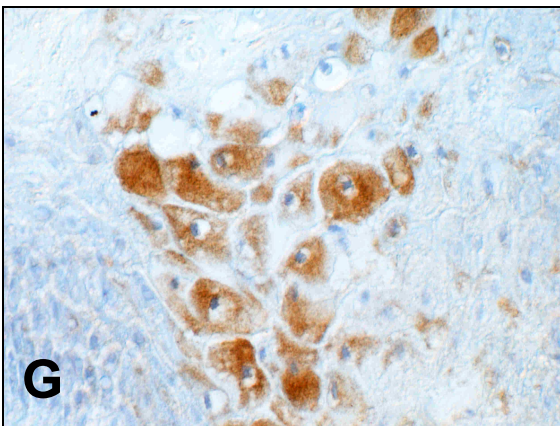
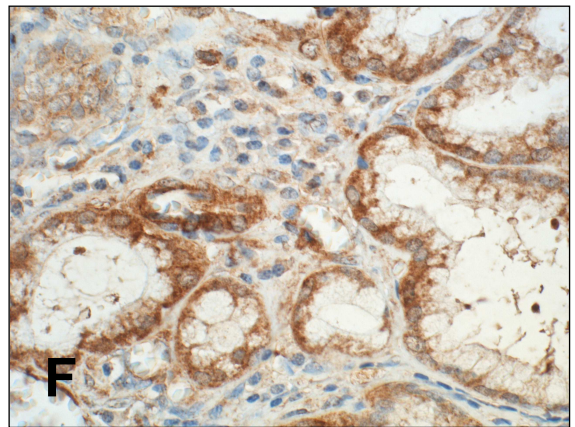
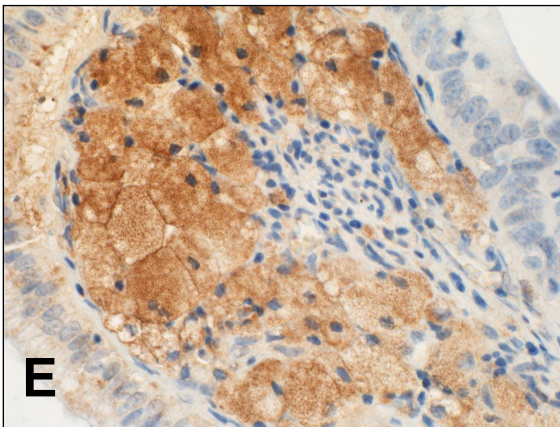
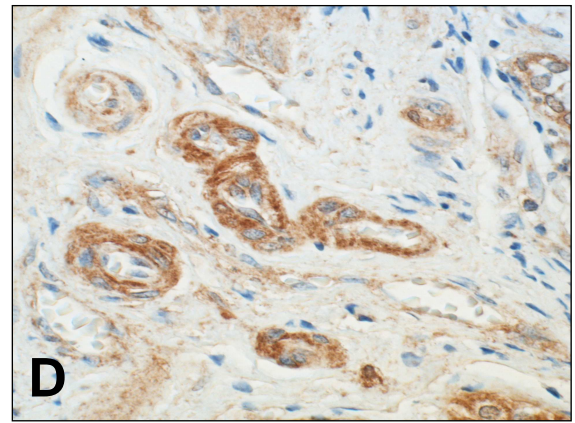
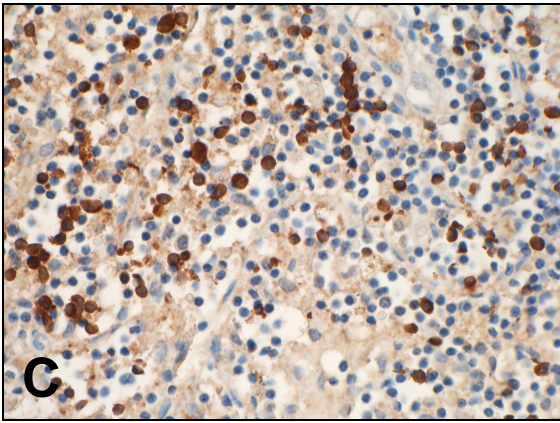
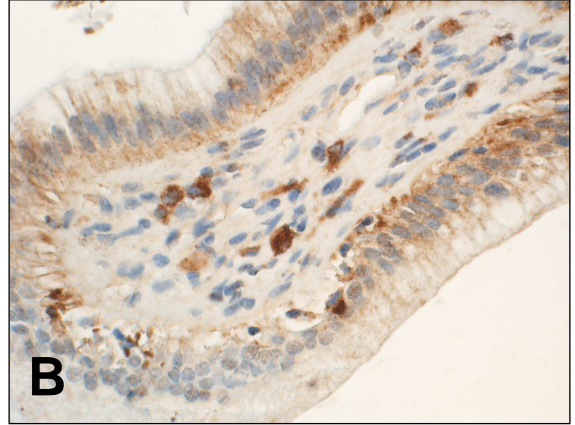
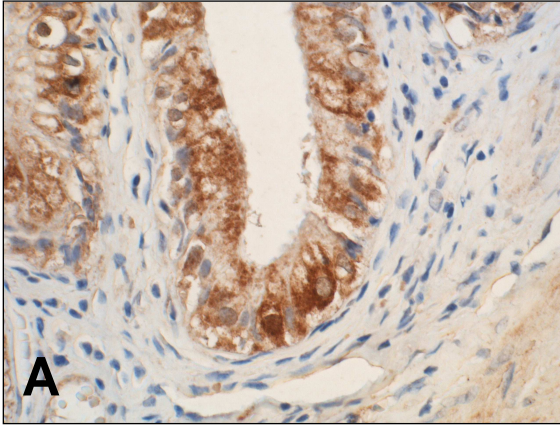
### Tablica 3.

#### Immunocytochemiczna lokalizacja IL-1 $\alpha$ w kamiczym zapaleniu pęcherzyka żółciowego.

Technika immunocytochemiczna ABC. Kontrast interferencyjny Nomarskiego. Powiększenie obiektywu x40.

**(A-F)** Fragmenty pęcherzyka żółciowego pacjentów z grupy ACC i CCC; **(G, H)** Kontrola pozytywna. Fragment nabłonka dziąsła z przewlekłym zapaleniem przyzębia **(G)**; Fragment odczynowego węzła chłonny **(H)**.

Obserwowano zarówno immunopoztywne komórki nabłonka pęcherzyka żółciowego **(A)**, jak i komórki nacieku zapalnego zlokalizowane w *lamina propria*, niekiedy tuż pod nabłonkiem **(B)**. Ekspresja IL-1 $\alpha$  w blaszce właściwej błony śluzowej dotyczyła głównie monocytów/makrofagów **(C)** oraz komórek *endothelium* naczyń **(D)**. Szczególnie nasilona reakcja dotyczyła także komórek piankowatych (*foamy cells*) u kilku pacjentów z grupy CCC **(E)**. Ekspresja IL-1 $\alpha$  obecna również w częściach przypadawnych nabłonka gruczołów cewkowo-pęcherzykowych **(F)**. Komórkowa ekspresja IL-1 $\alpha$  w keratynocytach nabłonka dziąsła **(G)**. Intensywna reakcja w odczynowych węzłach chłonnych **(H)**.



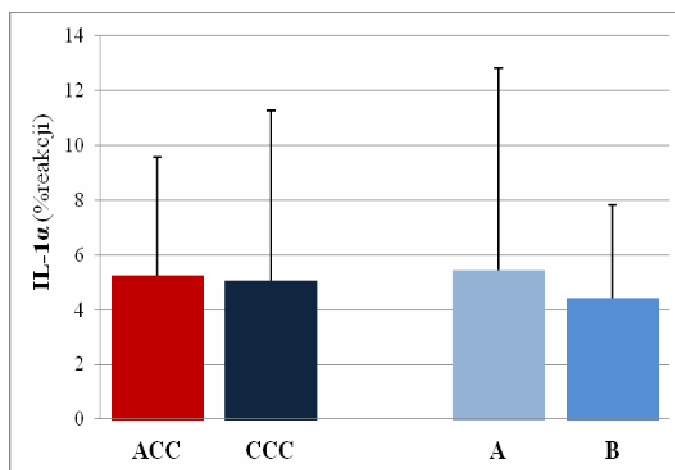
w cytoplazmie komórek nabłonka jednowarstwowego walcowatego **(A)**. Wykazano również ekspresję IL-1 $\alpha$  w częściach przypodstawnych nabłonka gruczołów cewkowo-pęcherzykowych (tzw. jasnokomórkowych) **(F)**.

W dziąsłach pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia oraz odczynowymi węzłami chłonnymi (kontrola pozytywna) komórkowa ekspresja IL-1 $\alpha$  dotyczyła zarówno keratynocytów nabłonka dziąsła **(G)**, jak i monocytów/makrofagów i limfocytów nacieków zapalnych. W odczynowych węzłach chłonnych obserwowano rozlaną pozytywną reakcję immunocytochemiczną na to białko w częściach centralnych i obwodowych grudek chłonnych tych narządów limfatycznych **(H)**. Nasilenie ekspresji IL-1 $\alpha$  w kontroli pozytywnej nie było poddane analizie ilościowej, a badanie to służyło do oceny jakości stosowanych przeciwciał do wykrywania i lokalizacji cytokiny.

### 3.1.1. Analiza ilościowa immunocytochemicznej ekspresji IL-1 $\alpha$

Średnia ekspresja IL-1 $\alpha$  u pacjentów z ACC wynosiła  $5,26 \pm 4,32\%$ , a w grupie z CCC –  $5,07 \pm 6,22\%$  (różnica nieistotna statystycznie) **(Rycina, Tabela 7)**.

Porównanie ekspresji IL-1 $\alpha$  w obrębie grupy CCC pomiędzy młodszymi i starszymi pacjentami również wykazało zbliżoną ekspresję tej cytokiny w obu podgrupach pacjentów ( $p=0,3897$ ) **(Rycina 12, Tabela 7)**.



**Rycina 12.** Porównanie ilościowej ekspresji IL-1 $\alpha$  w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego u pacjentów z ostrym (ACC) i przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (CCC) oraz pomiędzy pacjentami młodszymi (A) oraz starszymi (B) z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego.



### 3.2. Lokalizacja komórkowa interleukiny 6 (IL-6)

Komórkową ekspresję IL-6 analizowano w parafinowych skrawkach pęcherzyków żółciowych od 16 pacjentów z grupy ACC i 43 pacjentów z grupy CCC. Wykazano pozytywną ekspresję o zmiennym nasileniu u 8/16 pacjentów z grupy ACC (50%) oraz 26/43 (60%) pacjentów z grupy CCC.

Przykładowe mikrofotografie **(A-H)** z immunocytochemiczną lokalizacją interleukiny 6 przedstawiono w **Tablicy 4**.

Pozytywna reakcja immunocytochemiczna (z reguły o słabym nasileniu i z małą liczbą komórek immunopozytywnych) dotyczyła głównie komórek nabłonka pęcherzyka żółciowego i również ta cytokina zlokalizowana była w cytoplazmie i bocznych częściach błon komórkowych **(A-F)**. Wykazano także pojedyncze komórki *endothelium* małych naczyń krwionośnych z ekspresją IL-6 **(D)** oraz zaledwie pojedyncze komórki nacieków zapalnych **(E)**.

W materiale kontrolnym potwierdzono obecność ekspresji tej cytokiny w keratynocytach dziąsła pacjenta z przewlekłym zapaleniem przyzębia **(G)** oraz intensywny odczyn barwny w nacieku zapalnym dziąsła z *chronic periodontitis* **(H)**.

Nasilenie ekspresji IL-6 w kontroli pozytywnej nie było poddane analizie ilościowej, a badanie to służyło do oceny jakości stosowanych przeciwciał do wykrywania i lokalizacji cytokiny.

#### 3.2.1. Analiza ilościowa immunocytochemicznej ekspresji IL-6

Średnia ekspresja IL-6 u pacjentów z ACC wynosiła  $1,02 \pm 1,67\%$ , a w grupie z CCC –  $1,85 \pm 2,58\%$ , co nie dało znamiennych różnic pomiędzy grupami **(Rycina 13, Tabela 7)**.

Porównanie ekspresji IL-6 w obrębie grupy CCC pomiędzy młodszymi i starszymi pacjentami również nie wykazało istotnych różnic w komórkowej ekspresji tej cytokiny w obu podgrupach pacjentów ( $p=0,4870$ ) **(Rycina 13, Tabela 7)**.

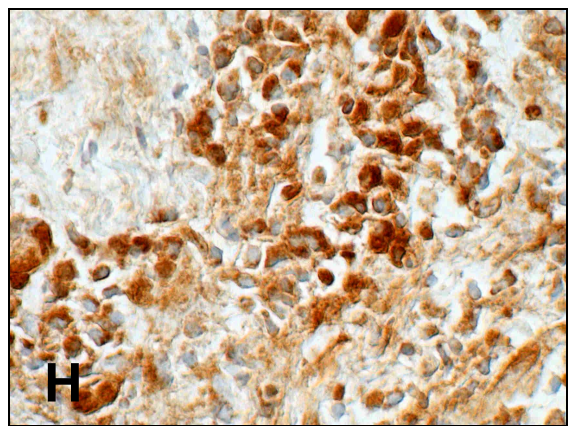
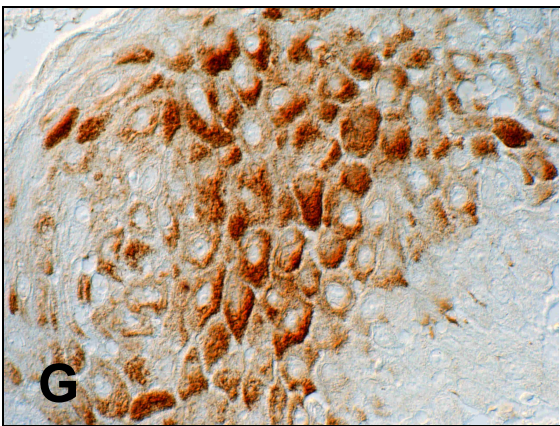
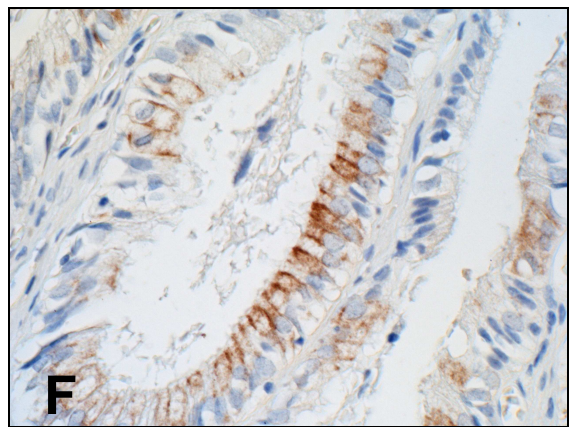
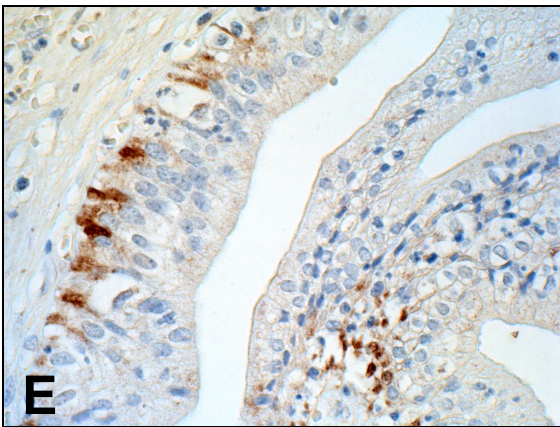
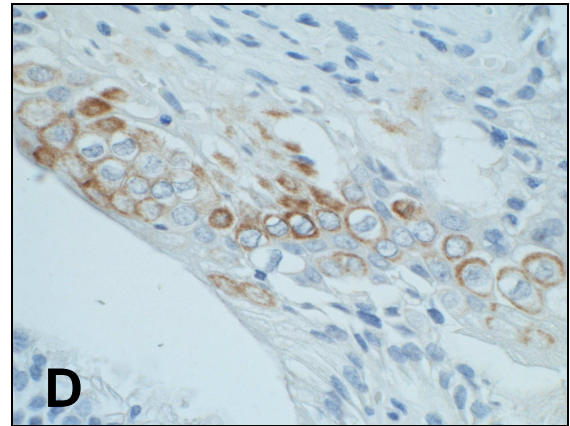
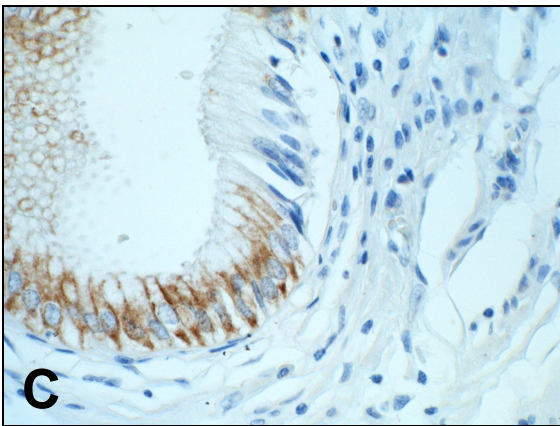
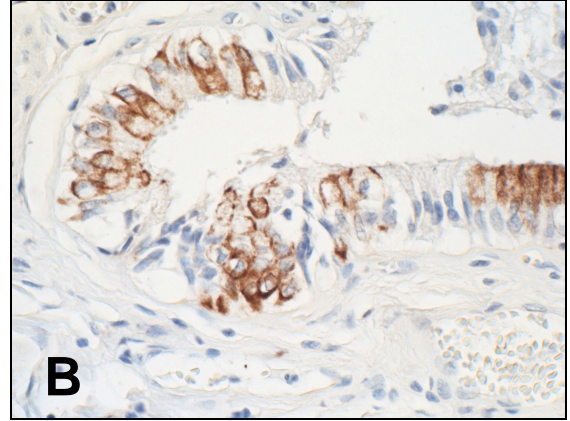
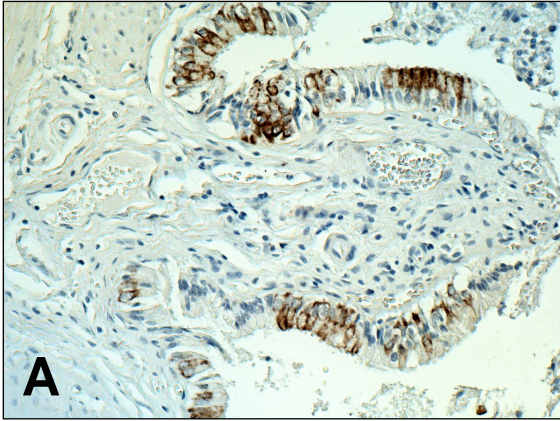
#### Tablica 4.

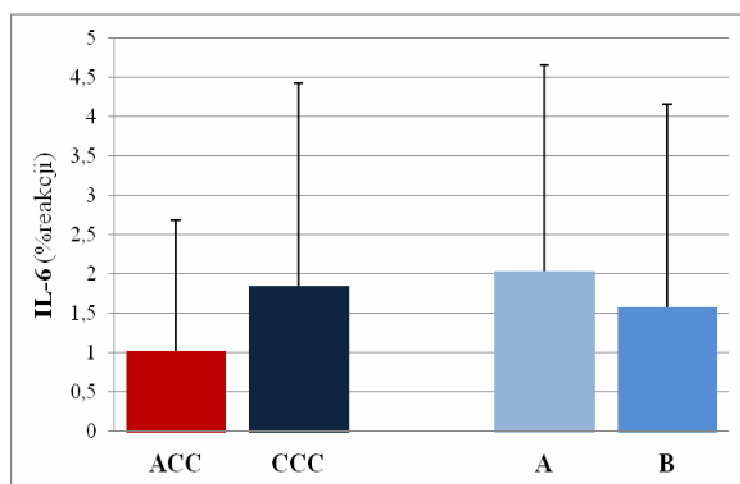
### Immunocytochemiczna lokalizacja IL-6 w kamiczym zapaleniu pęcherzyka żółciowego.

Technika immunocytochemiczna ABC. Kontrast interferencyjny Nomarskiego. Powiększenie obiektywu x40 **(B-H)**, x20 **(A)**.

**(A-F)** Fragmenty pęcherzyka żółciowego pacjentów z grupy ACC i CCC;  
**(G, H)** Kontrola pozytywna. Fragment nabłonka dziąsła z przewlekłym zapaleniem przyzębia **(G)**; Fragment odczynowego wężła chłonnego **(H)**.

Pozytywna reakcja immunocytochemiczna dotyczyła głównie komórek nabłonka pęcherzyka żółciowego **(A-F)**. Cytokina zlokalizowana była w cytoplazmie komórek i powierzchniach bocznych błon komórkowych **(B-D)**. Wykazano pojedyncze komórki *endothelium* małych naczyń krwionośnych z ekspresją IL-6 **(D)** oraz zaledwie pojedyncze komórki nacieków zapalnych **(E)**. Komórkowa ekspresja IL-1 $\alpha$  w keratynocytach nabłonka dziąsła **(G)**. Intensywna reakcja w nacieku zapalnym dziąsła z przewlekłym zapaleniem przyzębia **(H)**.





**Rycina 13.** Porównanie ilościowej ekspresji **IL-6** w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego u pacjentów z ostrym (ACC) i przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (CCC) oraz pomiędzy pacjentami młodszymi (A) oraz starszymi (B) z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego.

### 3.3. Analiza komórkowej ekspresji czynnika martwicy nowotworów (TNF- $\alpha$ )

Ekspresję TNF- $\alpha$  oceniano w 15 pęcherzykach żółciowych pacjentów z grupy ACC oraz 33 z grupy CCC. U wszystkich pacjentów, niezależnie od grupy wykazano obecność tej cytokiny. Tak więc wykrywalność tego białka wynosiła 100%.

Przykładowe mikrofotografie (**A-H**) z immunocytochemiczną lokalizacją TNF- $\alpha$  przedstawiono w **Tablicy 5**.

Immunocytochemiczna ekspresja obecna była w cytoplazmie dużego spektrum komórek błony śluzowej pęcherzyka żółciowego. W większości przypadków obserwowano liczne komórki z pozytywną reakcją barwną zlokalizowaną zarówno w komórkach nabłonka jednowarstwowego walcowatego (**A, D**), jak i komórkach nacieków zapalnych w *lamina propria* (**B**). Z komórek w *lamina propria* ekspresja tej cytokiny dotyczyła głównie monocytów i makrofagów (CD68-pozytywnych) oraz pojedynczych komórek *endothelium* drobnych naczyń (**B**). Pozytywną reakcję na tę cytokinę wykazano również w komórkach piankowatych (*foamy cells*) obecnych w *lamina propria* (**C, D**) oraz w komórkach gruczołów cewkowo-pęcherzykowych (**E, F**).

## Tablica 5.

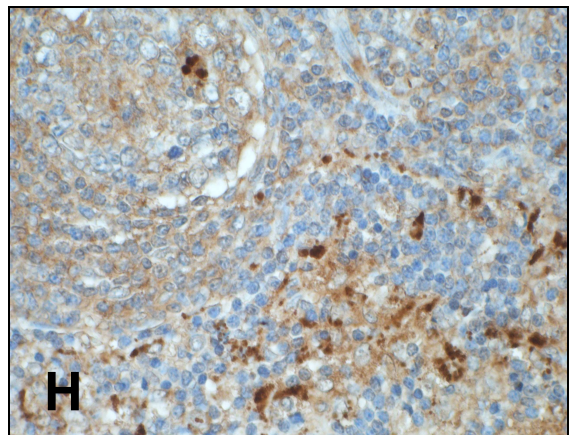
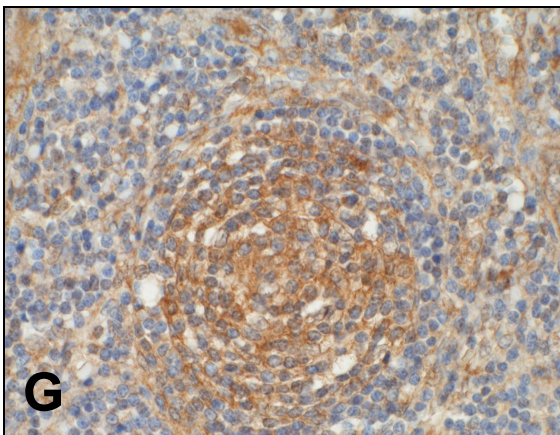
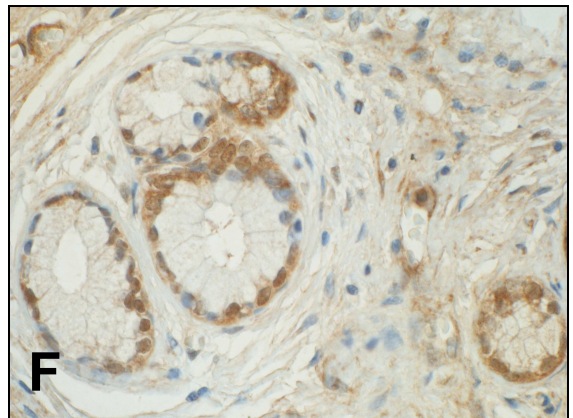
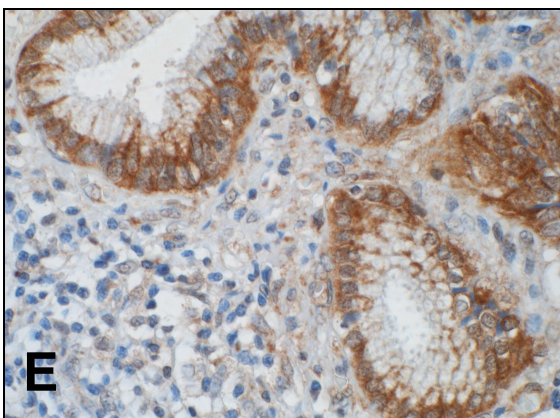
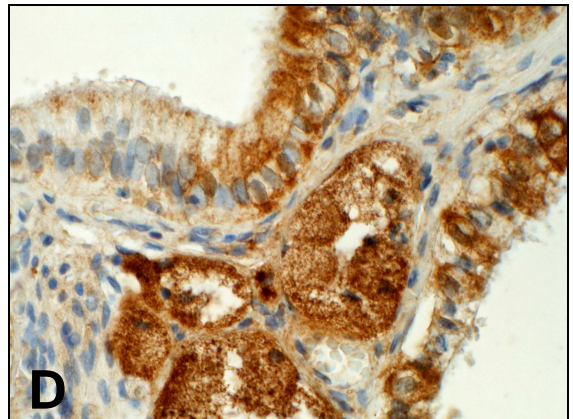
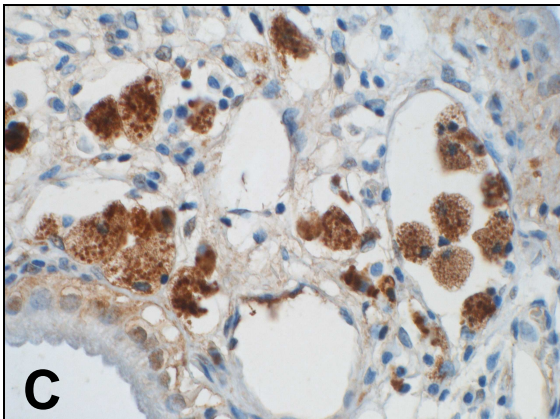
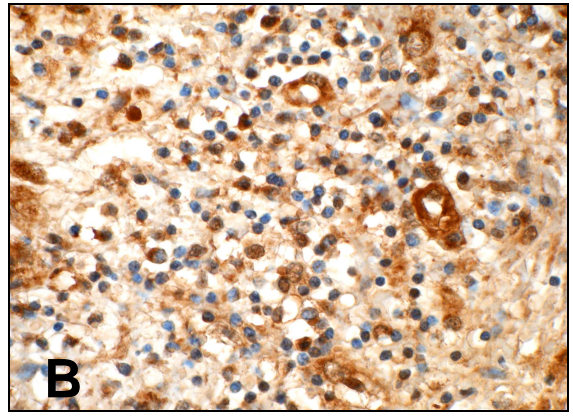
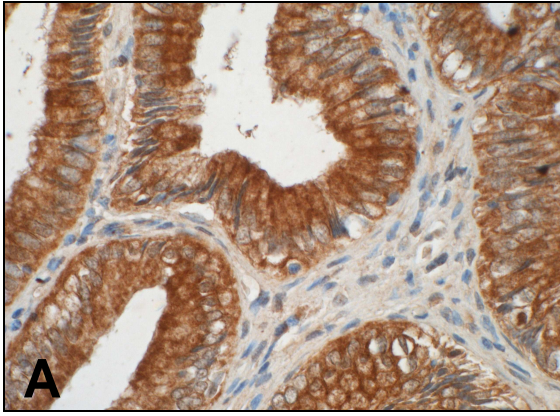
### Immunocytochemiczna lokalizacja TNF- $\alpha$ w kamiczym zapaleniu pęcherzyka żółciowego.

Technika immunocytochemiczna ABC. Kontrast interferencyjny Nomarskiego. Powiększenie obiektywu x40.

**(A-F)** Fragmenty pęcherzyka żółciowego pacjentów z grupy ACC i CCC;

**(G, H)** Fragmenty odczynowych węzłów chłonnych (kontrola pozytywna).

limmunopoztywne komórki nabłonka pęcherzyka żółciowego **(A)**, a także lokalizacja TNF- $\alpha$  w komórkach nacieku zapalnego w *lamina propria* **(B)**. Ekspresja TNF- $\alpha$  w blaszce właściwej błony śluzowej dotyczyła głównie monocytów/makrofagów **(B)** w tym także licznych komórek piankowatych (*foamy cells*) **(C, D)**. Ekspresja TNF- $\alpha$  obecna również w nabłonku gruczołów cewkowo-pęcherzykowych **(E, F)**. Intensywna komórkowa ekspresja TNF- $\alpha$  w centralnych i obwodowych częściach odczynowych węzłów chłonnych **(H)**.

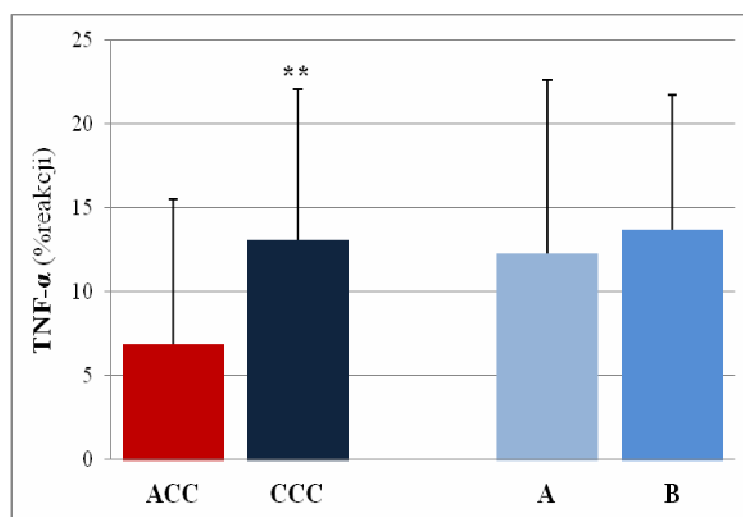


W odczynowych węzłach chłonnych (kontrola pozytywna) TNF- $\alpha$  wykazano zarówno w komórkach części centralnych, jak i obwodowych grudek chłonnych, budujących narząd limfatyczny (**G, H**). Nasilenie ekspresji TNF- $\alpha$  w kontroli pozytywnej nie było poddane analizie ilościowej, a badanie to służyło do oceny jakości stosowanych przeciwciał do wykrywania i lokalizacji cytokiny.

### 3.3.1. Analiza ilościowa immunocytochemicznej ekspresji TNF- $\alpha$

Średnia ekspresja TNF- $\alpha$  u pacjentów z ACC wynosiła  $6,89 \pm 8,65\%$ , a w grupie z CCC –  $13,13 \pm 9,94\%$ . Porównanie całkowitej komórkowej ekspresji TNF- $\alpha$  w grupie ACC i CCC wykazało statystycznie istotną różnicę na korzyść grupy CCC (**Rycina 14, Tabela 7**).

Natomiast porównanie ekspresji TNF- $\alpha$  w obrębie samej grupy CCC pomiędzy młodszymi ( $12,30 \pm 10,30\%$ ) i starszymi pacjentami ( $13,74 \pm 8,04\%$ ) nie wykazało istotnych różnic w komórkowej ekspresji tej cytokiny ( $p=0,5056$ ) (**Rycina 14, Tabela 7**).



**Rycina 14.** Porównanie ilościowej ekspresji TNF- $\alpha$  w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego u pacjentów z ostrym (ACC) i przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (CCC) oraz pomiędzy pacjentami młodszymi (A) oraz starszymi (B) z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego; \*\* -  $p=0,0061$

**Tabela 7.** Porównanie ilościowej ekspresji cytokin prozapalnych (IL-1 $\alpha$ , IL-6 i TNF- $\alpha$ ) w badanych grupach pacjentów z ostrym (ACC) i przewlekłym (CCC) kamiczym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (test Manna-Whitney'a).

CYTOKINA	Grupa	n	Średnia	SD	Min.	Max.	p testu
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	ACC	16	5,26	4,32	0,87	16,60	0,3493
	CCC	55	5,07	6,22	0,37	32,77	
	<i>młodzi</i>	35	5,45	7,39	0,38	32,77	0,3897
	<i>starsi</i>	20	4,41	3,40	0,37	12,36	
<b>IL-6</b>	ACC	16	1,02	1,67	0,00	6,73	0,5045
	CCC	43	1,85	2,58	0,00	9,73	
	<i>młodzi</i>	25	2,04	2,62	0,00	9,73	0,4870
	<i>starsi</i>	18	1,58	2,58	0,00	8,38	
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	ACC	15	6,89	8,65	0,41	32,74	<b>0,0061</b>
	CCC	33	13,13	8,94	0,54	31,12	
	<i>młodzi</i>	14	12,30	10,30	0,54	29,80	0,5056
	<i>starsi</i>	19	13,74	8,04	2,46	31,12	

**Objaśnienia:** p – poziom istotności; SD – odchylenie standardowe; n – liczba pacjentów; czcionką wyboldowaną zaznaczono różnice statystycznie istotne

### 3.4. Ekspresja cytokin prozapalnych w zależności od płci pacjenta

Porównując ekspresję cytokin prozapalnych w obrębie każdej z grup pacjentów w zależności od płci nie wykazano istotnych różnic płciowych w ekspresji cytokin, poza ekspresją IL-1 $\alpha$ , która przeważała u mężczyzn w porównaniu z kobietami z grupy ACC.

Natomiast porównując ekspresję cytokin pomiędzy pacjentami obojga płci w dwóch zadaniowych grupach pacjentów (ACC vs. CCC) wykazano istotnie większą komórkową ekspresję TNF- $\alpha$  u kobiet z grupy CCC w porównaniu z kobietami z grupy ACC (**Tabela 8**).



**Tabela 8.** Porównanie ekspresji cytokin prozapalnych (IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) w obu grupach pacjentów z objawowym kamycznym zapaleniem pęcherzyka żółciowego w zależności od płci pacjenta (test Manna-Whitney'a, t-Studenta i/lub Leven'a).

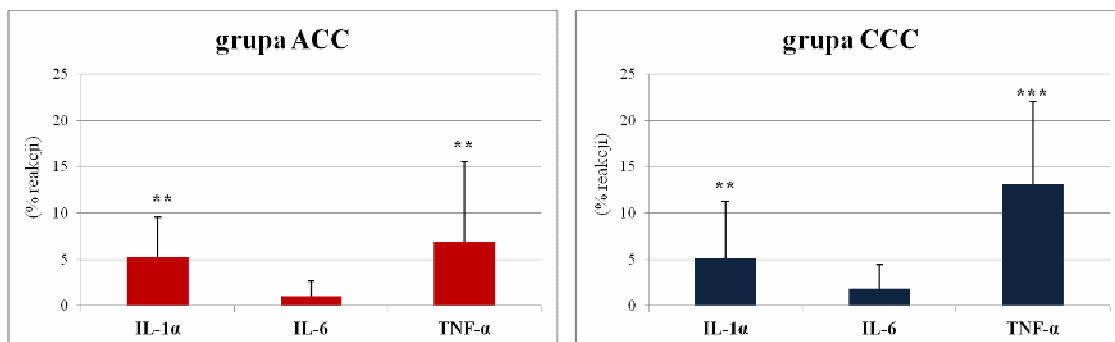
Cytokina		n1	Grupa ACC	n2	Grupa CCC	p testu
IL-1 $\alpha$	♀	7	3,83 $\pm$ 1,98	44	5,18 $\pm$ 6,75	0,5460
	♂	9	6,38 $\pm$ 5,37*	11	4,62 $\pm$ 3,67 <sup>NS</sup>	1,0000
IL-6	♀	7	1,72 $\pm$ 2,35	35	2,12 $\pm$ 2,76	0,9474
	♂	9	0,47 $\pm$ 0,58 <sup>NS</sup>	8	0,65 $\pm$ 1,00 <sup>NS</sup>	0,8884
TNF- $\alpha$	♀	6	4,54 $\pm$ 2,98	26	13,80 $\pm$ 9,41	<b>0,0162</b>
	♂	9	8,46 $\pm$ 10,89 <sup>NS</sup>	7	10,63 $\pm$ 6,96 <sup>NS</sup>	0,1738

**Objaśnienia:** W Tabeli podano wartości średnich $\pm$ SD (odchylenie standardowe); p – poziom istotności; n1- liczba chorych w grupie ACC; n2- liczba chorych w grupie CCC; \* - p=0,0209 w teście Leven'a pomiędzy ekspresją IL-1 $\alpha$  u kobiet i mężczyzn w grupie ACC; NS – różnica nieistotna statystycznie pomiędzy wartością ekspresji cytokin u kobiet i mężczyzn

### 3.5. Porównanie wzajemnej ekspresji cytokin prozapalnych w obrębie każdej z grup pacjentów

W grupie pacjentów z ACC wykazano zbliżone wartości średniej ekspresji IL-1 $\alpha$  i TNF- $\alpha$ , natomiast istotnie większą ekspresję czynnika martwicy nowotworów w porównaniu z ekspresją IL-6. Ekspresja IL-1 $\alpha$  była większa niż IL-6 w tej grupie chorych (**Rycina 15, Tabela 9**).

Badanie wzajemnej ekspresji tych cytokin w grupie pacjentów z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (CCC), wykazało największą ekspresję TNF- $\alpha$  i to zarówno w porównaniu z ekspresją IL-1 $\alpha$ , jak i IL-6. Natomiast podobnie jak w grupie ACC, ekspresja IL-1 $\alpha$  była większa niż IL-6 w tej grupie chorych (**Rycina 15, Tabela 9**).



**Rycina 15.** Porównanie wzajemnej ekspresji **cytokin prozapalnych** w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego u pacjentów z grupy ACC i CCC (test Wilcoxon).

\*\* - p=0,0022 pomiędzy IL-1 $\alpha$  i IL-6; p=0,0064 pomiędzy TNF- $\alpha$  i IL-6 w grupie ACC;

\*\* - p=0,0023 pomiędzy IL-1 $\alpha$  i IL-6; \*\*\* - p=0,0001 pomiędzy TNF- $\alpha$  i IL-6 w grupie CCC

**Tabela 9.** Porównanie wzajemnej ekspresji cytokin prozapalnych w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego u pacjentów z obu grup (test Wilcoxon).

Cytokina	Grupa	Średnia ekspresja w błonie śluzowej $\pm$ SD	Cytokina	Średnia ekspresja w błonie śluzowej $\pm$ SD	p testu
IL-1 $\alpha$	ACC	5,26 $\pm$ 4,32	IL-6	1,02 $\pm$ 1,76	0,0022
			TNF- $\alpha$	6,89 $\pm$ 8,65	0,4955
	CCC	5,07 $\pm$ 6,22	IL-6	1,85 $\pm$ 2,58	0,0023
			TNF- $\alpha$	13,13 $\pm$ 8,94	0,0001
IL-6	ACC	1,02 $\pm$ 1,76	TNF- $\alpha$	6,89 $\pm$ 8,65	0,0064
	CCC	1,85 $\pm$ 2,58	TNF- $\alpha$	13,13 $\pm$ 8,94	0,0001

**Objaśnienia:** p – poziom istotności; SD – odchylenie standardowe; czcionką wyboldowaną zaznaczono różnice statystycznie istotne

## 4. Ekspresja białek z rodziny S100

### 4.1. Lokalizacja komórkowa białka S100 (S100B)

Przeciwciała zastosowane do tej części badań immunocytochemicznych wykrywały przede wszystkim białko S100B, w mniejszych ilościach (słabszy sygnał) także S100A1 i S100A6 (kalcyklina).

Przykładowe mikrofotografie **(A-H)** z immunocytochemiczną lokalizacją białka S100 (S100B) przedstawiono w **Tablicy 6**.

Białko to wykazano w pęcherzykach żółciowych u wszystkich pacjentów, niezależnie od grupy czy podgrupy chorych (100% wykrywalności).

Komórki S100-pozytywne występowały przede wszystkim w *lamina propria* **(A, B, C)**. Były to głównie komórki dendrytyczne, ułożone ogniskowo **(B)** lub rozproszone pomiędzy innymi komórkami nacieku zapalnego **(C)**. Pozytywną cytoplazmatyczno-jądrową reakcję na to białko obserwowano także w komórkach nabłonka gruczołowego **(D)**. Liczne S100B-pozytywne komórki wykazywano także pomiędzy komórkami piankowatymi (*foamy cells*) **(E)** oraz w komórkach zwojowych **(F)** i w pniach nerwowych w głębszych warstwach pęcherzyka żółciowego **(G)**, szczególnie w grupie CCC. Analizie ilościowej w ramach obecnej pracy poddano wyłącznie ekspresję tego białka w błonie śluzowej (nabłonek, *lamina propria*).

Pozytywną reakcję na białko S100 wykazywano także w komórkach dendrytycznych (i/lub makrofagach) odczynowych węzłów chłonnych **(H)** (kontrola pozytywna). Nasilenie reakcji w narządach kontrolnych nie było poddane analizie ilościowej.

#### 4.1.1. Analiza ilościowa ekspresji komórkowej S100 (S100B)

Średnia ekspresja białka S100 (S100B) była istotnie większa w grupie z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (CCC) w porównaniu z ostrym zapaleniem narządu ( $p=0,0001$ ). Nie różniła się natomiast ilościowo w obrębie podgrup (młodzi vs. starsi pacjenci) przewlekłego zapalenia pęcherzyka żółciowego (CCC) ( $p=0,3994$ ) **(Rycina 16, Tabela 10)**.

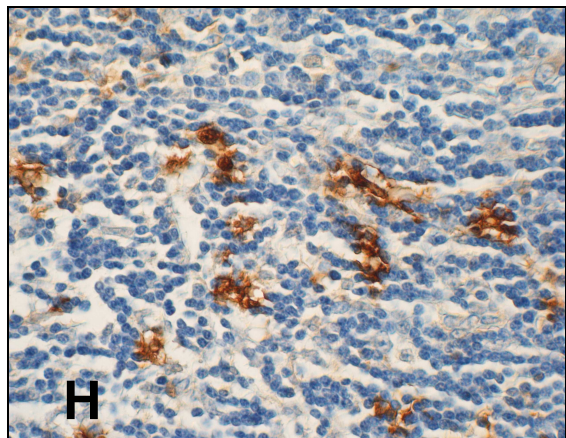
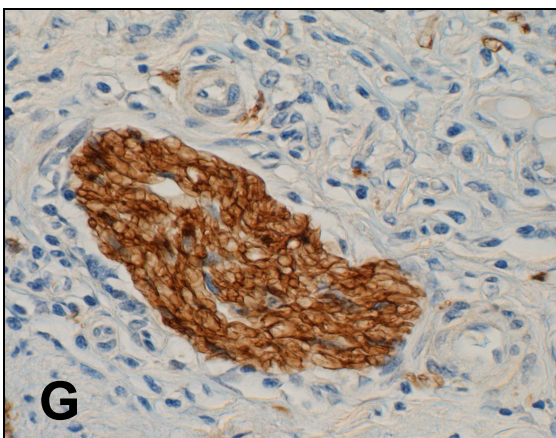
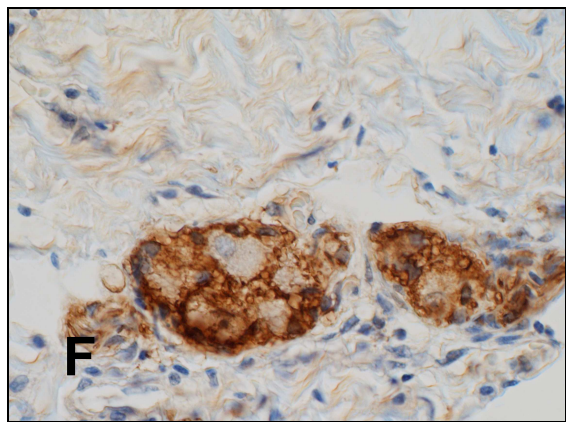
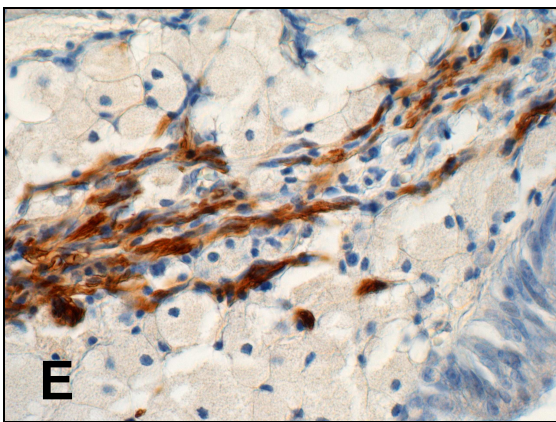
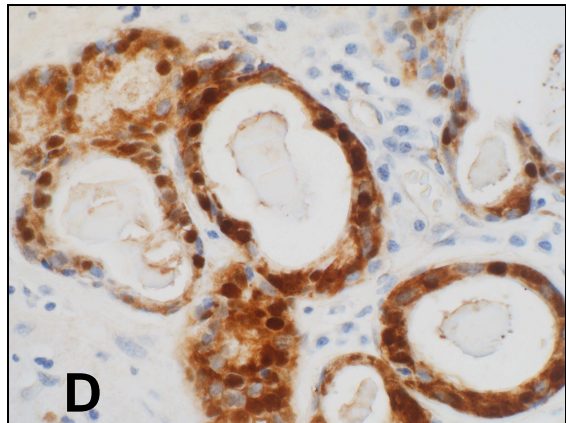
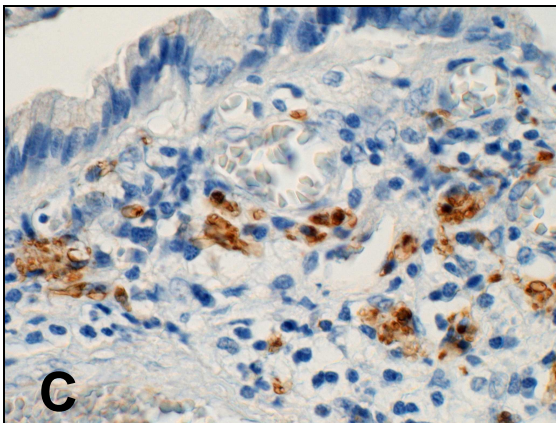
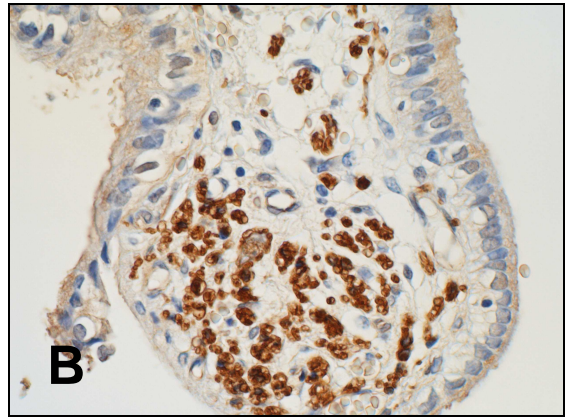
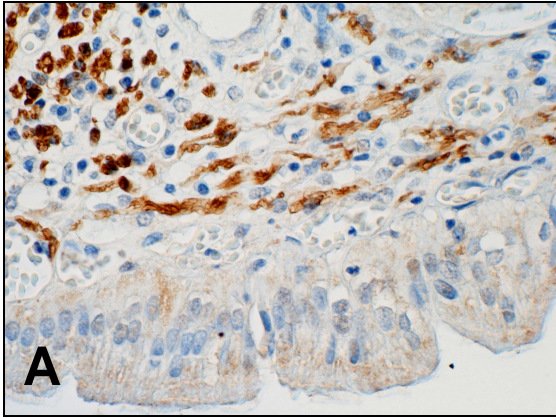
## Tablica 6.

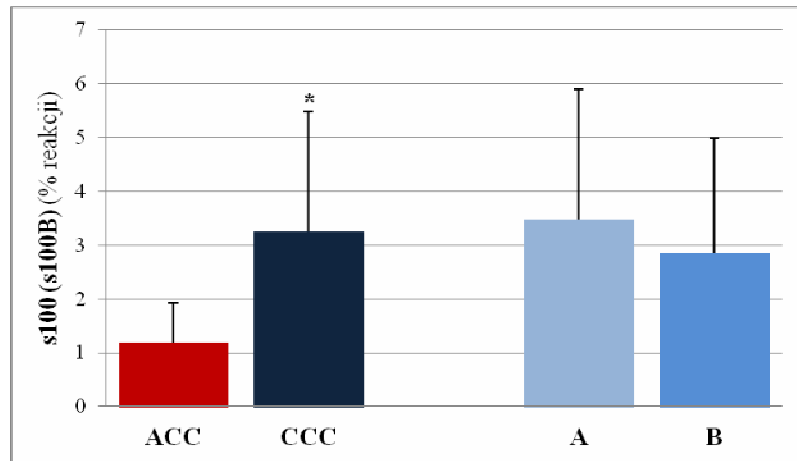
### Immunocytochemiczna lokalizacja białka S100 (S100B) w kamiczym zapaleniu pęcherzyka żółciowego.

Technika immunocytochemiczna ABC. Kontrast interferencyjny Nomarskiego. Powiększenie obiektywu x40.

**(A-G)** Fragmenty pęcherzyka żółciowego pacjentów z grupy ACC i CCC;  
**(H)** Fragment odczynowego węzła chłonnego (kontrola pozytywna).

S100B-pozytywne komórki dendrytyczne w *lamina propria* pod nabłonkiem **(A)**, ułożone ogniskowo **(B)** lub rozproszone pomiędzy innymi komórkami nacieku zapalnego **(C)**. Cytoplazmatyczno-jądrowa reakcja w komórkach nabłonka gruczołowego **(D)**. Liczne S100B-pozytywne komórki pomiędzy komórkami piankowatymi (*foamy cells*) **(E)** oraz w komórkach zwojowych **(F)** i pniach nerwowych w głębszych warstwach ściany pęcherzyka żółciowego **(G)**. Pozytywna reakcja na białko S100B w komórkach dendrytycznych (i/lub makrofagach) odczynowych węzłów chłonnych **(H)**.





**Rycina 16.** Porównanie ilościowej ekspresji białka **S100 (S100B)** w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego u pacjentów z ostrym (ACC) i przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (CCC) oraz pomiędzy pacjentami młodszymi (A) oraz starszymi (B) z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego; \*- p=0,0001

#### 4.2. Lokalizacja komórkowa białka S100A8

Białko S100A8 wykrywano również we wszystkich badanych skrawkach pęcherzyków żółciowych pacjentów, niezależnie od grupy.

Przykładowe mikrofotografie (**A-H**) z immunocytochemiczną lokalizacją białka S100A8 przedstawiono w **Tablicy 7**.

Cytoplazmatyczna lokalizacja tego białka dotyczyła zarówno komórek w obrębie nacieków zapalnych (głównie neutrofile), jak i komórek nabłonka pęcherzyka żółciowego (**A-D**) oraz komórek *endothelium* naczyń (**E**). Optycznie więcej komórek immunopozytywnych uwidoczniono w pęcherzykach żółciowych grupy ACC (**A-D**) w porównaniu z grupą CCC (**E-G**). Zarówno u pacjentów z grupy ACC, jak i CCC, ekspresja tego białka widoczna była zarówno w komórkach usytuowanych wewnątrz nabłonkowo (por. **B i F**), jak i w komórkach nacieku zapalnego (głównie neutrofile, ale także monocyty, makrofagi). Immunopozytywne komórki (leukocyty) widoczne były również w świetle naczyń krwionośnych (**E**). Obserwowano pozytywną reakcję także w komórkach zlokalizowanych w *lamina propria* pomiędzy gruczołami cewkowo-pęcherzykowymi (**G**).

## Tablica 7.

### Immunocytochemiczna lokalizacja białka S100A8 w kamiczym zapaleniu pęcherzyka żółciowego.

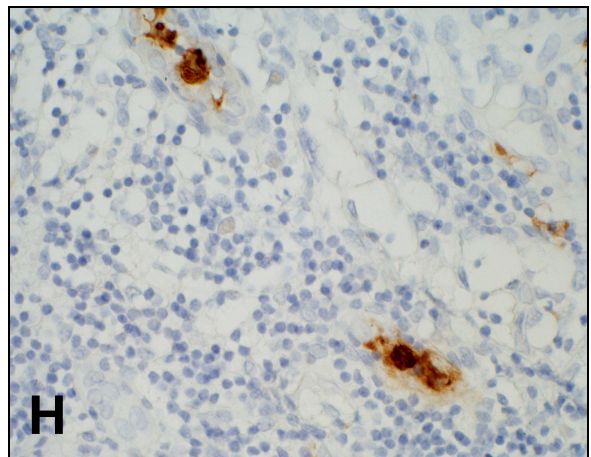
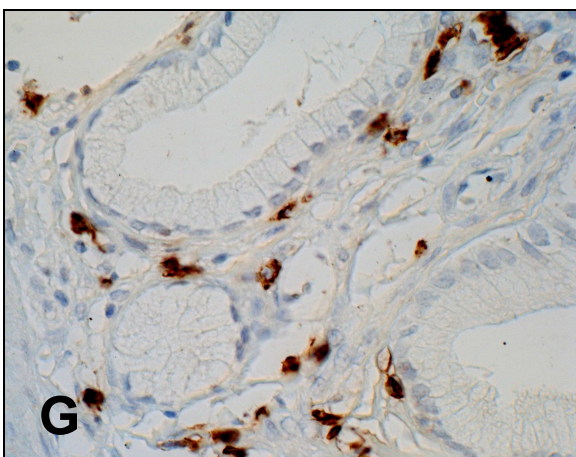
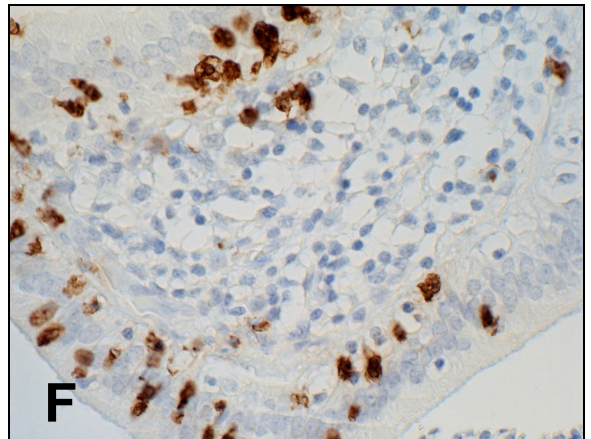
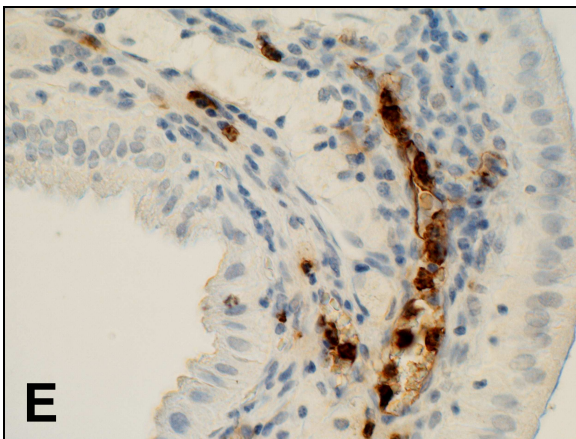
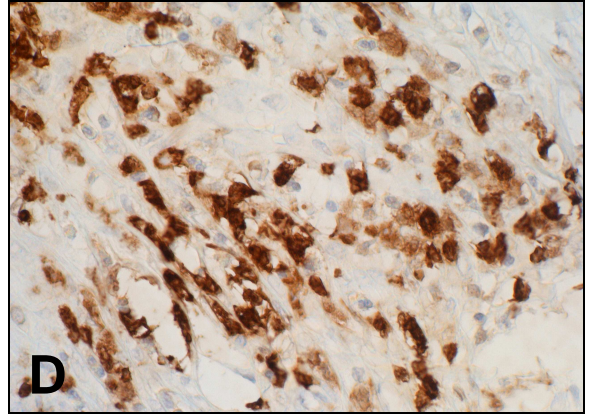
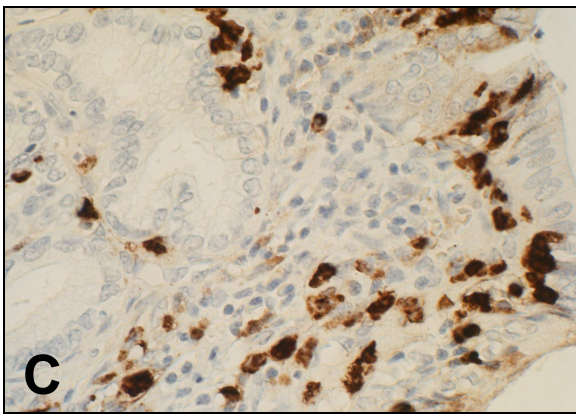
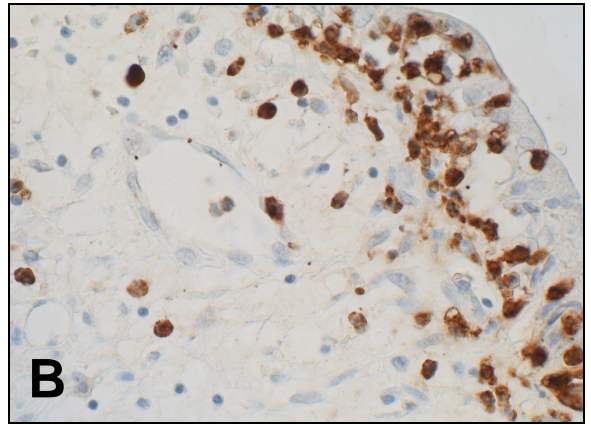
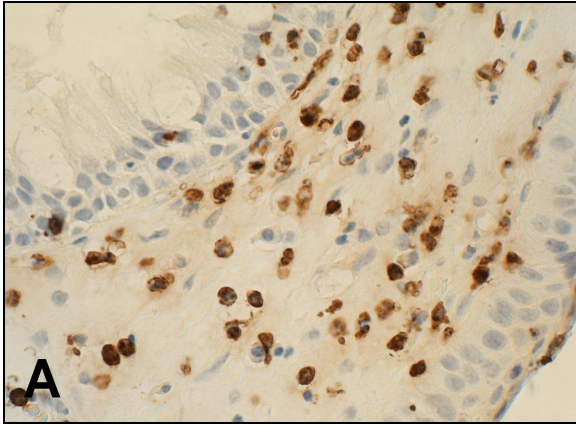
Technika immunocytochemiczna ABC. Kontrast interferencyjny Nomarskiego. Powiększenie obiektywu x40.

**(A-G)** Fragmenty pęcherzyka żółciowego pacjentów z grupy ACC i CCC;

**(H)** Fragment odczynowego węzła chłonnego (kontrola pozytywna).

Cytoplazmatyczna lokalizacja białka S100A8 w komórkach nacieków zapalnych w *lamina propria* (głównie neutrofile i makrofagi) **(A-D)**, w nabłonku pęcherzyka żółciowego **(B, C, F)** oraz w komórkach *endothelium* naczyń **(E)**. Immunopoztywne komórki (leukocyty) widoczne również w świetle naczyń krwionośnych **(E)**. Rozproszone komórki S100A8-pozytywne także w *lamina propria* pomiędzy gruczołami cewkowo-pęcherzykowymi **(G)**.

Pozytywna reakcja na białko S100A8 w pojedynczych komórkach odczynowego węzła chłonnego **(H)**.

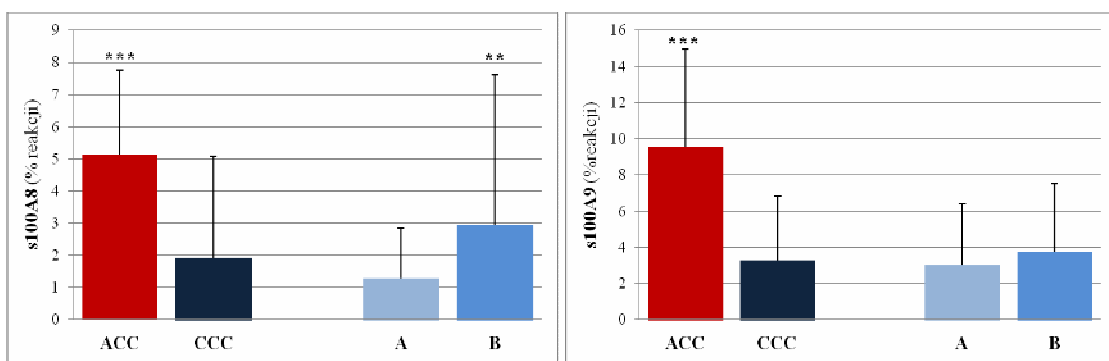




W odczynowym węzle chłonny, uwidoczniło pojedyncze komórki z pozytywną reakcją na to białko (**H**).

#### 4.2.1. Analiza ilościowa ekspresji białka S100A8

Średnia ekspresja białka S100A8 była istotnie większa w grupie z ostrym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (ACC) w porównaniu z przewlekłym zapaleniem narządu ( $p=0,0001$ ). Większą ekspresję tego białka wykazano również u starszych pacjentów w porównaniu z młodymi w obrębie podgrupy CCC ( $p=0,0096$ ) (**Rycina 17, Tabela 10**).



**Rycina 17.** Porównanie ilościowej ekspresji białka S100A8 oraz białka S100A9 w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego u pacjentów z ostrym (ACC) i przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (CCC) oraz pomiędzy pacjentami młodszy (A) oraz starszymi (B) z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego;

\*\* - $p=0,0096$ ; \*\*\*-  $p=0,0001$  – w przypadku białka S100A8;

\*\*\* - $p=0,0001$  – w przypadku białka S100A9

#### 4.3. Lokalizacja komórkowa białka S100A9

Białko S100A9, podobnie jak S100A8 wykryto również we wszystkich badanych pęcherzykach żółciowych pacjentów, niezależnie od grupy (100% częstość występowania).

Przykładowe mikrofotografie (**A-H**) z immunocytochemiczną lokalizacją białka S100A9 ujęte zostały w **Tablicy 8**.

Cytoplazmatyczna lokalizacja tego białka dotyczyła zarówno komórek w obrębie nacieków zapalnych (neutrofilów, monocytów/makrofagów), jak i komórek nabłonka jednowarstwowego walcowatego pęcherzyka żółciowego (**A-C**).

### Tablica 8.

#### Immunocytochemiczna lokalizacja białka S100A9 w kamiczym zapaleniu pęcherzyka żółciowego.

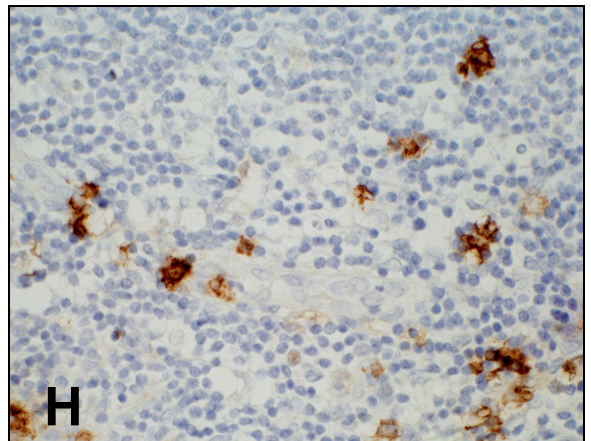
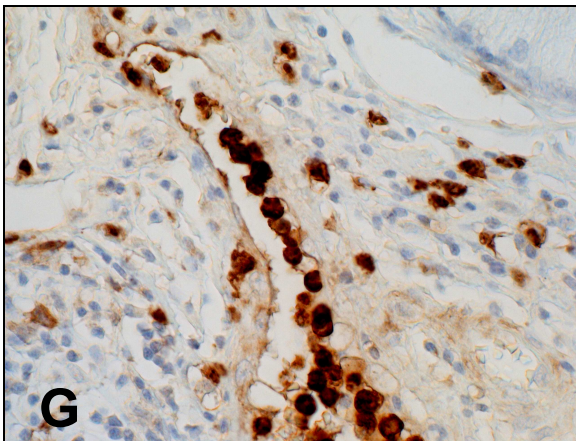
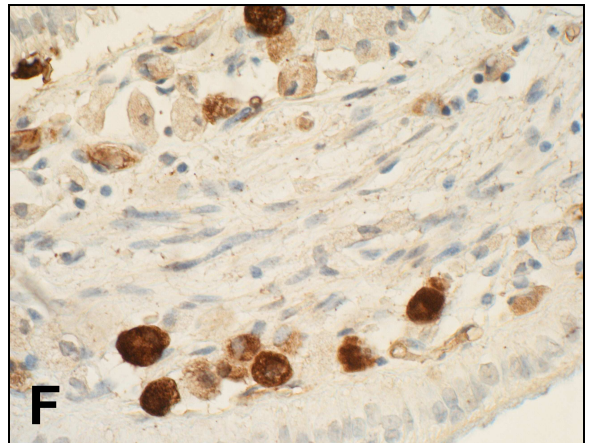
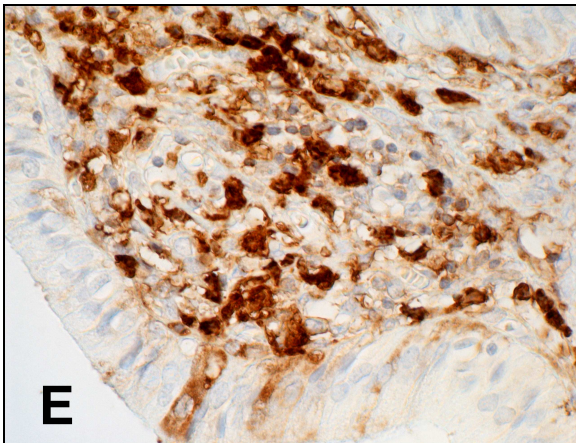
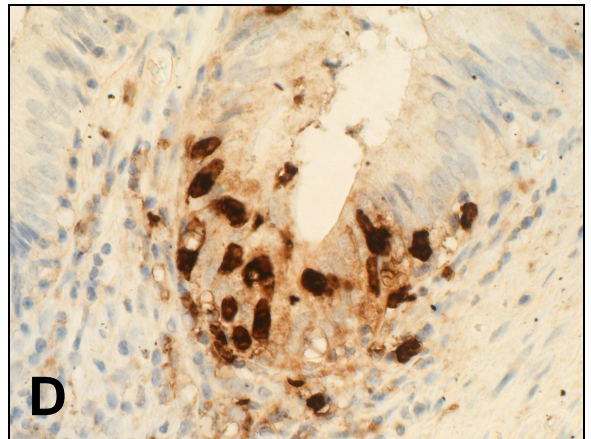
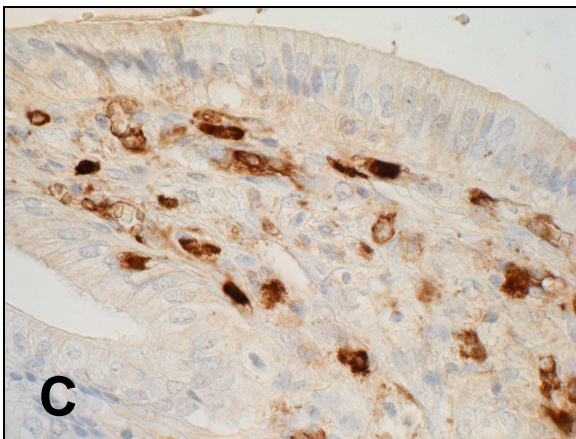
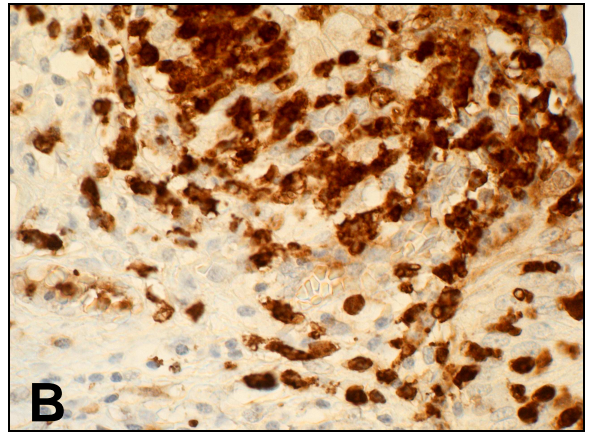
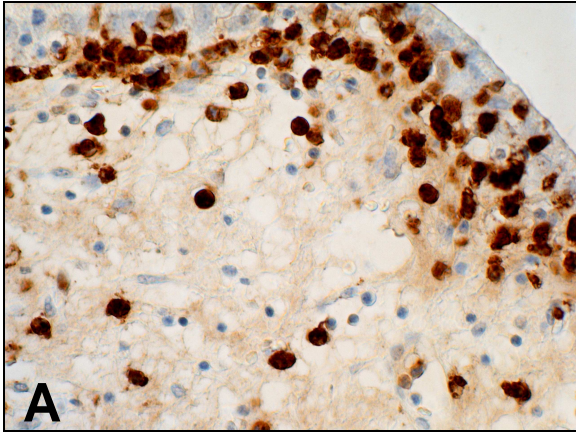
Technika immunocytochemiczna ABC. Kontrast interferencyjny Nomarskiego. Powiększenie obiektywu x40.

**(A-G)** Fragmenty pęcherzyka żółciowego pacjentów z grupy ACC i CCC;

**(H)** Fragment odczynowego węzła chłonного (kontrola pozytywna).

Cytoplazmatyczna lokalizacja białka w komórkach nacieków zapalnych (neutrofile, monocyty/makrofagi) w *lamina propria* **(A-G)** i w obrębie nabłonka jednowarstwowego walcowatego pęcherzyka żółciowego **(A, D, E)**. Wewnątrz nabłonkowe S100A9-pozytywne komórki widoczne zarówno w grupie ACC **(A)**, jak i CCC **(D, E)**. Lokalizacja białka S100A9 w nielicznych komórkach piankowatych (*foamy cells*) w obrębie *lamina propria* **(F)** oraz w komórkach *endothelium* i w świetle naczyń **(G)**.

Pozytywna reakcja na białko S100A9 w pojedynczych komórkach (komórki dendrytyczne i/lub makrofagi) odczynowego węzła chłonного **(H)**.



Wewnątrz nabłonkowe S100A9-pozytywne komórki widoczne były zarówno w grupie ACC (**A**), jak i CCC (**D**, **E**). W grupie z CCC białko S100A9 zlokalizowane było także w nielicznych komórkach piankowatych (*foamy cells*) w obrębie *lamina propria* (**F**) oraz w komórkach *endothelium* i w świetle naczyń (**G**). Z reguły intensywna reakcja immunocytochemiczna dotyczyła głównie cytoplazmy komórek „zapalenia”, choć nie da się wykluczyć także pojedynczych jąder komórkowych z pozytywną reakcją (**A**).

W odczynowych węzłach chłonnych (kontrola pozytywna) produkt reakcji obecny był w cytoplazmie powiększonych komórek (komórki dendrytyczne i/lub makrofagi), rozsianych w grudce chłonnej pomiędzy komórkami limfoidalnymi (**H**).

#### **4.3.1. Analiza ilościowa ekspresji białka S100A9**

Średnia ekspresja białka S100A9, podobnie jak białka S100A8 była istotnie większa w grupie z ostrym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (ACC) w porównaniu z przewlekłym zapaleniem narządu ( $p=0,0001$ ). Nie było natomiast różnic ilościowych w ekspresji tego białka w podgrupie pacjentów z CCC (młodszy vs. starszy) ( $p=0,8094$ ) (**Rycina 17, Tabela 10**).

#### **4.4. Ekspresja białek z rodziny S100 w zależności od płci pacjenta**

Nie wykazano istotnych różnic statystycznych w nasileniu ekspresji żadnego z badanych białek z rodziny S100 (S100B, S100A8 i S100A9) w zależności od płci pacjenta w obrębie grup (ACC i CCC).

Porównanie tej ekspresji pomiędzy grupami (ACC vs. CCC), wykazało natomiast istotnie większą ekspresję białka S100 (S100B) u kobiet i u mężczyzn z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego w porównaniu z analogiczną płcią pacjentów z grupy ACC.

W przypadku białka S100A8 i S100A9 ekspresja obu białek była większa u kobiet z grupy ACC w porównaniu z kobietami z grupy CCC.

Mężczyźni z grupy ACC mieli znamienne większą jedynie ekspresję białka S100A9 w porównaniu z mężczyznami z grupy CCC (**Tabela 11**).

**Tabela 10.** Porównanie ilościowej ekspresji białek z rodziny S100 w badanych grupach pacjentów z ostrym (ACC) i przewlekłym (CCC) kamiczym zapaleniem pęcherzyka żółciowego oraz w podgrupie młodzi vs. starsi pacjenci z CCC (test Manna-Whitney'a).

Białko z rodziny S100	Grupa	n	Średnia	SD	Min.	Max.	p testu
<b>S100</b> (S100B, S100A1 i S100A6)	ACC	16	1,18	0,74	0,13	2,78	<b>0,0001</b>
	CCC	55	3,25	2,33	0,23	9,05	
	<i>młodzi</i>	35	3,47	2,44	0,63	9,05	0,3994
	<i>starsi</i>	20	2,85	2,14	0,23	7,86	
<b>S100A8</b>	ACC	16	5,13	2,63	0,90	10,84	<b>0,0001</b>
	CCC	50	1,92	3,17	0,12	20,64	
	<i>młodzi</i>	31	1,29	1,56	0,12	6,50	<b>0,0096</b>
	<i>starsi</i>	19	2,95	4,64	0,39	20,64	
<b>S100A9</b>	ACC	16	9,57	5,39	1,63	20,70	<b>0,0001</b>
	CCC	51	3,29	3,53	0,25	18,78	
	<i>młodzi</i>	32	3,00	3,40	0,25	18,78	0,8094
	<i>starsi</i>	19	3,76	3,78	0,49	12,32	

**Objaśnienia:** p – poziom istotności; SD – odchylenie standardowe; n – liczba pacjentów; czcionką wyboldowaną zaznaczono różnice statystycznie istotne

**Tabela 11.** Porównanie ekspresji białek z rodziny S100 w obu grupach pacjentów z objawowym kamiczym zapaleniem pęcherzyka żółciowego w zależności od płci pacjenta (test Manna-Whitney'a).

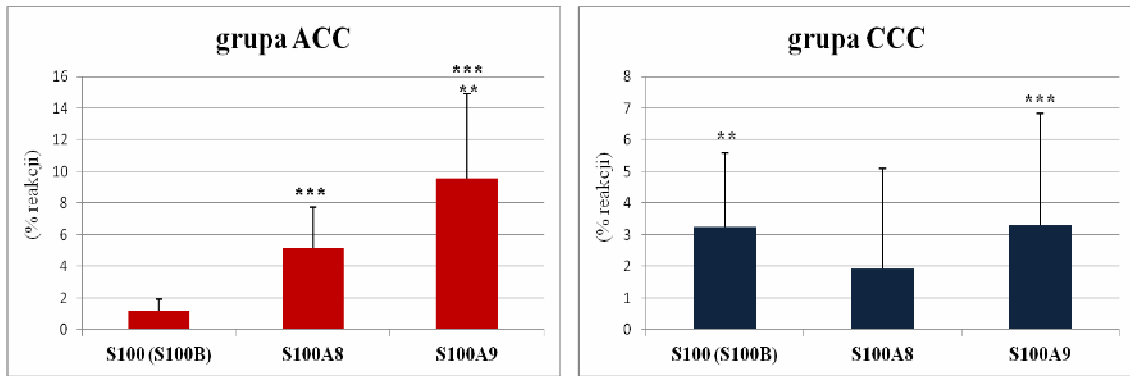
Białko z rodziny S100		n1	Grupa ACC	n2	Grupa CCC	p testu
<b>S100</b> (S100B)	♀	7	1,34±0,60	44	3,29±2,46	<b>0,0119</b>
	♂	9	1,06±0,84 <sup>NS</sup>	11	3,08±1,85 <sup>NS</sup>	<b>0,0023</b>
<b>S100A8</b>	♀	7	5,80±2,49	41	1,79±3,31	<b>0,0001</b>
	♂	9	4,60±2,77 <sup>NS</sup>	9	2,51±2,51 <sup>NS</sup>	0,0939
<b>S100A9</b>	♀	7	10,90±4,42	41	3,19±2,96	<b>0,0001</b>
	♂	9	8,53±6,08 <sup>NS</sup>	10	3,69±4,47 <sup>NS</sup>	<b>0,0220</b>

**Objaśnienia:** W Tabeli podano wartości średnich±SD (odchylenie standardowe); p – poziom istotności; n1- liczba chorych w grupie ACC; n2- liczba chorych w grupie CCC; NS – różnica nieistotna statystycznie pomiędzy wartością ekspresji białek z rodziny S100 u kobiet i mężczyzn

#### **4.5. Porównanie wzajemnej ekspresji białek z rodziny S100 w obu grupach pacjentów**

U pacjentów z grupy ACC najniższa ekspresja dotyczyła markera komórek dendrytycznych - białka S100 (S100B) i to zarówno w porównaniu z ekspresją białka S100A8, jak i S100A9. Wykazano istotnie większą ekspresję białka S100A9 niż białka S100A8 (**Rycina 18, Tabela 12**).

W grupie z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (CCC) wykazano zbliżoną ekspresję białek: S100B i S100A9. Ekspresja obu tych białek była istotnie większa w porównaniu z ekspresją S100A8 (**Rycina 18, Tabela 12**).



**Rycina 18.** Porównanie wzajemnej ekspresji białek z rodziny S100 w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego w obrębie grupy ACC i CCC (test Wilcoxon).

\*\*\*-  $p=0,0004$  pomiędzy S100A8 i S100B oraz  $p=0,0004$  pomiędzy S100A9 i S100B w grupie ACC; \*\* -  $p=0,0060$  pomiędzy S100B i S100A8; \*\*\*-  $p=0,0001$  pomiędzy S100A9 i S100A8 w grupie CCC

**Tabela 12.** Porównanie wzajemnej ekspresji białek z rodziny S100 w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego u pacjentów z obu grup (test Wilcoxon).

Białko z rodziny S100	Grupa	Średnia ekspresja w błonie śluzowej $\pm$ SD	Białko z rodziny S100	Średnia ekspresja w błonie śluzowej $\pm$ SD	p
S100 (S100B)	ACC	1,18 $\pm$ 0,74	S100A8	5,13 $\pm$ 2,63	0,0004
			S100A9	9,57 $\pm$ 5,39	0,0004
	CCC	3,25 $\pm$ 2,33	S100A8	1,92 $\pm$ 3,17	0,0060
			S100A9	3,29 $\pm$ 3,53	0,6460
S100A8	ACC	5,13 $\pm$ 2,63	S100A9	9,57 $\pm$ 5,39	0,0023
	CCC	1,92 $\pm$ 3,17	S100A9	3,29 $\pm$ 3,53	0,0001

**Objaśnienia:** p – poziom istotności; SD – odchylenie standardowe; czcionką wyboldowaną zaznaczono różnice statystycznie istotne

## **5. Analiza fenotypów komórek nacieków zapalnych w pęcherzyku żółciowym pacjentów z kamiczym zapaleniem narządu**

Przykładowe mikrofotografie **(A-H)** z immunocytochemiczną lokalizacją białek markerowych limfocytów (cząsteczki CD) ujęte zostały w **Tablicę 9**.

Ekspresja błonowa cząsteczek markerowych limfocytów B (CD20) oraz limfocytów T (CD3) oraz ich subpopulacji (CD8 i CD4) była zróżnicowana ilościowo, tak w obu badanych grupach pacjentów, jak i u indywidualnych chorych **(A-E)**.

Najwyraźniejszą reakcję immunocytochemiczną obserwowano w przypadku markera limfocytów B (CD20) **(A, B)** oraz limfocytów T cytotoksycznych, tj. cząsteczki CD8 **(D)**, a naj słabszą – markera limfocytów T pomocniczych - cząsteczki CD4 **(E)**.

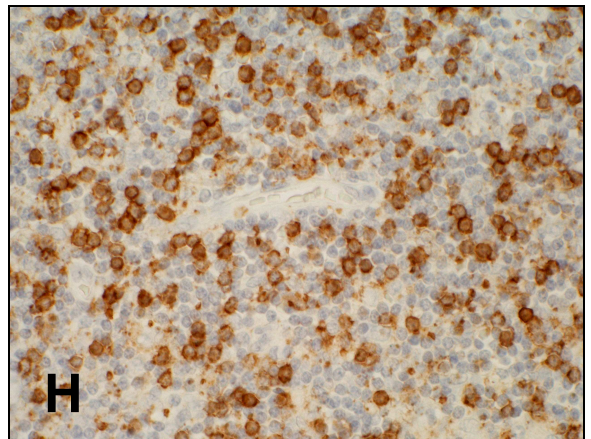
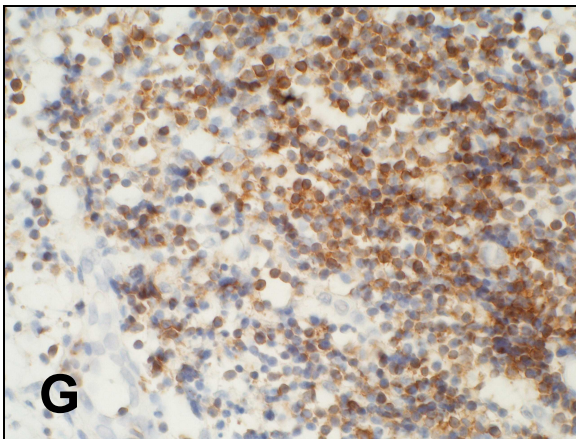
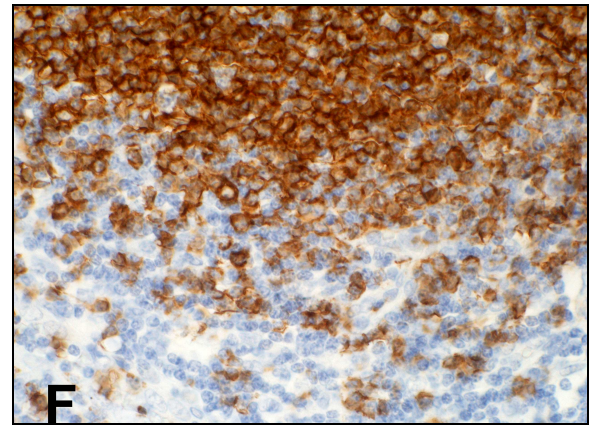
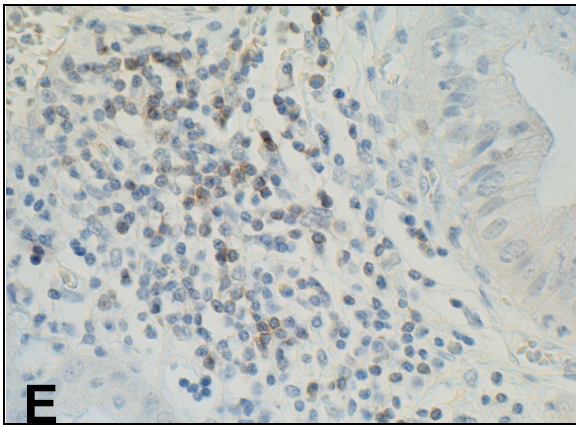
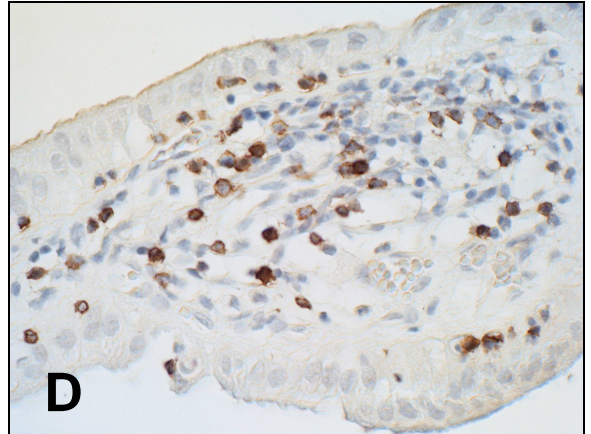
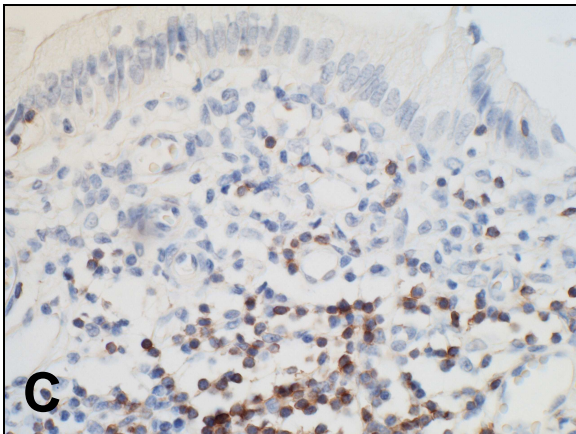
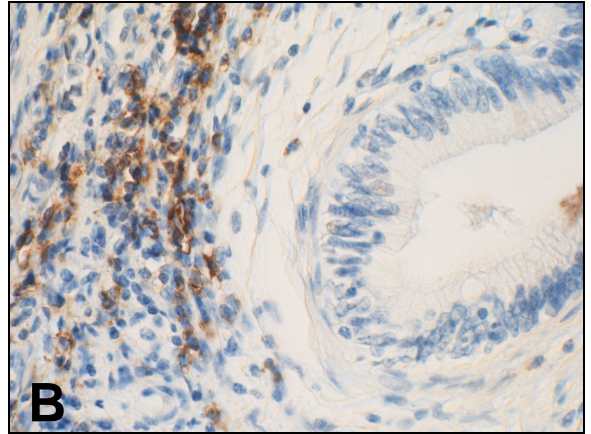
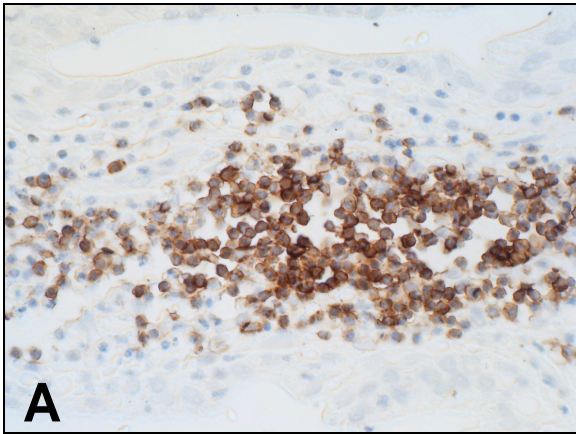
Nie włączono do obliczeń ilościowych intensywnej reakcji obserwowanej w samotnych grudkach chłonnych, a występujących głównie u pacjentów z CCC.

W odczynowych węzłach chłonnych (kontrola pozytywna) szczególnie intensywną reakcję wykazano dla limfocytów B (cząsteczka CD20) **(F)**. Na obwodzie grudek chłonnych liczne były także limfocyty CD3+ **(G)** oraz limfocyty CD8-pozytywne **(H)**. Obserwacja pozytywnej reakcji w narządach limfatycznych służyła jedynie potwierdzeniu jakości stosowanych przeciwciał i nie była poddana analizie ilościowej.

### **5.1. Częstość występowania cząsteczek markerowych limfocytów B i T w grupie ACC**

Pozytywną reakcję immunocytochemiczną na CD20 (marker limfocytów B) w ścianie całego pęcherzyka żółciowego wykazano u 15/16 pacjentów z grupy ACC (94%). Wykrywalność ogólnego markera limfocytów T (CD3) wynosiła 88% (14/16 pacjentów). Pozytywną ekspresję markera limfocytów T cytotoksycznych (CD8) wykazano u 100% chorych (16 osób), a limfocytów T pomocniczych (CD4) – u 13/16 (78%) badanych pacjentów **(Tabela 13)**.





## 5.2. Częstość występowania cząsteczek markerowych limfocytów B i T w grupie CCC i jej podgrupach (młodzi i starsi pacjenci)

Pozytywną reakcję immunocytochemiczną na CD20 (marker limfocytów B) wykazano u 13/35 pacjentów z całej grupy CCC (37%) i było to istotnie mniej w porównaniu z grupą z ostrym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (grupa ACC - 94%) **(Tabela 13)**. Wykrywalność ogólnego markera limfocytów T (CD3) wynosiła 72% (38/53 pacjentów z CCC). Pozytywną ekspresję limfocytów T cytotoksycznych (CD8) wykazano u 100% chorych osób z CCC (34 osoby), a CD4 – jedynie u 9/31 (29%) badanych tej grupy pacjentów. Podobnie jak wykrywalność cząsteczki CD20, również częstość wykrywania pozytywnej ekspresji CD4 była niższa w całej grupie CCC w porównaniu z ACC ( $p=0,0007$ ) **(Tabela 13)**.

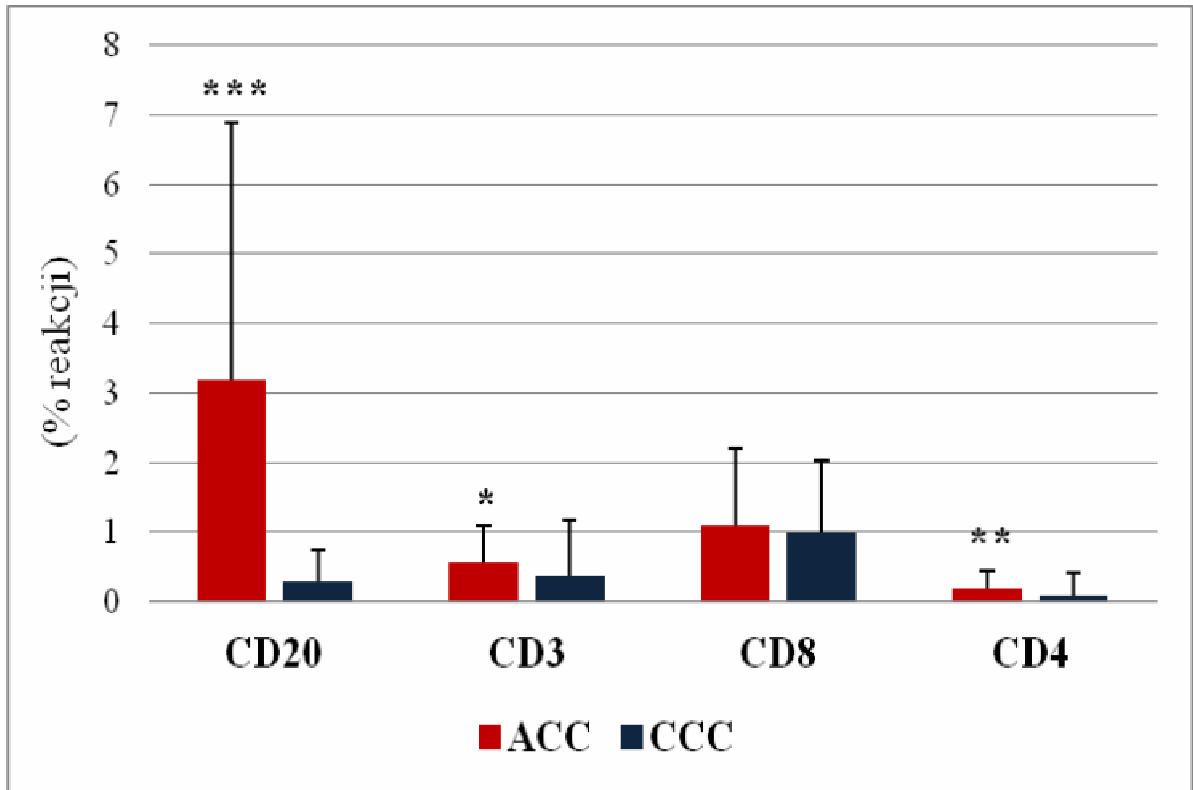
Porównując dwie podgrupy pacjentów z CCC, ekspresję CD20 wykazano u 9/16 (56%) pacjentów młodych, a jedynie u 4/19 (21%) pacjentów starszych, jednak nie była to różnica statystycznie istotna ( $p=0,2034$ ). Ekspresja CD3 występowała istotnie częściej u chorych poniżej 25 r.ż. (20/33 pacjentów) w porównaniu z 50-latkami (18/20 chorych). Z subpopulacji limfocytów T – ekspresję CD8 wykazano w 100% badanych młodych i starszych pacjentów, a ekspresję CD4 – jedynie u 9/17 (53%) pacjentów starszych. Nie wykazano ekspresji CD4 w pęcherzyku żółciowym u żadnego pacjenta młodego z grupy CCC **(Tabela 13)**.

**Tabela 13.** Porównanie częstości występowania cząsteczek markerowych limfocytów B i T u pacjentów z objawowym kamiczym zapaleniem pęcherzyka żółciowego.

Cząsteczka fenotypowa limfocytów	Grupa ACC	Grupa CCC		p testu
		młodzi	starsi	
<b>CD20</b>	94% (n=16)	56% (n=16)	21% (n=19)	0,2034
		37% (n=35)		<b>0,0001</b>
<b>CD3</b>	88% (n=16)	60% (n=33)	90% (n=20)	<b>0,0192</b>
		72% (n=53)		0,1909
<b>CD8</b>	100% (n=16)	100% (n=16)	100% (n=18)	1,000
		100% (n=34)		1,000
<b>CD4</b>	81% (n=16)	0% (n=14)	53% (n=17)	<b>0,0012</b>
		29% (n=31)		<b>0,0007</b>

**Objaśnienia:** W Tabeli podano parametry wyrażone odsetkiem z liczbą przypadków w nawiasie; p – poziom istotności; - wyboldowaną czcionką zaznaczono różnice statystycznie istotne

Porównanie ilościowej ekspresji białek markerowych dla limfocytów w grupie pacjentów z ACC i CCC przedstawia **Rycina 19 i Tabela 14.**



**Rycina 19.** Porównanie ilościowej ekspresji **cząsteczek markerowych limfocytów B i T** w ścianie pęcherzyka żółciowego u pacjentów z ostrym (ACC) i przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (CCC); \*-  $p=0,0351$ ; \*\*-  $p=0,0040$ ; \*\*\*-  $p=0,0001$

**Tabela 14.** Porównanie ilościowej ekspresji markerów fenotypowych limfocytów B (CD20) i limfocytów T (CD3, CD8 i CD4) w badanych grupach pacjentów z ostrym (ACC) i przewlekłym (CCC) kamiczym zapaleniem pęcherzyka żółciowego oraz w podgrupach młodzi vs. starsi pacjenci z CCC (test Manna-Whitney'a).

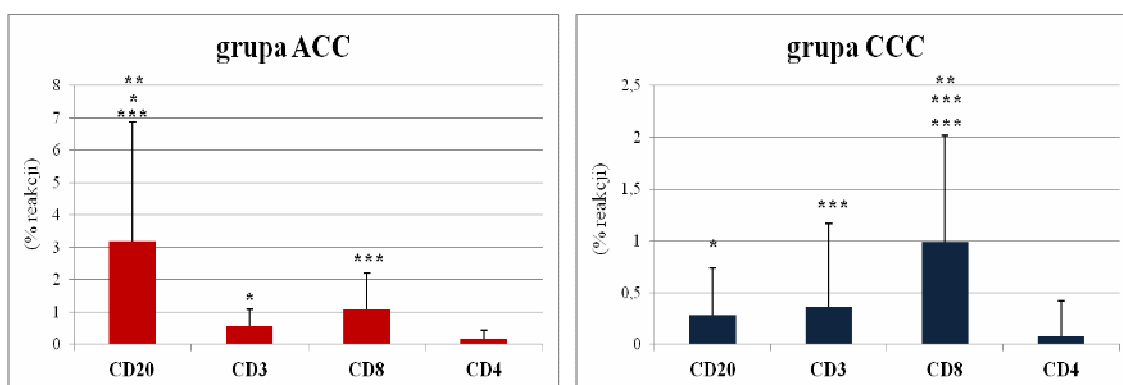
Cząsteczka markerowa limfocytów	Grupa	n	Średnia	SD	Min.	Max.	p testu
<b>CD20</b>	ACC	16	3,19	3,70	0,00	10,62	<b>0,0001</b>
	CCC	35	0,28	0,46	0,00	1,46	
	<i>młodzi</i>	16	0,28	0,45	0,00	1,45	0,2173
	<i>starsi</i>	19	0,27	0,48	0,00	1,46	
<b>CD3</b>	ACC	16	0,56	0,53	0,00	1,62	<b>0,0351</b>
	CCC	53	0,36	0,81	0,00	5,46	
	<i>młodzi</i>	33	0,29	0,42	0,00	1,32	0,5300
	<i>starsi</i>	20	0,47	1,21	0,00	5,46	
<b>CD8</b>	ACC	16	1,09	1,11	0,10	3,80	0,8774
	CCC	34	0,99	1,03	0,14	5,12	
	<i>młodzi</i>	16	0,48	0,26	0,14	1,12	<b>0,0001</b>
	<i>starsi</i>	18	1,44	1,24	0,17	5,12	
<b>CD4</b>	ACC	16	0,18	0,25	0,00	0,94	<b>0,0040</b>
	CCC	31	0,08	0,34	0,00	1,88	
	<i>młodzi</i>	14	0,00	0,00	0,00	0,00	<b>0,0261</b>
	<i>starsi</i>	17	0,14	0,45	0,00	1,88	
<b>CD4/CD8</b>	ACC	16	0,24	0,00	1,92	0,46	<b>0,0024</b>
	CCC	31	0,02	0,00	0,37	0,07	

**Objaśnienia:** p – poziom istotności; SD – odchylenie standardowe; n – liczba pacjentów; czcionką wyboldowaną zaznaczono różnice statystycznie istotne

### 5.3. Porównanie wzajemnej ekspresji markerów fenotypowych limfocytów w obrębie badanych grup pacjentów

U pacjentów z grupy ACC największa ekspresja dotyczyła markera limfocytów B, tj. cząsteczki CD20 i to w porównaniu z ekspresją ogólnego markera limfocytów T (CD3) oraz subpopulacji limfocytów T (CD8 i CD4). Z subpopulacji limfocytów T, istotnie przeważała ekspresja markera limfocytów T cytotoksycznych (CD8) nad ekspresją markera limfocytów pomocniczych (CD4) (**Rycina 20, Tabela 15**).

W grupie z CCC, ekspresja CD20 była istotnie niższa od ekspresji markerów poszczególnych subpopulacji limfocytów T, tj. CD8 i CD4, a podobna do ekspresji ogólnego markera limfocytów T (CD3). Podobnie jak w grupie ACC, także u pacjentów tej grupy większa była ekspresja CD8 w porównaniu z CD4 (**Rycina 20, Tabela 15**). Wskaźnik CD4/CD8 był również istotnie wyższy w grupie ACC w porównaniu z CCC (**Tabela 14**).



**Rycina 20.** Porównanie wzajemnej ekspresji cząsteczek markerowych limfocytów B i T w naciekach zapalnych pęcherzyka żółciowego u pacjentów z obu grup (test Wilcoxon).

\*-  $p=0,0061$  pomiędzy CD20 i CD3 oraz  $p=0,0479$  między CD3 i CD4; \*\*-  $p=0,0494$  pomiędzy CD20 i CD8; \*\*\*-  $p=0,0008$  pomiędzy CD20 i CD4 w obrębie grupy ACC;

\*-  $p=0,0249$  pomiędzy CD20 i CD4; \*\*-  $p=0,0015$  pomiędzy CD8 i CD3; \*\*\* $p=0,0002$  pomiędzy CD8 i CD20,  $p=0,0001$  między CD8 i CD4 oraz  $p=0,0001$  pomiędzy CD8 i CD4;  $p=0,0003$  pomiędzy CD3 i CD4 w obrębie grupy CCC

**Tabela 15.** Porównanie wzajemnej ekspresji cząsteczek markerowych limfocytów B i T w naciekach zapalnych pęcherzyka żółciowego u pacjentów z obu grup (test Wilcoxon).

Marker limfocytów	Grupa	Średnia ekspresja w błonie śluzowej ±SD	Marker limfocytów	Średnia ekspresja w błonie śluzowej ±SD	p testu
<b>CD20</b>	<b>ACC</b>	3,19±3,70	<b>CD3</b>	0,56±0,53	<b>0,0061</b>
			<b>CD8</b>	1,09±1,11	<b>0,0494</b>
			<b>CD4</b>	0,18±0,25	<b>0,0008</b>
	<b>CCC</b>	0,28±0,46	<b>CD3</b>	0,36±0,81	0,6638
			<b>CD8</b>	0,99±1,03	<b>0,0002</b>
			<b>CD4</b>	0,08±0,34	<b>0,0249</b>
<b>CD3</b>	<b>ACC</b>	0,56±0,53	<b>CD8</b>	1,09±1,11	0,1089
			<b>CD4</b>	0,18±0,25	<b>0,0479</b>
	<b>CCC</b>	0,36±0,81	<b>CD8</b>	0,99±1,03	<b>0,0015</b>
			<b>CD4</b>	0,08±0,34	<b>0,0003</b>
<b>CD8</b>	<b>ACC</b>	1,09±1,11	<b>CD4</b>	0,18±0,25	<b>0,0008</b>
	<b>CCC</b>	0,99±1,03	<b>CD4</b>	0,08±0,34	<b>0,0001</b>

**Objaśnienia:** p – poziom istotności; SD – odchylenie standardowe; czcionką wyboldowaną zaznaczono różnice statystycznie istotne

## 6. Ekspresja markera komórek tucznych (tryptaza) oraz makrofagów (CD68) u pacjentów z kamiczym zapaleniem pęcherzyka żółciowego

### 6.1. Ekspresja tryptazy w komórkach tucznych w grupie ACC i CCC

Ekspresję tryptazo-pozytywnych komórek tucznych wykazano u wszystkich pacjentów grupy ACC (100%) i CCC (100%).

Mikrofotografie **(A-H)** przedstawiające lokalizację tryptazy w pęcherzykach żółciowych pacjentów z obu grup przedstawia **Tablica 10**.

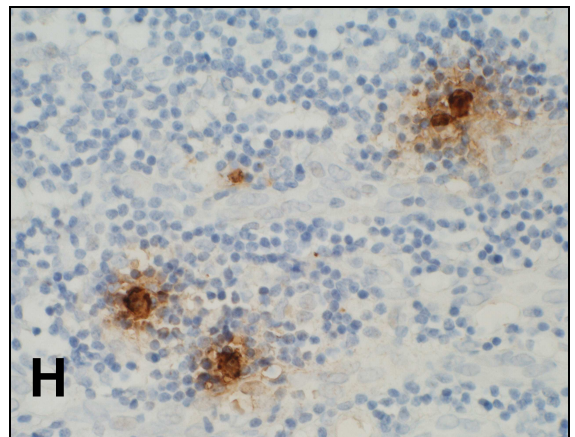
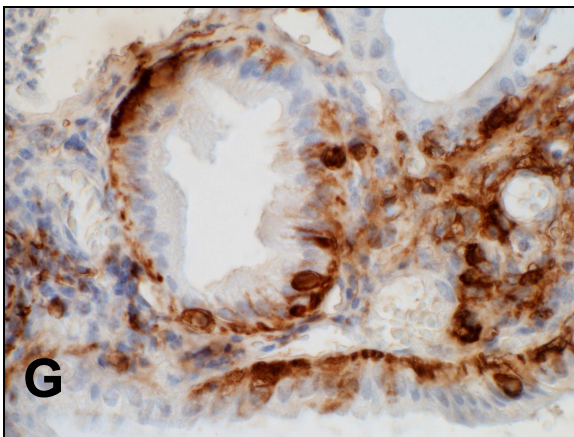
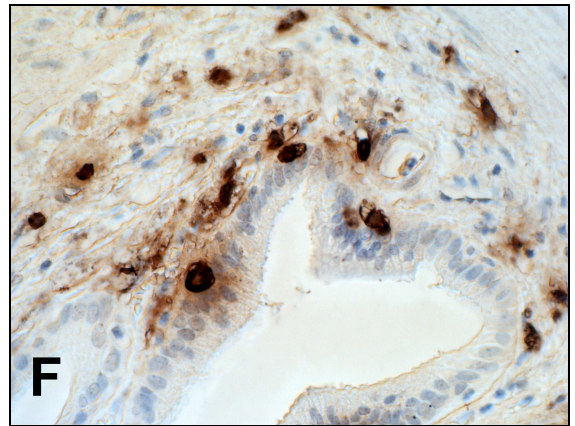
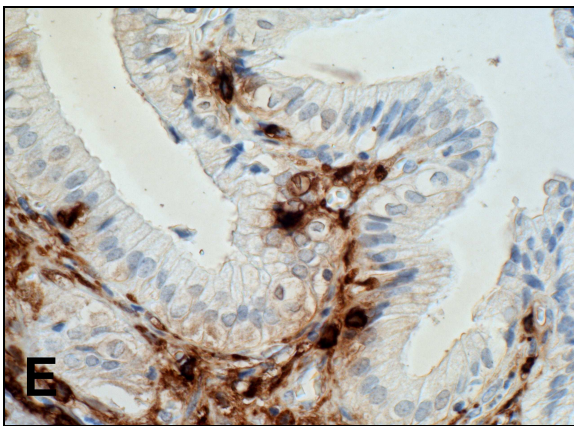
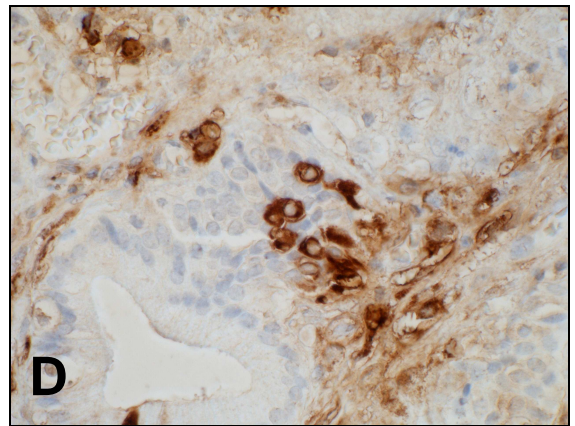
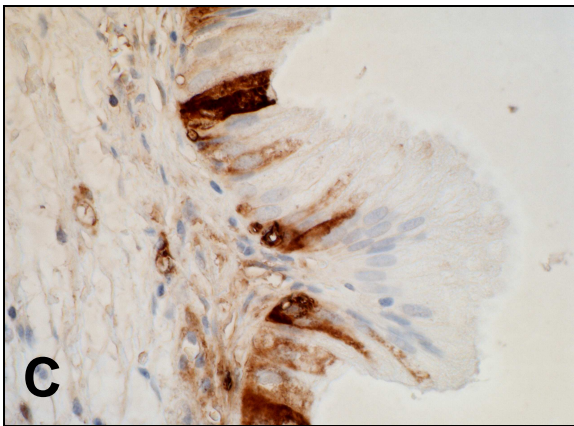
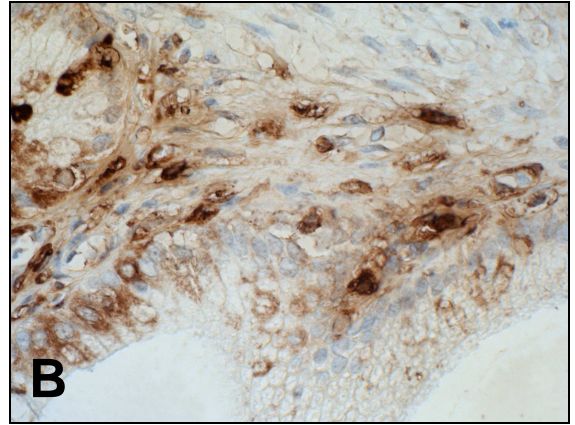
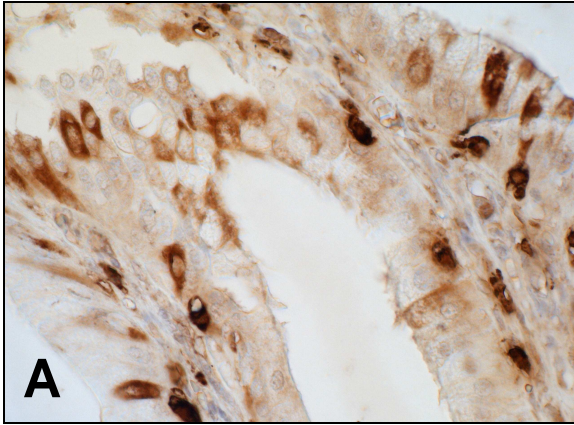
We wszystkich preparatach histologicznych pęcherzyków żółciowych i w materiale tkankowym kontrolnym obserwowano cytoplazmatyczną, często ziarnistą, rozlaną reakcję na tryptazę (produkt reakcji „wylewał się” często poza komórkę) **(A-H)**. Obraz morfologiczny tryptazododatnich komórek przypominał opisywane w piśmiennictwie “sadzone jajka” (ang. *fried eggs*) **(A, D)**. Tryptazo-pozytywne komórki tuczne były rozsiane zarówno w *lamina propria* pęcherzyka żółciowego, jak i występowały wewnątrz nabłonkowo **(B, C)**. Mastocyty obecne w *lamina propria* często towarzyszyły naczyniom krwionośnym oraz zakończeniom nerwowym. Nieliczne komórki tuczne występowały w obrębie nabłonka gruczołów cewkowo-pęcherzykowych **(G)**.

W odczynowym węźle chłonnym (kontrola pozytywna) typowe komórki tryptazododatnie były nieliczne, choć ewidentne i z typową dlań rozlaną reakcją immunocytochemiczną **(H)**.

### 6.2. Ekspresja komórkowa CD68 w grupie ACC i CCC

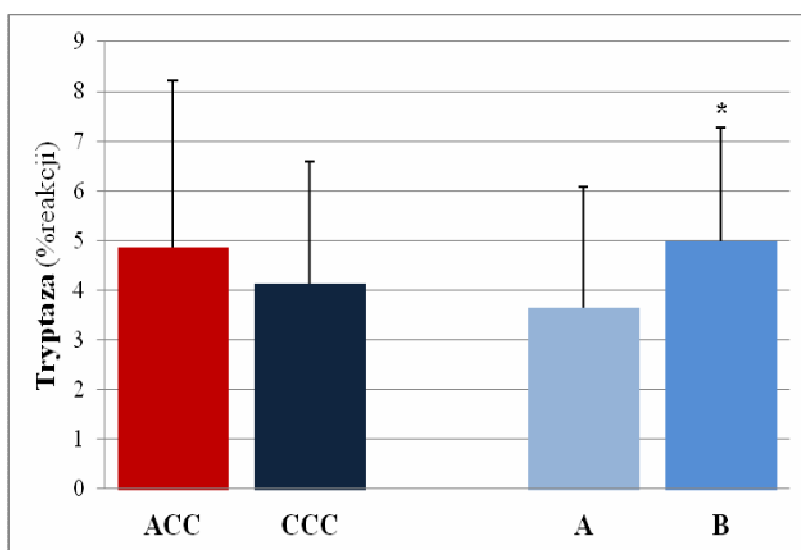
Lokalizację markera makrofagów przedstawiają mikrofotografie **(A-H)** ujęte w **Tablicę 11**. Ekspresję CD68 wykazywano głównie w cytoplazmie monocytów i makrofagów **(A-C)**, w tym także w komórkach piankowatych (ang. *foamy cells*) **(D)**. Częsteczkę tę wykazano u wszystkich pacjentów, niezależnie od grupy. Reakcja immunocytochemiczna na to białko była zazwyczaj silna, niekiedy ziarnista **(A-C)**. Obejmowała komórki w obrębie nacieków w *lamina propria*, ale także usytuowane wewnątrz nabłonkowo, zwłaszcza w uszkodzonych przez proces zapalny, fragmentach nabłonka jednowarstwowego walcowatego **(A, E)**. W odczynowych węzłach chłonnych (kontrola pozytywna) CD68-pozytywne komórki były powiększone, rozsiane, z typowo cytoplazmatyczną reakcją barwną na to białko **(G, H)**.





### 6.3. Porównanie ilościowej ekspresji tryptazy pomiędzy badanymi grupami chorych

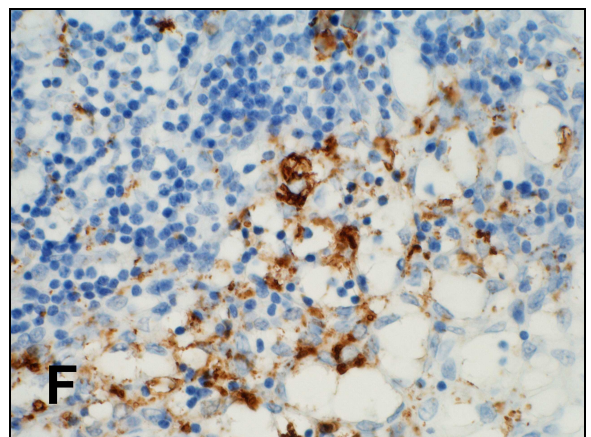
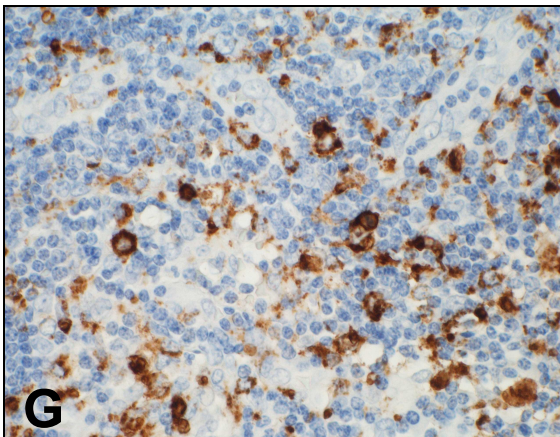
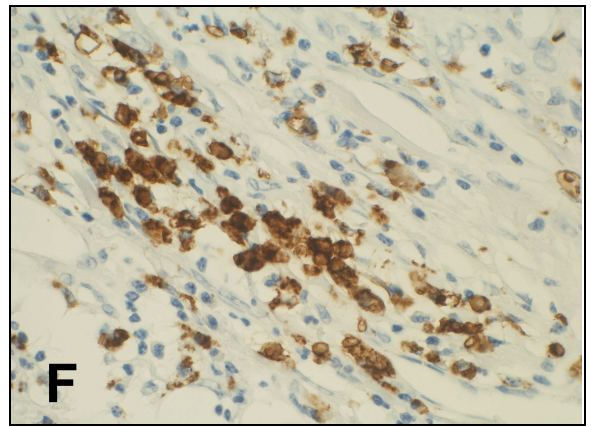
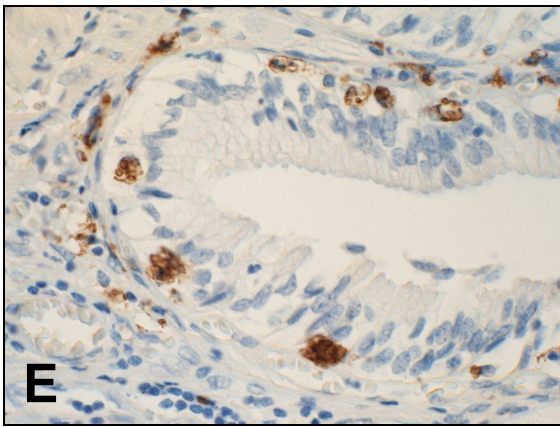
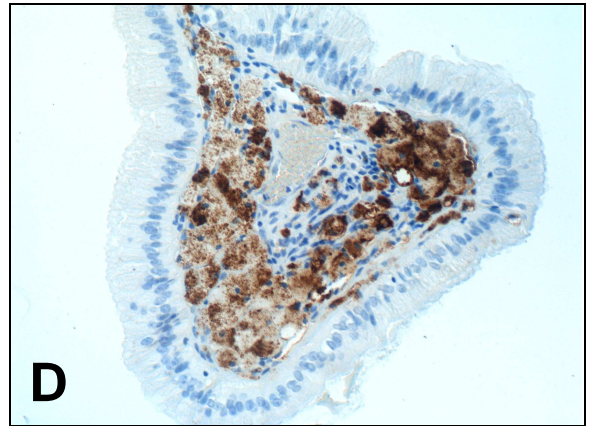
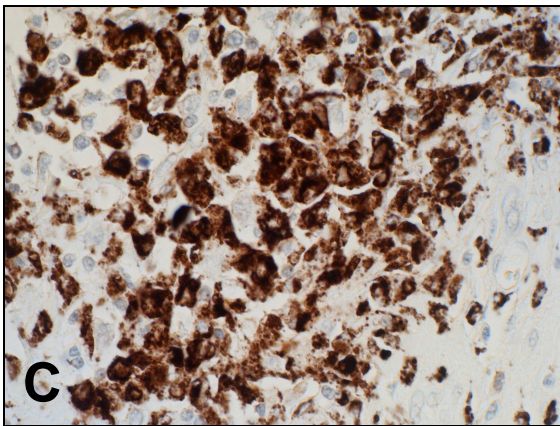
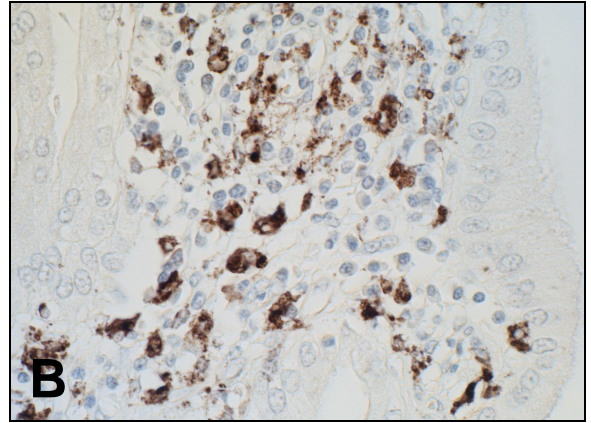
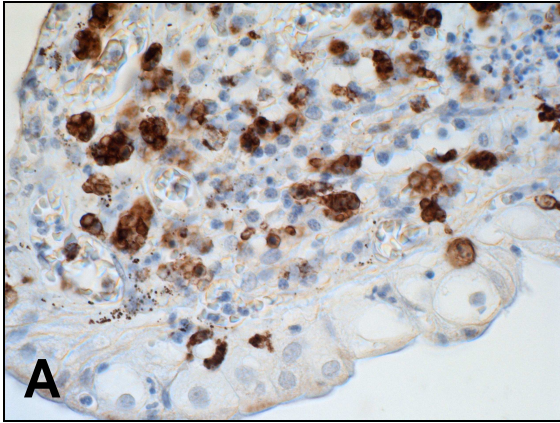
Średnia ekspresja tryptazy w grupie pacjentów z ostrym zapaleniem pęcherzyka żółciowego nie różniła się istotnie od ekspresji tego markera w pęcherzykach żółciowych pacjentów z przewlekłym zapaleniem narządu. Jednakże porównanie podgrupy młodych pacjentów ze starszymi w obrębie grupy CCC, wykazało istotnie więcej tego markera w grupie 50-latków ( $p=0,0390$ ) (**Rycina 21, Tabela 16**).

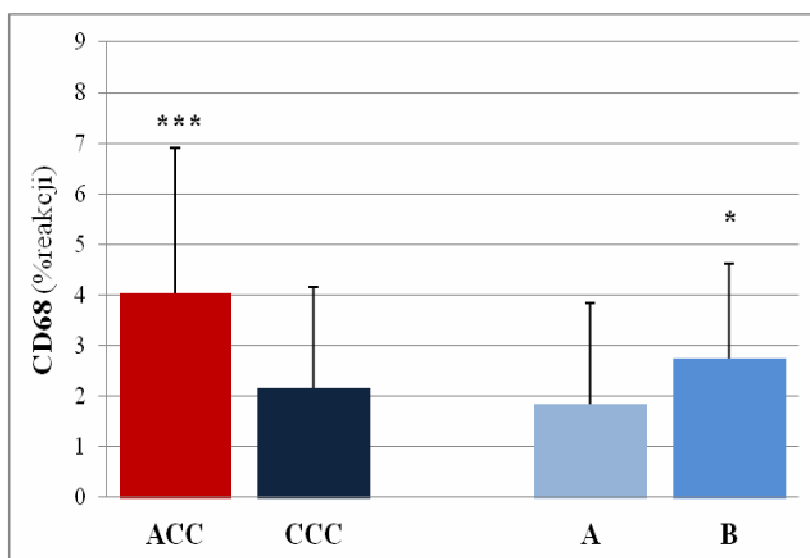


**Rycina 21.** Porównanie ilościowej ekspresji **tryptazy** w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego u pacjentów z ostrym (ACC) i przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (CCC) oraz pomiędzy pacjentami młodszymi (do 25 r.ż.) i starszymi (około 50 lat) z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego; \*-  $p=0,0390$

### 6.4. Porównanie ilościowej ekspresji cząsteczki CD68 pomiędzy grupami

Wykazano istotnie większą ekspresję cząsteczki CD68 (marker makrofagów) w błonie śluzowej u pacjentów z ostrym zapaleniem pęcherzyka żółciowego w porównaniu z analogicznym obszarem u pacjentów z przewlekłym zapaleniem narządu ( $p=0,0009$ ) (**Rycina 22, Tabela 16**). Porównując podgrupę młodszych pacjentów i starszych z CCC wykazano więcej tego białka w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego u starszych chorych ( $p=0,0248$ ) (**Rycina 22, Tabela 16**).





**Rycina 22.** Porównanie ilościowej ekspresji cząsteczki CD68 w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego u pacjentów z ostrym (ACC) i przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (CCC) oraz pomiędzy pacjentami młodszymi (do 25 r.ż.) i starszymi (około 50 lat) z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego; \*- p=0,0248; \*\*\*-p=0,0009

**Tabela 16.** Porównanie ilościowej ekspresji tryptazy (komórki tuczne) oraz cząsteczki CD68 (makrofagi) w badanych grupach pacjentów z ostrym (ACC) i przewlekłym (CCC) kamiczym zapaleniem pęcherzyka żółciowego oraz w podgrupach młodzi vs. starsi pacjenci z CCC (test Manna-Whitney'a).

MARKER komórek tucznych/makrofagów	Grupa	n	Średnia	SD	Min.	Max.	p testu
Tryptaza	ACC	16	4,87	3,35	0,85	11,02	0,5807
	CCC	55	4,13	2,45	0,39	9,94	
	<i>młodzi</i>	35	3,64	2,44	0,39	9,94	0,0390
	<i>starsi</i>	20	4,99	2,28	0,78	9,65	
CD68	ACC	16	4,04	2,86	1,90	12,31	0,0009
	CCC	55	2,17	1,98	0,10	10,29	
	<i>młodzi</i>	35	1,84	1,99	0,13	10,29	0,0248
	<i>starsi</i>	20	2,74	1,88	0,10	5,92	

**Objaśnienia:** p – poziom istotności; SD – odchylenie standardowe; n – liczba pacjentów; czcionką wyboldowaną zaznaczono różnice statystycznie istotne

### 6.5. Porównanie ekspresji tryptazy i CD68 w zależności od płci

Porównanie ekspresji tryptazy (komórki tuczne) oraz CD68 (makrofagi) nie wykazało różnic pomiędzy kobietami i mężczyznami w obrębie każdej z grup. Istotnie większą ekspresją i to jedynie cząsteczki CD68 cechowały się pęcherzyki żółciowe kobiet z ostrym zapaleniem narządu w porównaniu z pż kobiet z grupy CCC. Nie było istotnych zmian w ekspresji żadnego z badanych białek w grupie mężczyzn (**Tabela 17**).

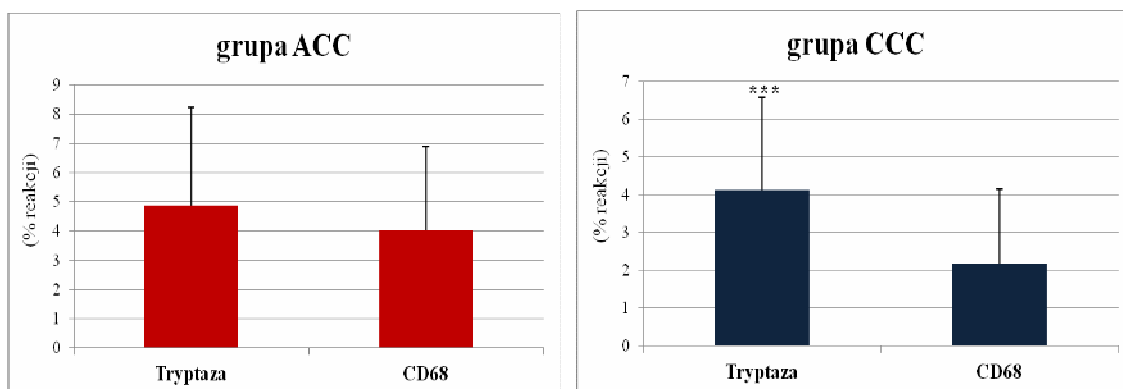
**Tabela 17.** Porównanie ekspresji tryptazy (komórki tuczne) i cząsteczki CD68 (makrofagi) w obu grupach pacjentów z objawowym kamiczym zapaleniem pęcherzyka żółciowego w zależności od płci pacjenta (test Manna-Whitney'a, t-Studenta i/lub Leven'a).

Białko markerowe		n1	Grupa ACC	n2	Grupa CCC	p testu
Tryptaza	♀	7	4,41±3,72	44	4,16±2,53	0,8234
	♂	9	5,23±3,21 <sup>NS</sup>	11	4,02±2,22 <sup>NS</sup>	0,3331
CD68	♀	7	5,10±4,15	44	2,00±1,67	<b>0,0109</b>
	♂	9	3,22±0,81 <sup>NS</sup>	11	2,84±2,93 <sup>NS</sup>	0,2299

**Objaśnienia:** W Tabeli podano wartości średnich±SD (odchylenie standardowe); p – poziom istotności; n1- liczba chorych w grupie ACC; n2- liczba chorych w grupie CCC; NS – różnica nieistotna statystycznie pomiędzy wartością ekspresji białek u kobiet i mężczyzn

### 6.6. Porównanie wzajemnej ekspresji tryptazy i cząsteczki CD68 w obrębie badanych grup pacjentów

Jedynie w grupie z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego wykazano istotnie większą ekspresję tryptazy w porównaniu z ekspresją markera makrofagów, tj. cząsteczki CD68 (**Rycina 23, Tabela 18**).



**Rycina 23.** Porównanie wzajemnej ekspresji **tryptazy i cząsteczki CD68** w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego u pacjentów z obu grup (test Wilcoxon); \*\*\*-  $p=0,0001$

**Tabela 18.** Porównanie wzajemnej ekspresji tryptazy i cząsteczki CD68 w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego u pacjentów z obu grup (test Wilcoxon).

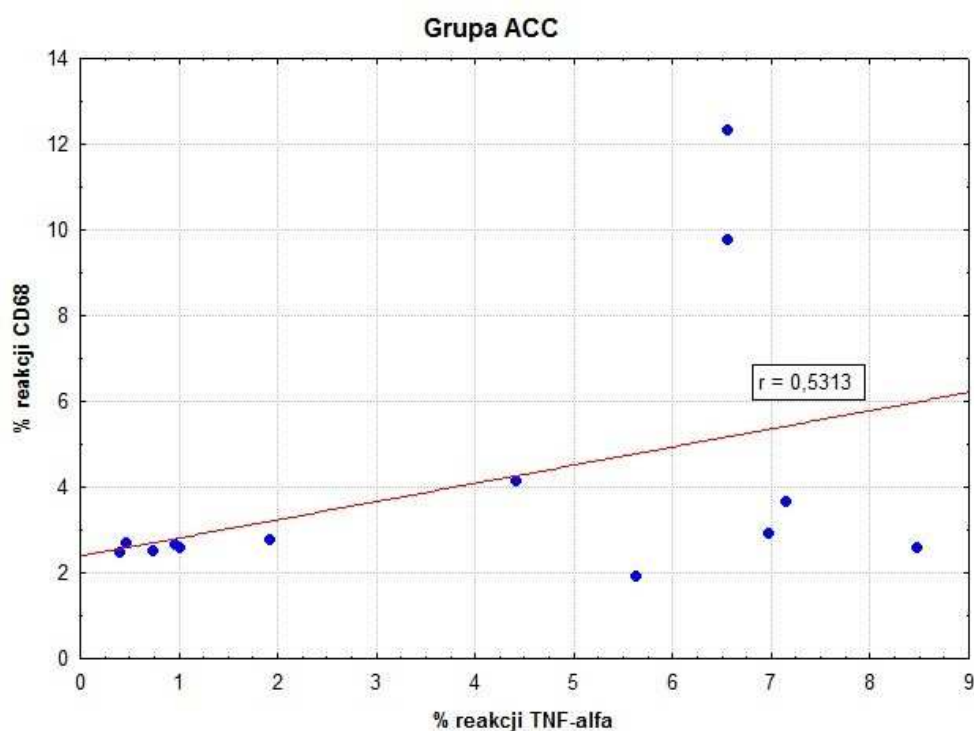
Białko markerowe	Grupa	Średnia ekspresja w błonie śluzowej $\pm$ SD	Białko Markerowe	Średnia ekspresja w błonie śluzowej $\pm$ SD	p testu
Tryptaza	ACC	4,87 $\pm$ 3,35	CD68	4,04 $\pm$ 2,86	0,5694
	CCC	4,13 $\pm$ 2,45	CD68	2,17 $\pm$ 1,98	<b>0,0001</b>

**Objaśnienia:** p – poziom istotności; SD – odchylenie standardowe; czcionką wyboldowaną zaznaczono różnice statystycznie istotne

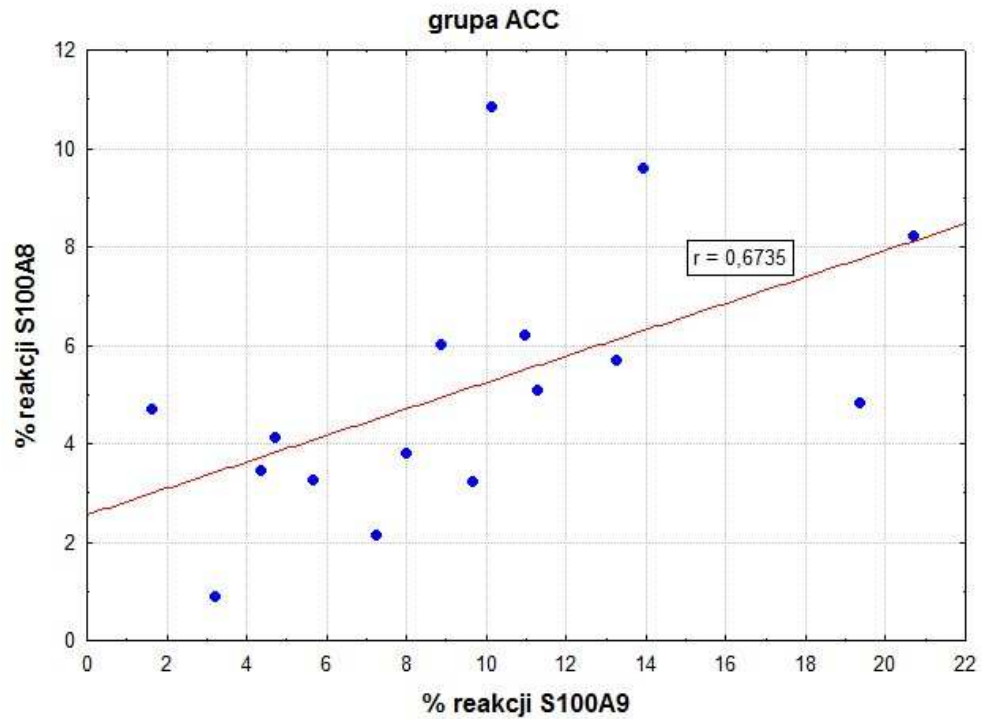
## 7. Korelacje pomiędzy nasileniem ekspresji badanych markerów komórek nacieków zapalnych pęcherzyka żółciowego w grupie ACC

U pacjentów z grupy ACC wykazano wprost proporcjonalne istotne statystycznie zależności między wzajemną ekspresją następujących białek wykrywanych w błonie śluzowej zapalnie zmienionego pęcherzyka żółciowego (Tabela 18; Ryciny 24 i 25):

1. ekspresją TNF- $\alpha$  i ekspresją markera makrofagów (cząsteczka CD68) ( $r=0,5313$ );
2. ekspresją białka S100A8 i S100A9 ( $r=0,6735$ );



**Rycina 24.** Pozytywna korelacja Spearmana między ekspresją TNF- $\alpha$  i cząsteczki CD68 w grupie ACC ( $p<0,05$ );  $r$  – współczynnik korelacji.



**Rycina 25.** Pozytywna korelacja Pearsona między ekspresją białek S100A8 i S100A9 w grupie ACC ( $p < 0,05$ );  $r$  – współczynnik korelacji.

U pacjentów z grupy ACC nie wykazano istotnych statystycznie korelacji Spearmana pomiędzy wzajemną ekspresją cząsteczek markerowych limfocytów B i T badanych w całej ścianie zapalnie zmienionego pęcherzyka żółciowego (**Tabela 19**).



**Tabela 18.** Wyniki korelacji między ilościową ekspresją białek analizowanych w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego (cytokiny prozapalne, tryptaza, cząsteczka CD68 oraz białka z rodziny S100) u pacjentów z grupy ACC.

Marker	IL-1 $\alpha$	IL-6	TNF- $\alpha$	S100	S100A8	S100A9	tryptaza	CD68
IL-1 $\alpha$	-	0,2114	0,4450	0,2206	0,0294	0,3118	0,2765	0,1663
IL-6	0,2114	-	0,2202	0,2054	0,0649	0,1117	-0,1419	-0,0227
TNF- $\alpha$	0,4450	0,2202	-	0,1912	0,1662	0,0858	-0,0411	<b>0,5313</b>
S100	0,2206	0,2054	0,1912	-	-0,1000	-0,0676	0,1824	0,1589
S100A8	0,0294	0,0649	0,1662	-0,1000	-	<b>0,6735</b>	-0,0941	0,4503
S100A9	0,3118	0,1117	0,0858	-0,0676	<b>0,6735</b>	-	0,3559	0,2590
tryptaza	0,2765	-0,1419	-0,1419	0,1824	-0,0941	0,3559	-	0,1737
CD68	0,1663	-0,0227	<b>0,5313</b>	0,1589	0,4503	0,2590	0,1737	-

**Objaśnienia:** wyboldowaną czcionką zaznaczono współczynniki r, dla których  $p < 0,05$ ; korelacje Pearsona dotyczą wzajemnej ekspresji białek z rodziny S100 (S100, S100A8, S100A9); pozostałe to korelacje rang Spearmana.

**Tabela 19.** Wyniki korelacji między ekspresją cząsteczek markerowych (CD) limfocytów B (CD20) i limfocytów T (CD3) i ich subpopulacji (CD8, CD4) analizowanych w ścianie całego pęcherzyka żółciowego u pacjentów z grupy ACC.

Marker	CD20	CD3	CD8	CD4
CD20	-	0,4266	0,0647	0,2943
CD3	0,4266	-	0,3203	0,0795
CD8	0,0647	0,3203	-	0,3376
CD4	0,2943	0,3059	0,3376	-

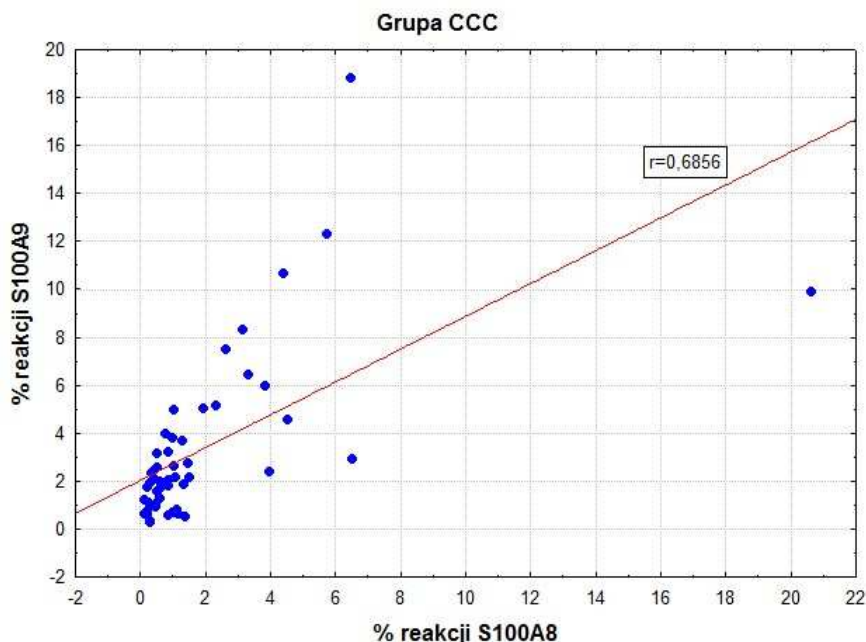
**Objaśnienia:** w Tabeli umieszczono wartości współczynnika korelacji (r) rang Spearmana.

## 8. Korelacje pomiędzy nasileniem ekspresji badanych markerów komórek nacieków zapalnych pęcherzyka żółciowego w grupie CCC

U pacjentów z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (grupa CCC) wykazano wprost proporcjonalne istotne statystycznie zależności między wzajemną ekspresją następujących białek (badanych w *lamina propria* pż) (Tabela 20, Rycina 26):

1. białka S100A8 i ekspresją IL-1 $\alpha$  (współczynnik korelacji Spearmana,  $r=0,3325$ , słaba pozytywna korelacja);
2. białka S100A8 i białka S100A9 ( $r=0,6856$ ) oraz słabą pozytywną korelację białka S100A8 z ekspresją markera makrofagów (CD68) ( $r=0,3527$ );

Słabą ujemną korelację wykazano pomiędzy ekspresją IL-6 i białka S100A8 ( $r=-0,3189$ ) (Tabela 20).



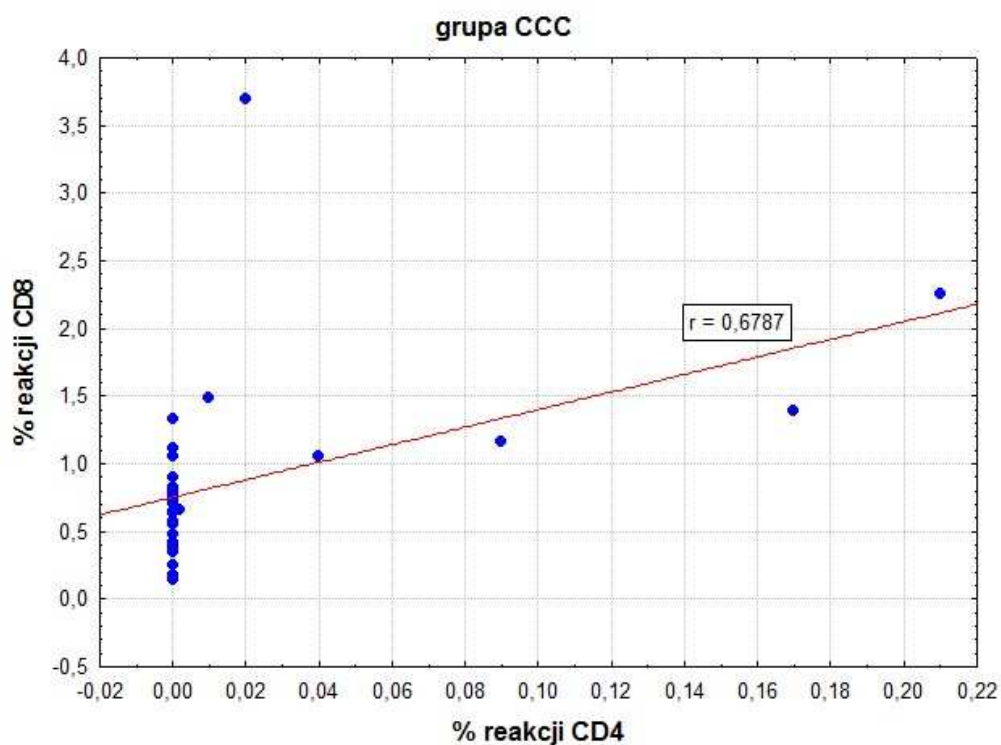
**Rycina 26.** Pozytywne korelacje Spearmana między ekspresją białka S100A8 oraz S100A9 u pacjentów z grupy CCC ( $p<0,05$  we wszystkich przypadkach);  $r$  – współczynnik korelacji rang Spearmana.

**Tabela 20.** Wyniki korelacji między ilościową ekspresją białek analizowanych w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego (cytokiny prozapalne, tryptaza, cząsteczka CD68 oraz białka z rodziny S100) u pacjentów z grupy CCC.

Marker	IL-1 $\alpha$	IL-6	TNF- $\alpha$	S100	S100A8	S100A9	tryptaza	CD68
IL-1 $\alpha$	-	-0,0686	0,0498	0,2545	<b>0,3325</b>	0,2053	0,0317	0,1276
IL-6	-0,0686	-	0,3369	-0,0831	<b>-0,3189</b>	-0,1940	0,2935	-0,1144
TNF- $\alpha$	0,0498	0,3369	-	-0,0638	0,1071	-0,1046	-0,0682	0,1972
S100	0,2545	-0,0831	-0,0638	-	-0,0554	-0,0299	-0,1160	0,1148
S100A8	<b>0,3325</b>	<b>-0,3189</b>	0,1071	-0,0554	-	<b>0,6856</b>	-0,0365	<b>0,3527</b>
S100A9	0,2053	-0,1940	-0,1046	-0,0299	<b>0,6856</b>	-	-0,0251	0,2126
tryptaza	0,0317	0,2935	-0,0682	-0,1160	-0,0365	-0,0251	-	-0,1790
CD68	0,1276	-0,1144	0,1972	0,1148	<b>0,3527</b>	0,2126	-0,1790	-

**Objaśnienia:** wyboldowaną czcionką zaznaczono współczynniki  $r$ , dla których  $p < 0,05$ . Korelacje ekspresji tryptazy i TNF- $\alpha$  to korelacje Pearsona, pozostałe Spearmana.

Biorąc pod uwagę ekspresję cząsteczek fenotypowych limfocytów badanych w całej ścianie pż u pacjentów z grupy CCC, wykazano wysoką pozytywną korelację między nasileniem ekspresji subpopulacji limfocytów T, a mianowicie cząsteczek CD8 i CD4 ( $r=0,6787$ ) (**Tabela 21; Rycina 27**).



**Rycina 27.** Pozytywna korelacja Spearmana między ekspresją cząsteczek markerowych subpopulacji limfocytów T (CD8 i CD4) w grupie CCC ( $p < 0,05$ );  $r$  – współczynnik korelacji Spearmana.

**Tabela 21.** Wyniki korelacji Spearmana między ekspresją cząsteczek markerowych (CD) limfocytów B (CD20) i limfocytów T (CD3) i ich subpopulacji (CD8, CD4) analizowanych w ścianie całego pęcherzyka żółciowego u pacjentów z grupy CCC.

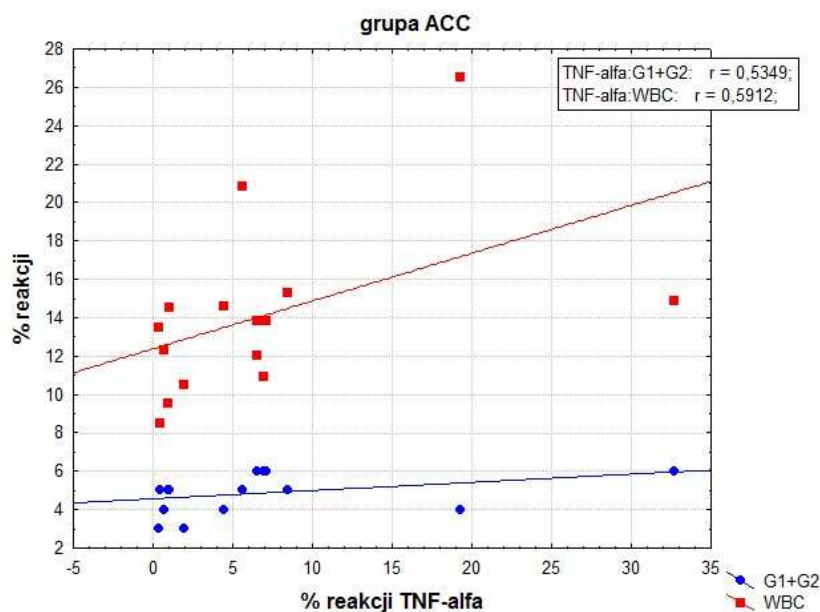
Marker	CD20	CD3	CD8	CD4
<b>CD20</b>	-	-0,1483	-0,1707	-0,1420
<b>CD3</b>	-0,1483	-	0,1669	0,2946
<b>CD8</b>	-0,1707	0,1669	-	<b>0,6787</b>
<b>CD4</b>	-0,1420	0,2946	<b>0,6787</b>	-

**Objaśnienia:** wyboldowaną czcionką zaznaczono współczynniki  $r$ , dla których  $p < 0,05$ .

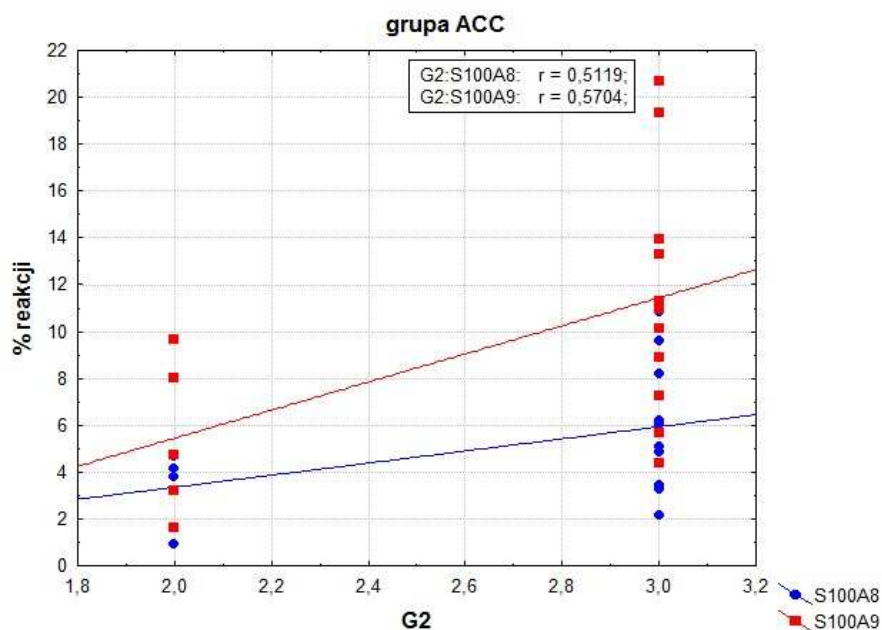
### **9. Zależności między ekspresją białek markerowych, liczbą eozynofiliów w naciekach zapalnych ściany pęcherzyka żółciowego a wybranymi danymi klinicznymi w grupie ACC**

Analiza korelacji badanych w pracy cytokin prozapalnych, tj. IL-1 $\alpha$ , IL-6 oraz TNF- $\alpha$  wykazała istotną statystycznie pozytywną zależność pomiędzy ekspresją czynnika martwicy nowotworów a sumaryczną aktywnością zapalną ściany pęcherzyka żółciowego (G1+G2) ( $r=0,5349$ ) oraz liczbą leukocytów we krwi ( $r=0,5912$ ) pacjentów z ostrym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (**Rycina 28, Tabela 22**). Ponadto ekspresja obu białek S100A8 i S100A9 była wprost proporcjonalna do nasilenia zmian zapalnych w głębszych warstwach ściany pęcherzyka (parametr G2) (**Rycina 29**), nie osiągając istotności statystycznej w obrębie samej błony śluzowej (parametr G1).

W tej grupie pacjentów istotną statystycznie, pozytywną korelację wykazano również pomiędzy ekspresją markera limfocytów T pomocniczych (cząsteczka CD4) a nasileniem zmian zapalnych w błonie śluzowej (parametr G1) i sumarycznym *grading* (G1+G2) (**Tabela 22**).



**Rycina 28.** Pozytywna korelacja Spearmana między ekspresją TNF- $\alpha$  a całkowitym nasileniem zmian zapalnych (G1+G2) oraz liczbą leukocytów w krwi pacjentów z ostrym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (ACC) ( $p < 0,05$ );  $r$  – współczynnik korelacji Spearmana.



**Rycina 29.** Pozytywna korelacja Spearmana między aktywnością zapalną w głębszych warstwach ściany pęcherzyka żółciowego (parametr G2) u pacjentów z ostrym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (ACC) a ekspresją białek S100A8 i S100A9 oraz ( $p < 0,05$  w obu przypadkach);  $r$  – współczynnik korelacji Spearmana.

**Tabela 22.** Wyniki korelacji między ekspresją białek analizowanych w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego (cytokiny prozapalne, tryptaza, CD68), ekspresją markerów fenotypowych komórek nacieków zapalnych, liczbą eozynofików analizowanych w naciekach zapalnych całej ściany pęcherzyka żółciowego a wybranymi danymi klinicznymi pacjentów z grupy ACC.

Białko/ komórki	wiek (lata)	grubość ściany pęcherzyk a (mm)	G1*	G2*	G1+G2*	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	liczba kamieni*	WBC (x10 <sup>9</sup> /l)
IL-1 $\alpha$	0,0619	0,1838	0,0904	0,4241	0,2895	0,2647	- 0,2228	0,3812
IL-6	0,3483	0,3279	0,3191	0,3904	0,4349	0,0528	- 0,3050	0,3899
TNF- $\alpha$	-0,0072	0,0860	0,4259	0,4587	<b>0,5349</b>	0,2699	- 0,0959	<b>0,5912</b>
S100	-0,3717	0,3992	-0,0935	0,0731	-0,0400	0,0676	- 0,3961	0,4636
S100A8	0,3481	-0,4836	0,3012	<b>0,5119</b>	0,4497	0,1588	0,4951	-0,1472
S100A9	0,4307	-0,3616	0,2870	<b>0,5704</b>	0,4528	-0,2824	0,4852	-0,1707
CD20	0,3068	-0,3736	0,2109	- 0,0146	0,1756	0,1971	0,0743	-0,3297
CD3	0,1791	-0,3576	0,1894	0,2055	0,2164	-0,2967	0,4174	-0,3767
CD8	0,2271	0,4625	0,3012	0,3949	0,3773	-0,0353	- 0,0446	0,3385
CD4	-0,0719	0,1109	<b>0,5565</b>	0,1783	<b>0,5030</b>	-0,1359	0,1031	-0,3379
tryptaza	0,1091	0,1552	-0,2917	0,1024	-0,1556	-0,4294	0,0446	-0,0824
CD68	-0,0236	0,2510	0,4585	0,2488	0,4577	-0,0721	0,4360	0,0295
Liczba eozynofików	-0,1141	0,0311	0,0882	- 0,4028	-0,0938	-0,0545	- 0,2570	-0,1489

**Objaśnienia:** wyboldowaną czcionką zaznaczono współczynniki r, dla których  $p < 0,05$ ; \* - parametry oszacowane w skali półilościowej (Materiał I Metody). Korelacje ekspresji BMI oraz ekspresji białka S100, S100A8, S100A9 to korelacje Pearsona, pozostałe Spearmana.

## 10. Zależności między nasileniem ekspresji białek markerowych, liczbą eozynofilów w naciekach zapalnych w ścianie pęcherzyka żółciowego a wybranymi danymi klinicznymi w grupie CCC

U pacjentów z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego analiza korelacji pomiędzy ekspresją markerów białkowych a wybranymi danymi klinicznymi, wykazała raczej słabe pozytywne i/lub negatywne zależności (**Tabela 23**). I tak, analiza korelacji badanych w pracy cytokin prozapalnych z danymi klinicznymi wykazała pozytywną zależność pomiędzy ekspresją IL-1 $\alpha$  oraz białka S100A8 a indeksem masy ciała (BMI) pacjentów. Ekspresja IL-6 negatywnie korelowała z aktywnością zapalną w błonie śluzowej (parametr G1) i całkowitym *grading* (G1+G2) oraz z liczbą leukocytów we krwi. Ekspresja czynnika martwicy nowotworów także była negatywnie skorelowana z nasileniem zmian zapalnych, ale widocznych w głębszych warstwach ściany pęcherzyka żółciowego pacjentów (parametr G2) oraz całkowitym *grading* (G1+G2).

Ekspresja obu białek prozapalnych z rodziny S100, tj. S100A8 i S100A9 była wprost proporcjonalna do nasilenia zmian zapalnych obecnych w głębszych warstwach ściany pęcherzyka (parametr G2) a w przypadku białka S100A8 – dodatkowo także sumarycznego *grading* (G1+G2). Ekspresja białka S100A8 dodatkowo wzrastała wprost proporcjonalnie do BMI pacjentów oraz liczby leukocytów we krwi chorych (obie ostatnie korelacje były bardzo słabe).

Ponadto co ciekawe, wykazano słabą negatywną zależność pomiędzy ekspresją obu białek: S100A8 i S100A9 a liczbą złogów żółciowych u pacjentów z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego.

Obserwowano słabą pozytywną korelację pomiędzy ekspresją cząsteczki CD20 (marker limfocytów B) i grubością ściany pęcherzyka żółciowego, całkowitym *grading* ściany narządu (G1+G2) oraz liczbą leukocytów we krwi pacjentów.

Z wiekiem pacjentów grupy CCC wzrastała liczba obu subpopulacji limfocytów T (CD8 i CD4) w naciekach zapalnych ściany pęcherzyka, a malała liczba eozynofilów w ścianie narządu (**Tabela 23**).



Wraz z nasileniem zmian zapalnych w mięśniówce i surowicówce (parametr G2) pęcherzyka żółciowego tej grupy pacjentów, rosła (prócz wspomnianej już ekspresji białek prozapalnych S100A8 i S100A9), także ekspresja limfocytów pomocniczych CD4 oraz liczba eozynofiliów. Biorąc pod uwagę podział na młodszych i starszych pacjentów w grupie CCC, w obu podgrupach wykazano istotną statystycznie pozytywną korelację (choć dość niską) pomiędzy liczbą eozynofiliów a nasileniem zmian zapalnych w głębszych warstwach ściany pż (parametr G2) i dodatkowo, ale tylko u starszych chorych – także z całkowitym *grading* (**Tabela 24**).

Ekspresja markera makrofagów (cząsteczka CD68) nie korelowała znamienne z dostępnymi w tej pracy danymi klinicznymi. Wykazano jedynie dość słabą negatywną korelację (podobnie jak dla ekspresji białek S100A8 i S100A9) z liczbą kamieni żółciowych u pacjentów z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego ( $r=-0,3569$ ) (**Tabela 23**).

**Tabela 23.** Wyniki korelacji między ekspresją białek analizowanych w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego (cytokiny prozapalne, tryptaza, CD68), ekspresją markerów fenotypowych komórek nacieków zapalnych i liczby eozynofiliów analizowanych w całej ścianie pęcherzyka żółciowego a wybranymi danymi klinicznymi pacjentów z grupy CCC.

Białko/ komórki	wiek (lata)	grubość ściany pęcherzyka (mm)	G1*	G2*	G1+G2*	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	liczba kamieni*	WBC (x10 <sup>9</sup> /l)
IL-1 $\alpha$	0,0713	0,0791	0,2194	- 0,0245	0,1351	<b>0,3680</b>	- 0,1690	0,1749
IL-6	0,1065	0,0253	<b>-0,3419</b>	- 0,1725	<b>-0,3208</b>	-0,0657	- 0,1422	<b>-0,3818</b>
TNF- $\alpha$	0,2092	-0,0420	-0,2408	- <b>0,4145</b>	<b>-0,4143</b>	-0,0199	- 0,1253	-0,1094
S100	-0,0150	0,0860	0,2051	0,1484	0,2404	-0,0023	0,0899	-0,0413
S100A8	0,2515	0,1921	0,2689	<b>0,3598</b>	<b>0,3841</b>	<b>0,3220</b>	- <b>0,4181</b>	<b>0,3001</b>
S100A9	-0,0139	0,1567	0,0876	<b>0,3218</b>	0,2387	0,1266	- <b>0,3394</b>	0,2352
CD20	-0,2229	<b>0,3906</b>	0,3301	0,2876	<b>0,3723</b>	0,0472	- 0,0191	<b>0,3599</b>
CD3	0,1179	-0,0662	0,2442	0,1527	0,2261	0,0540	- 0,0777	-0,0809
CD8	<b>0,5483</b>	-0,1800	0,1825	0,0607	0,1281	0,3362	- 0,1028	0,1600
CD4	<b>0,4099</b>	-0,0572	0,0035	<b>0,3558</b>	0,1619	0,1994	- 0,0341	0,2080
tryptaza	0,2375	-0,2495	0,0697	- 0,0163	0,0309	0,2237	0,1095	-0,0524
CD68	0,2578	0,0725	0,0214	0,2429	0,1677	0,1985	- <b>0,3569</b>	0,1560
Liczba eozynofiliów *	<b>-0,3467</b>	0,1799	0,0452	<b>0,3320</b>	0,2576	-0,1748	0,0701	0,1830

**Objaśnienia:** wyboldowaną czcionką zaznaczono współczynniki r, dla których p<0,05;  
\* - parametry oszacowane w skali półilościowej (Materiał I Metody). Korelacje ekspresji BMI z ekspresją TNF- $\alpha$  i ekspresją tryptazy to korelacje Pearsona, pozostałe Spearmana.

**Tabela 24.** Korelacje Spearmana pomiędzy **liczbą eozynofiliów** analizowanych w całej ścianie pęcherzyka żółciowego a wybranymi danymi klinicznymi pacjentów z podgrup CCC.

Badana podgrupa CCC	wiek (lata)	grubość ściany pęcherzyka (mm)	G1*	G2*	G1+G2*	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	liczba kamieni*	WBC (x10 <sup>9</sup> /l)
<b>A</b>	- 0,1241	0,0749	0,0122	<b>0,3820</b>	0,2990	-0,2085	- 0,0715	0,3304
<b>B</b>	- 0,3724	0,4190	0,3428	<b>0,5526</b>	<b>0,4948</b>	0,3711	0,2588	0,2949

**Objaśnienia:** wyboldowaną czcionką zaznaczono współczynniki r, dla których  $p < 0,05$ ;  
\* - parametry oszacowane w skali półilościowej (Materiał I Metody);

**A** – pacjenci do 25 r.ż.; **B** - pacjenci starsi, ok. 50 r.ż.

## OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

### 1. Dane kliniczne

Analiza podstawowych danych klinicznych wszystkich zebranych w obecnej pracy pacjentów (n=71) wykazała przewagę kobiet (80%) w grupie z przewlekłym *cholecystitis* (grupa CCC) i to zarówno w podgrupie młodych chorych (do 25 r.ż.) oraz wśród 50-latków. Grupa pacjentów z ostrym *cholecystitis* (grupa ACC) była zbyt mała liczebnie, by potwierdzić płęć żeńską jako czynnik ryzyka kamicy żółciowej czy sugestię częstszego występowania powikłania w postaci ostrego *cholecystitis* u kobiet.

Ze względu na specyfikę doboru badanych grup (także pod względem wiekowym w grupie z przewlekłym *cholecystitis*), nie można potwierdzić danych z piśmiennictwa, że wiek chorych jest niezależnym czynnikiem rozwoju kamicy żółciowej (zwłaszcza cholesterolowej) [213, 260].

Biorąc pod uwagę otyłość jako czynnik ryzyka, blisko 40% pacjentów z ostrym *cholecystitis* wykazywało BMI powyżej 30 w porównaniu z ok. 30% pacjentów z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (różnica nieistotna statystycznie). W całej grupie z przewlekłym *cholecystitis* 50-latkowie wykazywali istotnie większy indeks masy ciała w porównaniu z pacjentami młodymi. Wśród młodych pacjentów (do 25 r.ż.) z przewlekłym *cholecystitis* tylko 4 osoby spełniały kryteria otyłości. Trudno odnieść się do obserwacji klinicznych wskazujących na fakt występowania kamicy żółciowej częściej u osób z wieloletnią otyłością, występująca już w młodości. Nie można na podstawie wyników tej pracy poprzeć badań, które wykazały, że otyłość występująca przed 25 r.ż. jest czynnikiem ryzyka kamicy niezależnie od płci [6, 81].

Z uwagi na niewielką liczbę przypadków (2 pacjentów z grupy ACC, 3 z grupy CCC) trudno zinterpretować rolę cukrzycy (towarzyszącej kamicy żółciowej) w patogenezie tego schorzenia i/lub przebiegu klinicznym. Nadciśnienie tętnicze podawało w wywiadzie 44% pacjentów z ostrym i 33% z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego, co jednak nie było różnicą statystycznie istotną.

Biorąc pod uwagę liczbę leukocytów we krwi pacjentów, zgodnie z oczekiwaniem istotnie większą liczbę tych komórek wykazywali pacjenci z ostrym zapaleniem w porównaniu z pacjentami z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego.

Średnia liczba złogów żółciowych u analizowanych w tej pracy pacjentów była istotnie większa u chorych z przewlekłym *cholecystitis* w porównaniu z grupą ACC. Nie wykazano jednak takich różnic pomiędzy młodymi i starszymi pacjentami z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego. Nie obserwowano różnic płciowych w liczbie złogów żółciowych w obrębie każdej z grup, ani pomiędzy kobietami i mężczyznami z grupy ACC i CCC.

Szerokość ściany pęcherzyka żółciowego była podobna w obu grupach pacjentów (ACC i CCC) i wynosiła średnio około 6 mm. Podobny wynik (w granicach 3-6 mm) uzyskali inni autorzy u 71% pacjentów z przewlekłym *cholecystitis*, zanalizowanych pod tym kątem na podstawie obrazów ultrasonograficznych [245].

## **2. Zmiany histopatologiczne**

Jak wspomniano we Wstępie pracy, kamicy pęcherzyka żółciowego najczęściej towarzyszy przewlekłe zapalenie narządu z pogrubieniem i stłuszczeniem ściany, przerostem mięśniówki i inkrustacją kamieniami żółciowymi [184, 199]. Należy również pamiętać, że istnieje od 80-100% zbieżności występowania nowotworów pęcherzyka żółciowego z kamicą tego narządu [121, 140, 236, 244].

Zmiany histologiczne w ocenianym materiale tkankowym były zróżnicowane w zależności od badanej grupy pacjentów (ostre vs. przewlekłe *cholecystitis*), a nawet w obrębie każdej z grup.

W grupie z ostrym zapaleniem pęcherzyka żółciowego pomimo oczywistego rozpoznania histopatologicznego, obraz morfologiczny pęcherzyka żółciowego był bardzo zróżnicowany w zależności od pacjenta. Jako komórki nacieków zapalnych dominowały neutrofile, budujące mniejsze (mikroropnie) lub tworzące bardziej nasilone ogniska ropne. Obecność skupisk z licznymi neutrofilów

świadczyłyby o zniszczeniu zajętej tkanki poprzez enzymy lizosomalne granulocytów obojętnochłonnych i o gromadzeniu wysięku w takiej postaci [236]. W *lamina propria* widoczne były większe lub mniejsze pola martwicy, przekrwienia i liczne krwinkotoki. Neutrofile (czasem degenerujące) infiltrowały niekiedy duże fragmenty nabłonka pęcherzyka. Dawało to obraz „strawionych” obszarów tej części błony śluzowej. Obok martwiczych fragmentów nabłonka obserwowano bardzo nasilone obszary regenerującego (*quasi* atypowego) nabłonka pęcherzyka żółciowego. W *lamina propria* pęcherzyka żółciowego oprócz bardzo licznych neutrofilów, rutynowe barwienie H+E pozwoliło zauważyć także liczne eozynofile. Inne komórki nacieku zapalnego w postaci monocytów/makrofagów, komórek tucznych, komórek dendrytycznych obserwowano rzadziej i dopiero metoda immunocytochemiczna pozwoliła na dokładniejszą charakterystykę fenotypów tych komórek. W całej ścianie pęcherzyka żółciowego (błona śluzowa, mięśniowa i surowicza) obserwowano również rozproszone i/lub w skupiskach nieliczne limfocyty.

Zmiany histopatologiczne w pęcherzyku żółciowym u pacjentów z przewlekłym zapaleniem narządu (grupa CCC) były typowe dla tego schorzenia i w większości zgodne z opisami z piśmiennictwa [118, 155, 199, 236].

Na podkreślenie zasługuje fakt, że opis zmian morfologicznych w tym opracowaniu dotyczy również specyficznej grupy chorych z kamicą pęcherzyka żółciowego, a mianowicie młodych pacjentów (średnia wieku 22±2 lata). Już w rutynowym barwieniu w pęcherzykach żółciowych u znacznego odsetka (blisko 30%) tych młodych chorych obserwowano liczne, bardzo nasilone skupiska eozynofilów, które przeplatały się z mniejszą liczbą innych komórek nacieku zapalnego.

W grupie 50-latków zmiany morfologiczne różniły się od obserwowanych u młodych chorych. U 30% starszych chorych charakterystyczną cechą była obecność makrofagów obładowanych lipidami, zwanych także komórkami piankowatymi (ang. *foamy cells*), tworzących niekiedy polipy cholesterolowe w błonie śluzowej. Ponadto starsi pacjenci częściej niż młodzi wykazywali obecność zmian miażdżycowych w drobnych naczyniach tętniczych ściany pęcherzyka. Nabłonek pęcherzyka zawierał niekiedy w swym składzie komórki

kubkowe wśród morfologicznie niezmiennych walcowatych komórek nabłonka. Częściej u starszych chorych niż u najmłodszych pacjentów z przewlekłym *cholecystitis*, obserwowano przerost gruczołów jasnokomórkowych, wnikanie ich w głębsze warstwy błony mięśniowej pęcherzyka (tzw. rozrost gruczołowo-mięśniowy) oraz obecność komórek kubkowych w nabłonku pęcherzyka. Porównując uzyskane obrazy morfologiczne u badanych w tej pracy pacjentów z opisami z piśmiennictwa, można potwierdzić, że kamicy żółciowej może towarzyszyć zapalenie ostre, przewlekłe, hyperplazja gruczołów i/lub cholesteroloza [13, 58, 118, 155, 236]. „Czyste” przewlekłe zapalenie pęcherzyka żółciowego u pacjentów z kamica żółciową niektórzy z badaczy obserwowali tylko u 50% swoich chorych. Pozostali pacjenci demonstrowali bardziej zróżnicowane zmiany morfologiczne (w tym jeden przypadek raka) [13].

W badanych w tej pracy pęcherzykach żółciowych na szczęście nie obserwowano cech dysplazji nabłonka w żadnej z badanych grup. Jedynie u jednego pacjenta młodego (do 25 r.ż.) i u dwóch starszych pacjentów z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego, obserwowano pojedyncze fragmenty błony śluzowej z przerostem gruczołów cewkowo-pęcherzykowych (tzw. jasnokomórkowych), cechami rozrostu gruczołowo-mięśniowego (ogniska metaplazji nabłonka typu odźwiernikowego) z jednoczesną obecnością komórek kubkowych w nabłonku pęcherzyka żółciowego (metaplazja jelitowa).

Większe nasilenie zmian zapalnych (*grading*) obserwowano u pacjentów z ostrym (grupa ACC) w porównaniu z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego. Oba parametry aktywności zapalnej (G1 i G2) były większe u kobiet z grupy ACC w porównaniu z analogiczną aktywnością zapalną w ścianie pęcherzyka u kobiet z grupy CCC. Nie było istotnych różnic w nasileniu zmian zapalnych pęcherzyka pomiędzy podgrupą młodszych (do 25 r.ż.) i starszych pacjentów z przewlekłym *cholecystitis*. Niektóre dane z piśmiennictwa opisują większą aktywność zapalną u starszych chorych w porównaniu z młodszymi pacjentami i bezkamiczym zapaleniem pęcherzyka żółciowego [4]. Uważa się, że nawet w bezobjawowych kamicach żółciowych obecne są ewidentne zmiany morfologiczne ściany pęcherzyka żółciowego (głównie cechy przewlekłego zapalenia). Cechy nieprawidłowej budowy histologicznej narządu obserwowano

nawet w zdrowych („kontrolnych”) pęcherzykach żółciowych. Są i opinie, że zmiany morfologiczne dotyczące zwłaszcza błony śluzowej mogą być związane po prostu z wiekiem i częściej występują u kobiet [43].

### 3. Analiza wybranych komórek nacieków zapalnych

#### 3.1. Eozynofile

Eozynofile jako komórki nacieków zapalnych widoczne były już w rutynowym barwieniu H+E jako komórki z dwupłętowym jądrem i silnie kwasochłonną cytoplazmą. Jako składniki nacieków zapalnych w pęcherzyku żółciowym obecne były zarówno w *lamina propria*, jak i w głębszych warstwach ściany pęcherzyka. Analiza porównawcza wykazała więcej tych komórek w pęcherzykach żółciowych z ostrym zapaleniem narządu w porównaniu z przewlekłym *cholecystitis*. Więcej eozynofilów demonstrowały w swych naciekach zapalnych w pęcherzykach żółciowych kobiety z grupy ACC w porównaniu z pacjentkami z przewlekłym *cholecystitis*. W podgrupie z przewlekłym *cholecystitis*, istotnie więcej tych komórek wykazano w pęcherzykach żółciowych młodszych pacjentów (do 25 r.ż.) w porównaniu z 50-latkami. Nie można potwierdzić jednego z doniesień literaturowych o 6-krotnej przewadze liczby eozynofilów w naciekach zapalnych pęcherzyka żółciowego u płci męskiej w porównaniu z kobietami z przewlekłym *cholecystitis* [269], gdyż w obecnej pracy wykazano zbliżoną liczbę tych komórek w naciekach zapalnych u kobiet i mężczyzn obu grup.

Obecność licznych eozynofilów w składzie nacieków zapalnych u większości pacjentów z grupy ACC (starsi chorzy, średnia wieku  $58 \pm 18$  lat), jak i u blisko 30% pacjentów młodych (do 25 r.ż.) z przewlekłym *cholecystitis*, wskazuje, że komórki te mogą odgrywać rolę w procesach immunologicznych w kamiczym zapaleniu pęcherzyka żółciowego i to niezależnie od wieku.

W badanych pęcherzykach żółciowych w ostrym zapaleniu narządu nie udało się wykazać istotnych korelacji pomiędzy liczbą eozynofilów w ścianie pęcherzyków a nasileniem zmian zapalnych (*grading*) i pozostałymi dostępnymi



danymi klinicznymi. Może to wynikać z podobnego nasilenia zmian zapalnych w błonie śluzowej i głębszych warstwach ściany pęcherzyka żółciowego i/lub równomiernego rozkładu ilościowego tych komórek u poszczególnych pacjentów z grupy z ostrym *cholecystitis*.

W grupie z przewlekłym *cholecystitis*, wykazano natomiast dwie statystycznie istotne, chociaż słabe zależności. Ustalono, że wraz z wiekiem pacjenta z kamicią żółciową istnieje tendencja do spadku liczby eozynofiliów w naciekach zapalnych pęcherzyka żółciowego ( $r=-0,3467$ ). Natomiast również słabą, ale pozytywną korelację ( $r=0,3320$ ) obserwowano pomiędzy liczbą tych komórek w ścianie pęcherzyka i aktywnością zapalną w głębszych warstwach ściany pęcherzyka (parametr G2). Zależność taka była obserwowana zarówno w grupie pacjentów młodych (do 25 r.ż.), jak i u 50-latków. U starszych pacjentów liczba eozynofiliów korelowała dodatkowo z całkowitą aktywnością zapalną ściany pęcherzyka (parametr G1+G2).

Liczba eozynofiliów w żadnej analizowanej grupie nie była istotnie zależna ani od liczby kamieni żółciowych ani nie korelowała z liczbą leukocytów we krwi pacjenta.

W piśmiennictwie znajdujemy opisy tzw. eozynofilowego *cholecystitis*, które cechuje się obecnością  $\geq 90\%$  eozynofiliów w naciekach zapalnych w ścianie narządu i występuje częściej w bezkamiczym zapaleniu pęcherzyka [44]. Znajdujemy również opisy przypadków klinicznych idiopatycznego eozynofilowego przewlekłego zapalenia pęcherzyka żółciowego u pacjentów z kamicią żółciową [223]. Pewne rozpoznanie eozynofilowego *cholecystitis* autorzy tej pracy odnoszą jednak tylko do 6,4% chorych. W kolejnych 6,4% przypadkach naciekom z eozynofiliów towarzyszyły inne komórki, głównie granulocyty obojętnochłonne i limfocyty [44]. Eozynofilowe zapalenie pęcherzyka żółciowego (i to niezależnie od wieku) najczęściej nie wiązało się z obwodową eozynofilią [178, 219]. Badając zjawisko pojawiania się większej liczby eozynofiliów jako komórek „zapalenia” w różnych narządach u dorosłych pacjentów (średnia wieku ok. 40 lat) wykazały, że lokalne nacieki z tych komórek częściej dotyczą narządów, które najczęściej ulegają „zapaleniu” i wielu z tych chorych nie ma żadnej alergii w wywiadzie. Obwodową eozynofilię

obserwowano tylko u pacjentów z zespołem Löefflera i to u niewielkiego odsetka chorych. Autorzy tych opracowań sugerują, że odczyn zapalny zbudowany z eozynofiliów jest reakcją alergiczną na czynniki uwalniane ze starych ognisk zapalenia w danym narządzie lub tkance [178]. Rola eozynofiliów w *cholecystitis* jest mało poznana w porównaniu z udziałem tych komórek w patogenezie innych chorób przewodu pokarmowego. Są opinie, że eozynofilowe zapalenie pęcherzyka żółciowego może być jednak częstsze niż pierwotnie sądzono i występować u osób z unikalnym typem nadwrażliwości zapalnej na zmienioną w swym składzie żółć [232]. Badania nad rolą granulocytów kwasochłonnych w patogenezie *cholelithiasis*, zwłaszcza u młodych pacjentów z kamicą żółciową, powinny być kontynuowane z zastosowaniem technik immunocytochemicznych oraz wykorzystaniem dokładniejszych metod ilościowego pomiaru tych komórek.

### **3.2. Tryptazododatnie komórki tuczne**

Jako marker komórek tucznych w obecnej pracy wybrano tryptazę, gdyż jako  $\alpha$ -protryptaza białko to podlega konstytutywnej sekrecji i jest ono komórkowo-specyficzne. Proteaza ta może być mierzona także w surowicy krwi i służy jako wskaźnik całkowitej liczby komórek tucznych [225]. Komórki tuczne tryptazododatnie stanowią jedną z subpopulacji mastocytów i cechują się inną kinetyką i produkcją mediatorów, odmienną wrażliwością na czynniki wyzwalające degranulację oraz profilem wydzielanych cytokin (przewaga IL-5 i IL-6) w porównaniu z komórkami tucznymi z jednoczesną ekspresją tryptazy i chymazy [26, 27, 141].

Sugestywny obraz mikroskopowy pozytywnej cytoplazmatycznej reakcji uzyskanej w obecnej pracy (porównanie immunopozytywnych komórek do „sadzonych jaj”), potwierdza opis mastocytów podany w innych opracowaniach [96]. Obserwowano również obecność wewnątrznałonowo zlokalizowanych komórek tucznych. Te zaś obecne w *lamina propria* często lokalizowały się w pobliżu naczyń i zakończeń nerwowych. Lokalizacja komórek tucznych w obecnej pracy jest zgodna z opisami innych autorów, którzy stosowali do jej wykazywania także techniki histochemiczne oraz wykorzystując obrazy

z mikroskopu elektronowego [105, 132, 163, 247]. W nabłonku bydłowego pęcherzyka żółciowego wykazano dwa typy komórek z cytoplazmatycznymi ziarnistościami. Badania ultrastrukturalne potwierdziły, że jednymi z nich były właśnie komórki tuczne, które migrują z *lamina propria* w kierunku nabłonka [163]. Badania histochemiczne zaś pozwoliły na wykazanie cytoplazmatycznych ziarnistości zawierających heparynę i aminy biogenne. Obserwacje świetlno-mikroskopowe oraz na poziomie ultrastrukturalnym pokazały, że mastocyty na drodze diapedezy wędrują z tkanki łącznej pęcherzyka żółciowego poprzez błonę podstawną i nabłonek do jego światła, po drodze ulegając degranulacji. Badania biochemiczne u bydła i owiec pokazały wysoką korelację pomiędzy liczbą komórek tucznych i ilością heparyny wykrywanej w różnych obszarach tego narządu [247].

Choć prace dokumentujące obecność mastocytów we wszystkich warstwach ściany pęcherzyka żółciowego są przekonujące, różnice dotyczą liczby tych komórek czy aktywności enzymów związanych z funkcją komórek tucznych w *cholelithiasis* [105, 132]. Wykazano obecność esterazo-pozytywnych komórek stanowiących dużą część nacieku zapalnego, z jednoczesnym obniżeniem aktywności tego enzymu w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego z przewlekłym *cholecystitis* [132]. Wykazanie silnej aktywności innej esterazy sugeruje, zdaniem tych badaczy, że powstawanie kamieni cholesterolowych wiąże się najprawdopodobniej ze specyficznym wzorem izoenzymów esterazy. Modulująco na aktywność esteraz *in vitro* wpływały także kwasy żółciowe [132].

Obecne badania w pęcherzykach żółciowych pacjentów obu głównych grup (ACC vs. CCC) dotyczyły tryptazy i nie wykazały istotnej różnicy ilościowej w ekspresji tego markera komórek tucznych pomiędzy pacjentami. Natomiast istotnie większą ekspresję tego białka (a pośrednio i komórek tucznych) notowano u 50-latków w porównaniu z młodymi pacjentami z grupy CCC. Nie było różnic płciowych w ekspresji tryptazododatnich komórek tucznych. Nie można więc potwierdzić jednej z obserwacji, która wykazała 4-krotnie więcej mastocytów w ścianie zapalnie zmienionego pęcherzyka żółciowego u mężczyzn w porównaniu z kobietami z przewlekłym *cholecystitis* w przebiegu objawowej kamicy żółciowej [269]. Należy jednocześnie przypomnieć, że badania obecne dotyczyły analizy ekspresji tryptazy w samej błonie śluzowej

(nabłonek i *lamina propria*), a nie w całej ścianie pęcherzyka żółciowego, jak u wspomnianych autorów [269].

Biorąc pod uwagę korelacje pomiędzy liczbą komórek tłuszcznych a nasileniem zmian zapalnych i/lub włóknieniem w drogach żółciowych wyniki badań są niejednoznaczne [71, 88, 92].

W badaniach obecnych nie udało się wykazać istotnej statystycznie korelacji pomiędzy ekspresją tryptazy a aktywnością zapalną pęcherzyka żółciowego oraz pozostałymi danymi klinicznymi pacjentów obu grup. Nie można więc potwierdzić danych z piśmiennictwa o zwiększonej liczbie komórek tłuszcznych w mniej nasilonych zmianach (w tzw. minimalnych zmianach) w *cholelithiasis* [105], ani tych z badań, które opisują zwiększoną liczbę mastocytów w porównaniu z kontrolą w zaostrzeniach i przewlekłym stwardniającym zapaleniu dróg żółciowych [88]. Większą liczbę tych komórek w *lamina propria* pęcherzyka żółciowego wykazano także w objawowej kamicy w porównaniu z zaburzeniami motoryki dróg żółciowych (tzw. dyskineza żółciowa) [71]. Natomiast brak istotnych korelacji pomiędzy liczbą mastocytów a zmianami histologicznymi i/lub wykładnikami klinicznymi wykazano w uchyłkowatości jelita grubego [119].

Udział mastocytów w patogenezie chorób pęcherzyka żółciowego może obejmować różne mechanizmy patofizjologiczne, opisywane w innych jednostkach chorobowych, takie jak: degranulacja komórek, uwalnianie śluzu *via* histamina i receptory H2 oraz produkcja prostaglandyn czy wielofunkcyjnych cytokin [26, 85, 105]. Komórki tłuszczne zawierają liczne czynniki chemotaktyczne, które mogą być odpowiedzialne za akumulację licznych eozynofików w naciekach zapalnych obserwowanych w przewlekłym *cholecystitis* [69] i eozynofilowym *gastroenterocolitis* [125]. Wiadomo, że komórki tłuszczne odgrywają rolę w prawidłowym funkcjonowaniu błon śluzowych człowieka i w patogenezie licznych chorób [96, 119, 137]. Są zaangażowane w wiele biologicznych odpowiedzi ustroju, jak choćby reakcji natychmiastowej (anafilaktycznej), odpowiedzi przeciwpasożytniczej i przeciwnowotworowej, niespecyficznych reakcjach immunologicznych, procesie włóknienia i angiogenezy, tkankowym remodelowaniu i gojeniu ran [26, 85].

Określenie dokładnej roli komórek tłuszcznych w kamiczym zapaleniu pęcherzyka żółciowego wymaga kontynuacji badań, także z wzięciem pod uwagę konkretnej subpopulacji mastocytów i technik badawczych zastosowanych do ich oceny.

### **3.3. CD68-pozytywne makrofagi/monocyty**

Obecność cząsteczki CD68 posłużyła w obecnej pracy do wykazania przede wszystkim monocytołów/makrofagów. Cząsteczka ta ulega silnej ekspresji przede wszystkim w ziarnistościach cytoplazmy (specyficzna dla lizosomów) i słabiej na błonach komórkowych [61]. Obserwację tę potwierdzają wyniki obecnej pracy. Monoklonalne przeciwciała zastosowane w pracy (klon PG-M1) silnie barwią oporny na utrwalanie wewnątrzcytoplazmatyczny epitop cząsteczki, podlegający selektywnej ekspresji we wszystkich makrofagach organizmu człowieka oraz liniach komórkowych z makrofagów oraz komórek mieloidalnych [61].

Analiza ilościowa komórkowej ekspresji CD68 w ramach obecnego opracowania wykazała ciekawe i zróżnicowane wyniki w zależności od typu zapalenia pęcherzyka żółciowego. I tak, istotnie więcej CD68-pozytywnych komórek obserwowano w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego u pacjentów z ostrym w porównaniu z przewlekłym *cholecystitis*. Ponad dwukrotnie większą ekspresję tego markera wykazano w pęcherzykach żółciowych kobiet z grupy ACC w porównaniu z kobietami z grupy CCC. Nie notowano takich różnic ilościowych wśród mężczyzn obu grup. Nie wykazano również różnic w ekspresji CD68 u kobiet i mężczyzn z danym typem zapalenia pęcherzyka żółciowego. Inne prace opisują dwukrotnie większą liczbę makrofagów u mężczyzn w porównaniu z kobietami [269]. Można jedynie częściowo odnieść się do tych wyników, gdyż obecne badania dotyczą ekspresji CD68 tylko w obrębie błony śluzowej pęcherzyka żółciowego, a nie całej ściany zmienionego zapalnie narządu.

Pionierskie badania z lat 80-tych XX wieku, głównie z zastosowaniem metod histochemicznych, ujawniły obecność (obok wspomnianych mastocytów) także licznych makrofagów w ścianie pęcherzyka żółciowego [105]. Badanie

aktywności  $\alpha$ 1-antytrypsyny (marker monocytów/makrofagów i komórek tucznych) i barwienie błękitem toluidyny (mastocyty) pozwoliło na wykrycie makrofagów w prawidłowej i zapalnie zmienionej (przewlekły proces) błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego [8, 132]. Istotnie więcej makrofagów obserwowano w zmianach „minimalnych” pęcherzyka żółciowego niż w długotrwałym przewlekłym *cholecystitis* [105].

Obecne badania wykazały różnice w ekspresji markera makrofagów także pomiędzy młodymi i starszymi chorymi z CCC. Istotnie większą ekspresję CD68 mieli starsi pacjenci (50-latkowie) w porównaniu z młodymi chorymi. Również u 6/20 starszych pacjentów wykazano charakterystyczne cechy cholesterolozy z obecnością licznych *foamy cells*, które również wykazywały silną pozytywną reakcję immunocytochemiczną na CD68. Jak podają źródła literaturowe cholesteroloza pęcherzyka żółciowego charakteryzuje się „kosmkowatą” hiperplazją błony śluzowej z nadmierną akumulacją cholesterolu i jego estrów wewnątrz makrofagów, które przyjmują formę komórek piankowatych (ang. *foamy cells*) [236]. Geneza powstawania *foamy cells* nie jest poznana. Niektórzy z autorów sugerują, że w fagocytozie antygenów *E. coli* uczestniczy receptor „zmiatacz” (ang. *scavenger receptor*) klasy A i w wyniku tego procesu następują typowe dla tych komórek zmiany [209]. W przewlekłym procesie zapalnym określanym jako *xanthogranulomatous inflammation*, który charakteryzuje obecność ziarnistych, kwasochłonnych, PAS-pozytywnych histiocytów w początkowych stadiach choroby oraz szczególnie nasiloną akumulacją *foamy* makrofagów i aktywowanych komórek plazmatycznych, obecne są również ogniska ropne i krwotoczne [42]. Zapalenie pęcherzyka żółciowego określane jako *xanthogranulomatous* obserwowano w ok. 4,2% przypadków wszystkich usuwanych pęcherzyków [170]. W badaniu histologicznym występują liczne ogniska *foamy cells* oraz limfocytów. Obserwowano przy tym zmienną liczbę wielojądrzastych komórek olbrzymich, granulocytów oraz komórek fibroblasto-podobnych. Badając pochodzenie *foamy cells*, potwierdzono, że znaczna część *foamy cells* ma cechy morfologiczne i funkcjonalne monocytów/makrofagów, m. in. ekspresję cząsteczki CD68 [170]. Podtypami limfocytów obecnych w towarzystwie *foamy cells* były limfocyty CD4 i CD8 w proporcji 1:2. Barwienia podwójne ukazały

przyleganie limfocytów T do makrofagów lub do *foamy cells*. Autorzy ci sugerują udział odpowiedzi typu komórkowego o charakterze nadwrażliwości typu opóźnionego w patogenezie *xanthogranulomatous cholecystitis* [170].

W pęcherzykach żółciowych badanych w obecnej pracy, komórkami CD68-pozytywnymi były przede wszystkim monocyty i makrofagi oraz *foamy cells*, ale przypuszczalnie słabą reakcją na to białko wykazywały także inne komórki nacieków zapalnych, liczne zwłaszcza w ostrym *cholecystitis*. Wyższa ekspresja antygenu CD68 (a tym samym większa akumulacja makrofagów i monocytów) w ostrym *cholecystitis* świadczyłaby o znaczącym udziale tych komórek w reakcjach odpornościowych (pierwsza linia obrony) w odpowiedzi na czynnik mechaniczny (kamień żółciowy), chemiczny czy wtórne zakażenie bakteryjne [236]. Ponadto rolą tych komórek jest usuwanie na drodze fagocytozy lokalnie nagromadzonych, częściowo zdegenerowanych komórek "zapalenia", w tym komórek tucznych. Rola makrofagów jest więc krytyczna nie tylko w inicjacji odpowiedzi zapalnej, ale także we "wchłonięciu" nacieku zapalnego, czyli późniejszej fazie ostrego zapalenia [271]. Nie można wykluczyć u badanych w tej pracy pacjentów, że ostre zapalenie pęcherzyka żółciowego nałożyło się, przynajmniej u części chorych na istniejące zapalenie przewlekłe i było *de facto* zaostreniem procesu przewlekłego.

Więcej CD68-pozytywnych komórek w porównaniu z prawidłową błoną śluzową opisano w aktywnych fazach innych przewlekłych zapalnych chorób przewodu pokarmowego (m.in. w chorobie Crohna i *colitis ulcerosa*) [205].

Niektóre prace zajmujące się badaniem lokalnej odpowiedzi immunologicznej u pacjentów z ostrym *cholecystitis*, ujawniły osłabienie zarówno odpowiedzi typu humoralnego, jak i komórkowego u tych chorych, opóźnienie przejścia fazy „neutrofilowej” do „mononuklearnej” i wzrost aktywności fagocytarnej w miejscu zapalenia [222]. Ilościowa przewaga neutrofilów (która będzie opisana w dalszej części Dyskusji) oraz makrofagów (CD68+) w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego z ostrym *cholecystitis* badanej w tej pracy, może przynajmniej częściowo potwierdzać te obserwacje.

### 3.4. S100-dodatnie komórki dendrytyczne

W zmianach zapalnych w *cholelithiasis* obok makrofagów, także komórki dendrytyczne jako komórki prezentujące antygen, mogą propagować lokalną i to antygenowo-specyficzną, odpowiedź immunologiczną.

Do oceny komórek dendrytycznych, w obecnej pracy zastosowano poliklonalne przeciwciała anti-S100, które demonstrują najsilniej białko S100B (typowe dla komórek dendrytycznych), słabiej białko S100A1 i najslabiej białko S100A6 (tzw. kalcyklinę). Białko S100A1 obecne jest przede wszystkim w neuronach, a kalcyklinę mogą produkować także komórki nabłonkowe i fibroblasty [112].

W obecnych badaniach S100-dodatnie komórki dendrytyczne i pojedyncze komórki zwojowe w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego wykazano u wszystkich pacjentów obu grup. Z zastosowaniem metody wizualizacji przestrzennej większą ekspresję S100 wykazano (i to u obu płci) w grupie z przewlekłym w porównaniu z ostrym *cholecystitis*. Natomiast w pęcherzykach żółciowych kobiet i mężczyzn z danej grupy (ACC i CCC) komórkowa ekspresja S100B była zbliżona. Nie wykazano istotnych korelacji pomiędzy ekspresją białka S100B a aktywnością zapalną i pozostałymi danymi klinicznymi w żadnej z analizowanych grup pacjentów. Nie odnotowano również zależności pomiędzy ekspresją tego białka a ekspresją innych markerów komórek nacieków zapalnych i/lub cytokin prozapalnych.

Brakuje danych z piśmiennictwa, aby skonfrontować te wyniki badań. Opisy dotyczące chorób pęcherzyka żółciowego są unikalne. Pokazano S100-dodatnie komórki Langerhansa w nowotworze tego narządu [273]. W innych chorobach przewodu pokarmowego, np. w celiakii opisano większą ekspresję białka S100B i obecność jego mRNA w porównaniu z jelitami zdrowych pacjentów czy będących na diecie bezglutenowej [59]. Obecność białka S100B badano w biopsjach dwunastnicy, a źródłem komórkowym białka były głównie jelitowe komórki zwojowe. W badaniu tym zademonstrowano indukujący wpływ białka S100B na wzrost syntezy tlenu azotu. W chorobie trzewnej także gliadyna powodowała wzrost mRNA S100B [59]. Obecność białek S100B i S100A6 wykazywano również w przestrzeni pozakomórkowej. I tak, białko S100B znajduje się w surowicy krwi oraz płynie mózgowo-rdzeniowym, a kalcyklina (S100A6) występuje w płynie owodniowym [112]. Szczególnie istotna jest zewnątrzkomórkowa funkcja białka S100B w układzie



nerwowym, przyrównywana do działania cytokin. W niskich stężeniach białko S100B wykazuje działanie troficzne, a w wysokich – efekt toksyczny na komórki nerwowe [112]. Sugerowane podobieństwo działań białka S100B do działania cytokin wskazuje na potencjalną jego rolę także w stanach zapalnych układu nerwowego [112].

### **3.5. Limfocyty B i T oraz ich subpopulacje**

W świetle aktualnej wiedzy, w odpowiedzi immunologicznej typu humoralnego główną rolę odgrywają wspomagane przez limfocyty Th2 limfocyty B (i wydzielane przez nie przeciwciała), a w odpowiedzi typu komórkowego – limfocyty Th1 (i wydzielane przez nie cytokiny) oraz makrofagi i limfocyty T cytotoksyczne [111]. Badania nad rolą czynników immunologicznych w litogenezie są wciąż prowadzone i obejmują różne modele. Skomplikowany model na myszach z transferem limfocytów T i B oraz zakażenia *Helicobacter pylori* z jednoczesnym zastosowaniem diety litogennej przez 6 tygodni wykazały, że krytyczną rolę w tworzeniu kamieni cholesterolowych odgrywają limfocyty T, a nie limfocyty B. Odpowiedź immunologiczna, która rozwinęła się w stosowanych eksperymentach ujawniła wzrost ekspresji genów dla mucyn w pęcherzyku żółciowym i lokalnej akumulacji tych glikoprotein w pęcherzyku żółciowym [161]. Ponadto wykazano, że limfocyty T i obecność kryształów cholesterolu indukowały genową ekspresję cytokin prozapalnych w pęcherzyku żółciowym, co także może mieć znaczenie patogenetyczne [161]. Uważa się więc, że nabyta odporność i proces zapalny są kluczowymi czynnikami w powstawaniu kamieni cholesterolowych, a nie jedynie wynikiem powstawania kamieni żółciowych [161].

Badania nad udziałem limfocytów w ostrych i przewlekłych chorobach dróg żółciowych, przynoszą niespójne wyniki [25, 106]. Niektóre dotyczą badań w surowicy krwi, inne lokalnej obecności tych komórek. I tak, u starszych i najstarszych pacjentów z ostrym zapaleniem pęcherzyka żółciowego obserwowano spadek liczby limfocytów T (oraz ich aktywności), spadek liczby limfocytów B i stężenia IgG przy wzroście IgM oraz IgA w surowicy krwi. Obserwowano także osłabienie niespecyficznego mechanizmu obronnych [25]. Z kolei badania statusu immunologicznego u pacjentów z przewlekłymi

zapalnymi schorzeniami dróg żółciowych, również wykazały redukcję liczby limfocytów T oraz ich subpopulacji w surowicy krwi, spadek stężenia składników dopełniacza i lizozymu. W odróżnieniu od wyników poprzedniej pracy, obserwowano wzrost liczby limfocytów B, surowicznych poziomów IgG, IgM, krążących kompleksów immunologicznych oraz autoprzeciwciał skierowanych m. in. przeciwko tkankom pęcherzyka żółciowego [106]. Wykazano wzrost wrażliwości limfocytów na antygeny tkankowe w ostrej fazie choroby. Obecność kamieni w pęcherzyku żółciowym, współwystępowanie zapalenia pęcherzyka żółciowego wraz z aktywnym zapaleniem wątroby lub trzustki powodowały jeszcze większe zmiany jakościowe i ilościowe w komponentach układu immunologicznego [106].

Badania obecne dotyczą oceny cząsteczek fenotypowych limfocytów (pośrednio także liczby limfocytów) w całej ścianie zapalnie zmienionych pęcherzyków w ostrym i przewlekłym kamiczym *cholecystitis*. Wykazały one różnice najpierw w ogólnej częstości tkankowego występowania markerów limfocytów B i T w pęcherzyku żółciowym chorych z obu grup. U pacjentów z ostrym *cholecystitis* (starsi chorzy w porównaniu z grupą CCC) znacząco częściej w porównaniu z grupą CCC, wykrywano obecność markera limfocytów B (cząsteczka CD20), a wśród subpopulacji limfocytów T – cząsteczki CD4. Przeprowadzając badania ilościowe, potwierdzono również większą immunocytochemiczną ekspresję markera limfocytów B (CD20+) oraz ogólnego markera limfocytów T (cząsteczka CD3) w ścianie pęcherzyka pęcherzyka żółciowego pacjentów z ostrym w porównaniu z przewlekłym *cholecystitis*. Większy w grupie ACC był także współczynnik ekspresji CD4/CD8 w porównaniu z pacjentami z przewlekłym *cholecystitis*. Można jedynie częściowo odnieść uzyskane wyniki do danych z piśmiennictwa [25, 106], gdyż inni autorzy oceniali liczbę tych komórek w surowicy i nie były to badania dotyczące *stricto* kamicy pęcherzyka żółciowego. Niektórzy autorzy oceniający zmiany immunologiczne u chorych z przewlekłym *cholecystitis*, wykazali spadek liczby limfocytów T, a wzrost liczby limfocytów B oraz ich aktywności w tym typie kamiczego zapalenia pęcherzyka [133]. Dane literaturowe na temat lokalnej oceny fenotypu komórek, w tym subpopulacji limfocytów są niestety nieliczne. Oceniają one zazwyczaj wiele różnych komórek nacieku zapalnego i to w bardziej nasilonych zmianach, jak we wspomnianym

*xanthogranulomatous cholecystitis* [170]. Jeden z autorów badał lokalną produkcję immunoglobulin w ścianie pęcherzyka żółciowego. Wykazał zróżnicowane pod względem funkcji komórki plazmatyczne, produkujące różne klasy przeciwciał w odmiennych formach *cholecystitis* [80]. Tzw. „nieżytowemu” zapaleniu pęcherzyka żółciowego towarzyszyła aktywacja plazmocytów w ścianie narządu i produkcja wszystkich klas immunoglobulin. W „destrukcyjnych” formach *cholecystitis*, obserwował obniżoną liczbę plazmocytów i zmniejszoną syntezę IgA oraz nieproporcjonalny doń wzrost syntezy IgM i IgG. Również w tym typie zapalenia pęcherzyka obecne były liczne kompleksy immunologiczne (IgM-IgG oraz IgG-IgG) w ścianie naczyń krwionośnych i okołonaczyniowym zrębie łącznotkankowym [80].

Badając rozkład subpopulacji limfocytów T w obecnej pracy, tj. ekspresję cząsteczki CD8 (limfocyty cytotoksyczne/regulatorowe) i CD4 (limfocyty pomocnicze) wykazano także różnice między grupami. Obecność ekspresji CD8 wykazano u 100% pacjentów w obu grupach chorych (niezależnie od podgrupy), a częstość wykrywania komórek CD4-pozytywnych była większa w ostrym zapaleniu pęcherzyka żółciowego w porównaniu z przewlekłym *cholecystitis*. Ilościowa ekspresja cząsteczki CD8 była zadziwiająco porównywalna w ostrym i przewlekłym *cholecystitis*, a większą ekspresję CD8 wykazano u 50-latków w porównaniu z młodymi pacjentami. Ekspresja CD4 choć ogólnie niewielka, istotnie większa była w grupie z ostrym zapaleniem pęcherzyka żółciowego i również większa u starszych w porównaniu z pacjentami do 25 r.ż. Analiza porównawcza wzajemnej ekspresji wszystkich markerów limfocytów badanych w każdej z analizowanych grup, wykazała istotną przewagę limfocytów B w ostrym zapaleniu pęcherzyka żółciowego, a w przypadku przewlekłego *cholecystitis* - przewagę limfocytów T (CD8+) nad innymi limfocytami (oraz dodatkowo słabą pozytywną korelację ekspresji cząsteczki CD20 z liczbą leukocytów we krwi pacjentów). Z aktywnością zapalną pęcherzyka żółciowego, zarówno w grupie z ostrym, jak i przewlekłym *cholecystitis* korelowała ekspresja cząsteczki CD4 (limfocyty pomocnicze). U pacjentów z przewlekłym *cholecystitis* obserwowano ponadto pozytywną korelację pomiędzy wzajemną ekspresją obu subpopulacji limfocytów T (CD4 i CD8). Co ciekawe ekspresja obu cząsteczek CD8 i CD4 korelowała

pozytywnie również z wiekiem pacjenta z tej grupy ( $r=0,5483$ ;  $r=0,4099$ , odpowiednio).

Podsumowując tę część badań należy ustosunkować się do obecności różnych typów komórek nacieków zapalnych w ostrym i przewlekłym zapaleniu pęcherzyka żółciowego.

U badanych w ramach obecnej pracy pacjentów z kamiczym zapaleniem pęcherzyka żółciowego, czynnikiem wywołującym miejscową reakcję zapalną była najprawdopodobniej obecność złogów żółciowych, a nie zakażenie bakteryjne. Wyniki te mogą potwierdzić udział różnych typów komórek, z przewagą neutrofilów, eozynofilów, makrofagów oraz limfocytów (głównie B) w przebiegu ostrej, nieswoistej reakcji zapalnej [83, 128]. Oczywiście w fazie tej również obecne były tryptazododatnie komórki tuczne, S100-pozytywne komórki dendrytyczne oraz limfocyty T i ich subpopulacje (CD8, CD4). Ostre zapalenie narządu prawdopodobnie nakładało się, przynajmniej w części przypadków, na zapalenie przewlekłe (obecność limfocytów), co zdarza się w *cholelithiasis* [199]. Należy również wspomnieć o udokumentowanym „fizjologicznym” zasiedleniu przez limfocyty (w tym także o obecności samotnych grudek chłonnych) w wielu częściach ściany przewodu pokarmowego, które regulują odpowiedź immunologiczną na antygeny (nie tylko patogennne) dostające się do światła narządu [141].

W pęcherzykach żółciowych badanych w tej pracy i to niezależnie od typu zapalenia, można potwierdzić obecność licznych samotnych grudek chłonnych oraz niewielkich ognisk limfocytów we wszystkich warstwach ściany pęcherzyka żółciowego, w tym także pojedynczych komórek rozproszonych wśród komórek walcowatych nabłonka. Wykazano, że w fizjologii limfocytami śródnabłonkowymi są głównie limfocyty T CD8+, natomiast większość limfocytów T w *lamina propria* to limfocyty T CD4+ [141]. Jeśli chodzi o limfocyty B obecne w blaszce właściwej błony śluzowej przewodu pokarmowego (i być może także pęcherzyka żółciowego) są nimi głównie limfocyty B1, które mogą krążyć pomiędzy jamą otrzewnej i błoną śluzową z pominięciem krwi. Stanowią one ważny element pierwotnego układu odporności, który uczestniczy w szybkiej, mało specyficznej obronie przeciw patogenom [141].

Można sądzić, że w wyniku mechanicznego drażnienia wewnętrznej ściany pęcherzyka żółciowego przez kamienie żółciowe i/lub wtórnego przedostania się antygenów bakteryjnych do wnętrza narządu (czego nie da się wykluczyć u badanych w tej pracy pacjentów), doszło do aktywacji licznych receptorów na komórkach nabłonka pęcherzyka żółciowego. Zakażenie bakteryjne jest zwykle zjawiskiem wtórnym w ostrym *cholecystitis* i zdarza się szczególnie u cukrzyków [199]. Czynniki wyzwalające ostrą reakcję zapalną (lub zaostrzenie przewlekłej) prowadzą do pobudzenia osiadłych leukocytów tkankowych, makrofagów i mastocytów, które rozpoczynają produkcję wazoaktywnych mediatorów zapalenia (aminy biogenne, PAF, TNF- $\alpha$ , IL-1) oraz chemoatraktantów [128, 152]. Pod wpływem wzrostu przepuszczalności naczyń krwionośnych, dochodzi także do wysięku osocza. Produkowane przez osiadłe leukocyty cytokiny prozapalne (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) oraz chemokiny prowadzą do inicjacji następnych etapów zapalenia jakim jest przyciągnięcie z naczyń krwionośnych do tkanki objętej zapaleniem, leukocytów „zapalnych”: granulocytów, makrofagów i komórek dendrytycznych [128, 152]. Jako pierwsze ściągane są neutrofile, a kilkanaście godzin później także makrofagi i komórki dendrytyczne [83]. W migracji komórek żernych z krwi do narządów objętych stanem zapalnym uczestniczą wyspecjalizowane żyłki postkapilarne z wysokim śródbłonkiem (HEVs) [246]. Żyłki o takiej morfologii obserwowano także w ścianie pęcherzyków żółciowych badanych w tej pracy. „Ściągnięte” do miejsca zapalenia makrofagi i neutrofile (oraz inne komórki) zaczynają produkcję dalszych cytokin oraz licznych chemokin. W odpowiedzi typu humoralnego biorą udział limfocyty B (zwłaszcza B1), wytwarzające przeciwciała (głównie klasy IgM) [83]. W zapaleniu ostrym makrofagi gromadzą się w ciągu pierwszych 48 godzin, jednakże po ustaniu tego procesu albo obumierają, albo wędrują drogą naczyń chłonnych do węzłów chłonnych [236].

W zapaleniu przewlekłym, którego długość nie jest łatwa do określenia, odmienny (od zapalenia ostrego) jest także skład nacieku zapalnego [236]. Stan ten rozwija się, gdy patogen (lub inna przyczyna, np. kamień żółciowy) nie zostanie wyeliminowany, a w jego usuwanie zaangażowane zostają oprócz makrofagów (dominujących w drugiej fazie zapalenia ostrego), także limfocyty [128]. Jak wiadomo w zapaleniu przewlekłym przeważają makrofagi, limfocyty

i często plazmocyty. W zapaleniu przewlekłym aktywne zapalenie, uszkodzenie tkanki (z ewentualną martwicą) i procesy gojenia zachodzą równocześnie [236]. Mogą zachodzić fazy kolejnego uszkodzenia i reakcji zapalnej, dochodzi do zapalenia wytwórczego, neoangiogenezy i proliferacji fibroblastów z włóknieniem i bliznowaceniem narządu [236]. Na poziomie tkanki objętej procesem zapalnym, utrzymuje się rekrutacja i akumulacja makrofagów, które mogą syntetyzować liczne czynniki, biorące udział w zapaleniu i obronie przed szkodliwymi czynnikami. Limfocyty biorą udział w immunologicznych i nieimmunologicznych procesach. Sądzi się, że w wielu zapaleniach przewlekłych nadal uczestniczy duża liczba granulocytów obojętnochłonnych [236].

U badanych w tej pracy pacjentów z przewlekłym *cholecystitis* znamienne przewagę ilościową makrofagów (CD68+) mieli pacjenci starsi w porównaniu z młodymi (do 25 r.ż.). Świadczyłoby to o dłuższym trwającym procesie zapalnym towarzyszącym kamicy w tej podgrupie chorych i potwierdzałoby kluczową rolę makrofaga w tej fazie zapalenia. Podobnie u starszych pacjentów z grupy z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego wykazano więcej tryptazododatnich komórek tucznych w błonie śluzowej w porównaniu z młodymi chorymi (do 25 r.ż.). W całej grupie z przewlekłym *cholecystitis* obserwowano jednak przewagę tryptazododatnich mastocytów nad CD68-dodatnimi makrofagami, choć ilościowa ekspresja tryptazododatnich komórek była podobna w grupie z ostrym i przewlekłym *cholecystitis*. Komórki tuczne o tym fenotypie uczestniczą więc w obu fazach kamiczego zapalenia pęcherzyka żółciowego. Ekspresja białka S100B (komórki dendrytyczne) była większa w przewlekłym *cholecystitis* w porównaniu z ostrym zapaleniem narządu. Ekspresja markerów limfocytów T i B w ścianie zapalnie zmienionych pęcherzyków w badanych grupach pacjentów była zróżnicowana zarówno jeśli chodzi o wykrywalność jak i nasilenie ekspresji cząsteczek fenotypowych tych komórek. W ostrym zapaleniu narządu przeważały limfocyty B nad pozostałymi populacjami limfocytów T, a w przewlekłym *cholecystitis* dominowały limfocyty T (CD8+).

Nowością tej części pracy jest ocena ilościowa ekspresji białek (odgrywających kluczową rolę w reakcji zapalnej w kamiczym pęcherzyku żółciowym),

z zastosowaniem nowowczesnej metody wizualizacji przestrzennej. Po raz pierwszy w tym opracowaniu wykazano lokalizację i ilościowo zanalizowano ekspresję białka S100B (komórki dendrytyczne) w kamiczym *cholecystitis*. Ekspresja tego białka była ilościowo znacznie większa w przewlekłym zapaleniu pęcherzyka żółciowego w porównaniu z ekspresją w błonie śluzowej w ostrym *cholecystitis*, co sugeruje że komórki dendrytyczne odgrywają rolę zwłaszcza w tej fazie zapalenia narządu. Poznanie roli komórek dendrytycznych w lokalnej odpowiedzi komórkowej w zapaleniu pęcherzyka żółciowego wymaga kontynuacji badań, także z zademonstrowaniem ich aktywacji (ekspresja białek MHC klasy I i II, produkcja cytokin np. IL-12) oraz pokazaniem czy są to komórki migrujące czy różnicują się w miejscu zapalenia [177].

#### **4. Ekspresja cytokin prozapalnych**

Z badań nad patogenezą *cholelithiasis* wynika, że zapalenie pęcherzyka żółciowego i wzmożona sekrecja śluzu należą do istotnych cech kamicy cholesterolowej i barwnikowej u człowieka i zwierząt [192]. Z modelu zwierzęcego wynika, że zapalenie pęcherzyka żółciowego jest wczesną zmianą w procesie formowania kamieni żółciowych. Zastosowanie diety litogennej i/lub głodówki u szczurów powodowało zwiększony *turnover* komórek błony śluzowej i ich złuszczenie do światła pęcherzyka żółciowego [158]. W przewlekłych chorobach przewodu pokarmowego (w tym w *cholelithiasis*) obserwowano szczególnie duży wzrost surowiczych stężeń cytokin prozapalnych (w tym IL-1 i IL-6) [251]. Maksymalny wzrost stężenia IL-1 $\beta$  oraz IL-6 dotyczył wczesnych, zaś TNF- $\alpha$  późniejszych faz choroby [251].

##### **4.1. Interleukina 1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ )**

Badania własne wykazały lokalizację tej cytokiny prozapalnej przede wszystkim w komórkach nabłonka pęcherzyka żółciowego, którą potwierdzono również w kontroli pozytywnej (keratynocyty nabłonka dziąsła pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia). Ekspresja IL-1 $\alpha$  dotyczyła także jednojądrzastych komórek nacieków zapalnych, głównie makrofagów rozsianych w *lamina propria* (w tym także *foamy cells*). Co zaskakujące nie było różnic w nasileniu ekspresji

cytokiny w zależności od typu zapalenia pęcherzyka żółciowego (ostre vs. przewlekłe). Nie można również potwierdzić obserwacji większej ekspresji tej interleukiny w zależności od aktywności zmian zapalnych (*grading*) w przypadku kamiczego zapalenia pęcherzyka żółciowego. Co ciekawe większą ekspresję tej cytokiny wykazano u mężczyzn w porównaniu z kobietami z grupy z ostrym zapaleniem pęcherzyka żółciowego. W grupie pacjentów z przewlekłym *cholecystitis* notowano pozytywną korelację pomiędzy ekspresją tej cytokiny oraz wartością BMI, jednak była ona bardzo słaba ( $r=0,3680$ ). Na modelu mysim opisano związek między otyłością, spożywaniem dużej ilości oczyszczonych węglowodanów i występowaniem zwiększonej produkcji cytokin prozapalnych: IL-1 $\beta$  oraz TNF- $\alpha$  oraz stłuszczenia pęcherzyka żółciowego [160].

Badania wielu innych autorów skupiające się na analizie surowiczych stężeń i to zazwyczaj IL-1 $\beta$ , wykazują 3-5-krotny wzrost stężeń tej cytokiny (wraz z IL-6) w przewlekłych chorobach przewodu pokarmowego (w tym *cholelithiasis*) o nasilonej i średnio nasilonej aktywności zmian zapalnych w porównaniu ze zmianami nieaktywnymi [138, 251]. Wzrost surowiczych stężeń tej cytokiny obserwowano, jak wspomniano, we wczesnych fazach choroby [251].

Zachowanie się stężeń IL-1 badano również w kontekście wyboru mniej inwazyjnych zabiegów chirurgicznych (otwarta vs. laparoskopowa cholecystektomia). Najczęściej wykazywano wyższe stężenia IL-1 $\alpha$  u chorych po tradycyjnej cholecystektomii w porównaniu z laparoskopową [116], rzadziej nie odnotowywano zmian w stężeniu IL-1 $\beta$  w zależności od rodzaju zabiegu operacyjnego [18].

Głównym miejscem lokalizacji IL-1 $\alpha$  w pęcherzykach żółciowych badanych w tej pracy pacjentów były komórki nabłonka, ale ekspresja ta widoczna była także w komórkach nacieków zapalnych. Potwierdza to dane z piśmiennictwa. Źródłami komórkowymi IL-1 są bowiem w większości monocyty i makrofagi, a z innych komórek wymienia się właśnie komórki nabłonkowe i keratynocyty [47, 56].

W świetle danych literaturowych najsilniejszymi czynnikami indukującymi syntezę IL-1 są lipopolisacharydy bakterii Gram-ujemnych [7, 56]. Nie można wykluczyć udziału czynnika bakteryjnego w stymulacji produkcji tej cytokiny także w przypadku niektórych badanych w tej pracy pacjentów z kamiczym



*cholecystitis*. Na podstawie analiz molekularnych opisywane są dwie cząsteczki IL-1 o różnej masie cząsteczkowej w zależności od lokalizacji. Wykazanie głównie cytoplazmatycznej lokalizacji tej cytokiny u badanych pacjentów, świadczyłoby o występowaniu 31 kDa prekursorowej formy (proIL-1 $\alpha$ ) [16, 49]. Jest to forma aktywna IL-1 $\alpha$  i pozostaje wewnątrzkomórkowo [165]. Istnieją obserwacje, że ta forma IL-1 reguluje ostateczne różnicowanie komórkowe, zwłaszcza w przypadku komórek nabłonkowych. Uznaje się więc, że IL-1 $\alpha$  może działać jako ważny autokrynowy i/lub parakrynowy czynnik wzrostu [49]. Obserwując większą ekspresję tej formy IL-1 $\alpha$  w komórkach nabłonka pęcherzyka żółciowego w porównaniu z IL-6 w obu grupach badanych w tej pracy pacjentów, można zakładać dwojaką rolę tej cytokiny. Z jednej strony IL-1 $\alpha$  może bezpośrednio upośledzać funkcje absorpcyjne komórek nabłonka i sprzyjać litogenezie, co częściowo pokazali inni autorzy na modelu zwierzęcym [192]. Z drugiej strony nabłonkowa lokalizacja tej cytokiny może być wyrazem ostatecznego zróżnicowania się komórek tej części błony śluzowej pęcherzyka żółciowego. Podstawową funkcją obu form IL-1 (IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$ ) jest jednak ułatwianie rozwoju reakcji zapalnej poprzez szereg mechanizmów (działanie plejotropowe) i z udziałem wielu populacji komórek (neurofile, monocyty, bazofile, eozynofile i komórki śródbłonka) [52, 82]. Z drugiej zaś strony nie można wykluczyć działania antagonisty receptora dla IL-1 (IL-1Ra), produkowanego przez monocyty. Białko to (podobne do IL-1 $\alpha$  i  $\beta$ ) blokuje oba typy receptorów IL-1 (IL-1R1 i IL-1R2) i może w ten sposób hamować reakcję zapalną [82]. Nieznana jest przyczyna braku istotnych różnic ilościowych w ekspresji tej postaci IL-1 (IL-1 $\alpha$ ) w ostrym i przewlekłym kamiczym *cholecystitis* pacjentów badanych w tej pracy.

#### **4.2. Interleukina 6 (IL-6)**

W zbadanej błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego (lokalizacja prawie wyłącznie w komórkach nabłonka) ekspresja tej cytokiny była istotnie mniejsza w porównaniu z IL-1 $\alpha$  oraz TNF- $\alpha$  i nie było różnic w jej ekspresji pomiędzy ostrym i przewlekłym *cholecystitis*. Żadnych istotnych statystycznie korelacji z danymi klinicznymi nie wykazano w grupie z ostrym zapaleniem pęcherzyka żółciowego. U pacjentów z przewlekłym *cholecystitis* ekspresja IL-6 była negatywnie skorelowana z nasileniem zmian zapalnych (*grading*) ( $r=-0,3208$ )

i liczbą leukocytów we krwi ( $r=-0,3818$ ). Były to jednak słabe negatywne korelacje, prawdopodobnie bez większego znaczenia klinicznego.

Nie było istotnej korelacji pomiędzy tkankową ekspresją IL-6 a BMI pacjentów w żadnej z badanych grup pacjentów, choć na modelu mysim dowiedziono, że otyłość *per se* zwiększa zawartość wolnych kwasów tłuszczowych i IL-6 w pęcherzyku żółciowym [160]. Należy podkreślić, że w badanych w tej pracy pęcherzykach żółciowych cytokina ta była wykrywana w błonie śluzowej tego narządu jedynie u około połowy pacjentów ACC (i 60% pacjentów z CCC), a średnia ekspresja była bardzo niewielka pod względem ilościowym (poniżej 2% reakcji w obu grupach chorych). Na podstawie wyników obecnej pracy, komórki zmienionego zapalnie pęcherzyka żółciowego (nawet w ostrej fazie zapalenia) nie wydają się być podstawowym źródłem zwiększonej produkcji tej cytokiny, uznawanej za wczesny i czuły, choć niespecyficzny wskaźnik reakcji zapalnych toczących się w organizmie [122].

W świetle danych z piśmiennictwa wysokie stężenie IL-6 obserwuje się we krwi i innych płynach ustrojowych w zapaleniach, urazach, chorobach z towarzyszącym przewlekłym procesem zapalnym lub autoimmunologicznym (RZS, łuszczyca) oraz w nowotworach [122, 214].

Podobnie, jak w przypadku innych cytokin prozapalnych (oraz mniej specyficznych markerów zapalenia) badano systemowe stężenie IL-6 po operacji usunięcia pęcherzyka żółciowego metodą tradycyjną i laparoskopową [89, 101, 110, 138, 212]. Wzrost surowiczych stężeń IL-6 (wraz z TNF- $\alpha$ ) obserwowano u pacjentów po cholecystektomii (jako cytokiny związane z „urazem” operacyjnym) w przebiegu ostrego *cholecystitis* [101]. Porównywano stężenia mediatorów zapalenia także w przypadku laparoskopii i tzw. minilaparotomii, wykazując utrzymujący się od 8 godziny do 7 dnia po zabiegu i znaczący wzrost stężenia IL-6 po minilaparotomii [29]. Wszyscy autorzy prac wykazali dość zgodnie, że wyższe stężenia surowicze IL-6 u pacjentów dotyczą „otwartej” w porównaniu z laparoskopową cholecystektomią [89, 110, 138, 212]. Są doniesienia które dowodzą, że stężenie tylko tej cytokiny różniło się u pacjentów po obu rodzajach operacji [18]. Inni wskazują, że stężenie IL-6 wydaje się być czulszym wskaźnikiem

odpowiedzi tkanek na "uraz" w porównaniu ze stężeniami norepinefryny i epinefryny u tych pacjentów [138]. Wykazywano wzajemne pozytywne korelacje całkowitych surowiczych stężeń IL-1 $\alpha$  i IL-6 [116].

Lokalizacja IL-6 w komórkach nabłonka pęcherzyka żółciowego (*cholecystitis*) oraz keratynocytach dziąsła (*chronic periodontitis*) w obecnych badaniach potwierdza wcześniejsze opisy takich źródeł komórkowych u człowieka [87, 122, 123, 139, 214]. Szczególnie dużą ekspresję IL-6 opisywano w keratynocytach zdrowej i uszkodzonej skóry [87, 214]. IL-6 uznano za istotny regulator wzrostu komórek nabłonka i cytokinę ważną z punktu widzenia kontaktów komórka-komórka [139]. Z użyciem linii hodowanych komórek oraz metod immunohistochemicznych i hybrydyzacji *in situ* wykazano produkcję IL-6 i TNF- $\alpha$  także w nabłonku wewnątrzwątrobowych dróg żółciowych [267]. Autorzy tych badań sugerują rolę obu cytokin w proliferacji i/lub destrukcji komórek nabłonka dróg żółciowych, jakie obserwuje się w pierwotnej marskości żółciowej, rozwijającej się na tle autoimmunologicznym [267].

Zarówno w ostrym, jak i przewlekłym *cholecystitis* u badanych w tej pracy pacjentów istotnie większa była ekspresja IL-1 $\alpha$  w porównaniu z IL-6. W patogenezie przewlekłych zapalnych chorób jelit wskazywano raczej na rolę różnych receptorów IL-6 (sIL-6R, SIL-11R, *soluble ciliary neutrophilic factor receptor*), która polegałaby na utrzymaniu „statusu” choroby, poprzez promocję przejścia z ostrej do przewlekłej fazy zapalenia [200]. Odpowiedź na pytanie jaką rolę odgrywa IL-6 w uszkodzaniu połączeń międzykomórkowych, zmianach fenotypu komórek nabłonka, zaburzeniach funkcji absorpcyjnych i sekrecyjnych komórek nabłonka pęcherzyka żółciowego w *cholelithiasis* wymaga dalszych badań, z włączeniem także innych składników systemu IL-6/IL-6R.

### **4.3. Czynniki martwicy nowotworów (TNF- $\alpha$ )**

TNF- $\alpha$  jest limfokiną związaną głównie z transdukcją sygnałów w odpowiedzi immunologicznej i procesie zapalnym, będąc podobnie jak IL-1 i IL-6, cytokiną prozapalną [1, 20, 113].

Badania obecne wykazały lokalizację TNF- $\alpha$  w szerokim spektrum komórek, co jest zgodne z danymi z piśmiennictwa [63, 216]. U badanych w tej pracy

pacjentów z kamiczym zapaleniem pęcherzyka żółciowego, pozytywna reakcja na to białko obecna była w cytoplazmie komórek nabłonka jednowarstwowego walcowatego i komórek sześciennych nabłonka gruczołów pęcherzyka żółciowego. Białko TNF- $\alpha$  zlokalizowano oczywiście także w komórkach nacieków zapalnych, głównie monocytach i makrofagach (w tym *foamy cells*), ale także w limfocytach i komórkach *endothelium*.

Ilościowa analiza badanych w tej pracy pacjentów z ostrym zapaleniem pęcherzyka żółciowego wykazała, że ekspresja TNF- $\alpha$  w błonie śluzowej jest podobna do ekspresji IL-1 $\alpha$ , a istotnie przeważa nad ekspresją IL-6. Wykazano przy tym pozytywną korelację pomiędzy ekspresją limfokiny i całkowitym nasileniem zmian zapalnych w ścianie pęcherzyka żółciowego (parametr G1+G2) oraz z liczbą leukocytów we krwi pacjentów. W tej grupie pacjentów obserwowano również pozytywną korelację ekspresji TNF- $\alpha$  oraz ekspresji markera makrofagów – cząsteczki CD68. Świadczy to przede wszystkim o prozapalnej roli TNF- $\alpha$  i aktywacji zwłaszcza makrofagów do produkcji tej limfokiny w ostrym stanie zapalnym, towarzyszącym kamicy pęcherzyka żółciowego.

W błonie śluzowej pęcherzyków z przewlekłym *cholecystitis* obserwowano istotnie większą ekspresję TNF- $\alpha$  w porównaniu z ostrym zapaleniem narządu (większa ekspresja TNF- $\alpha$  dotyczyła przy tym kobiet z tej grupy w porównaniu z kobietami z grupy ACC). W przewlekłym *cholecystitis* ekspresja TNF- $\alpha$  dominowała wśród trzech badanych cytokin pozapalnych. Zaskakująco negatywna korelacja ekspresji tej cytokiny z aktywnością zapalną w ścianie pęcherzyka żółciowego (parametr G2 i całkowity *grading*) była jednak dość słaba ( $r=-0,4143$ ). Do wyniku tego należy odnieść się więc z ostrożnością. Nie obserwowano istotnej korelacji pomiędzy ekspresją tej cytokiny a nasileniem zmian zapalnych w samej błonie śluzowej (parametr G1). Nie obserwowano także istotnych korelacji pomiędzy ekspresją tej cytokiny i liczbą leukocytów we krwi oraz z innymi danymi klinicznymi.

Według danych z piśmiennictwa rola TNF- $\alpha$  w powstawaniu kamicy żółciowej jest bardzo ważna. Wykazano indukujący wpływ tej cytokiny (produkowanej przez komórki nabłonka dróg żółciowych), *via* LPS na nadprodukcję mucyn

(MUC2 i MUC5AC) [270]. Mucyny te uczestniczą w litogenezie w obrębie wewnątrzwątrobowych dróg żółciowych [270]. Produkcję białka i mRNA TNF- $\alpha$  wykazano również po stymulacji LPS w prawidłowych komórkach nabłonka mysich pęcherzyków żółciowych. Komórki te produkowały mRNA IL-1 $\beta$ , IL-6, białko MCP-1 (ang. *monocyte chemoattractant protein-1*) i wykazywały zwiększoną produkcję mRNA TNF- $\alpha$  oraz MIP-2 (ang. *macrophage inflammatory protein-2*) [210]. W modelu *in vivo* oraz *in vitro* wykazano ponadto, że TNF- $\alpha$  indukuje ekspresję EGF-R (ang. *Epidermal Growth Factor Receptor*), co również prowadzi do zwiększonej produkcji mucyny sekrecyjnej MUC5AC, która akumuluje się zwłaszcza w przypadku kamicy cholesterolowej u człowieka [64].

Badania obecne w obu grupach pacjentów wykazały również ewidentną ekspresję TNF- $\alpha$  w komórkach nabłonka pęcherzyka żółciowego, co mogłoby sugerować rolę tak zlokalizowanej cytokiny w upośledzaniu funkcji komórek nabłonka i/lub ewentualnego nasilania produkcji mucyn, jak pokazują to badania *in vitro* innych autorów [64, 210].

Badanie stężenia TNF- $\alpha$  w surowicy krwi w przypadku przewlekłych chorób przewodu pokarmowego (w tym *cholelithiasis*) wykazało wyższe wartości tej cytokiny (150-370 pg/ml) w porównaniu z chorobami nowotworowymi, alkoholizmem czy zaburzeniami metabolicznymi. Podanie monoklonalnych przeciwciał anti-TNF- $\alpha$  przejściowo zmniejszało stężenia cytokin we krwi obwodowej [252]. W *cholelithiasis* wzrost stężenia TNF- $\alpha$  obserwowano w późnych stadiach choroby [251].

Także w przypadku TNF- $\alpha$  badano wpływ rodzaju zabiegu operacyjnego („uraz” tkankowy) na surowicze stężenia limfokiny i wykazywano, podobnie jak w przypadku pozostałych cytokin, większy wzrost systemowego stężenia TNF- $\alpha$  po konwencjonalnej cholecystektomii w porównaniu z laparoskopowym zabiegiem [34, 89, 101, 138, 190, 194]. Tylko niektórzy z autorów wykazywali podobny wzrost stężenia TNF- $\alpha$  w 4 dniu po operacji w obu rodzajach zabiegów operacyjnych pęcherzyka żółciowego [194].

Porównanie stężeń cytokin prozapalnych w kontekście rodzaju zabiegu operacyjnego usunięcia kamieni, dotyczyło w większości przewlekłego

zapalenia pęcherzyka żółciowego. Badano także surowicze stężenia cytokin prozapalnych (IL-6 oraz TNF- $\alpha$ ) u pacjentów z ostrym *cholecystitis*, wykazując że zwłaszcza pacjenci z powikłaniami pooperacyjnym mają w 1-2 dniu po operacji znacząco podwyższone stężenia tych cytokin [101]. Nie badano źródeł komórkowych tych białek.

Dalszych badań, w tym czynnościowych, wymaga ocena mechanizmów nieimmunologicznego działania TNF- $\alpha$ , zwłaszcza w patogenezie kamiczego zapalenia pęcherzyka żółciowego.

## 5. Ekspresja białek z rodziny S100 produkowanych przez fagocyty

Oprócz ekspresji białka S100B (komórki dendrytyczne) w obecnej pracy zbadano ekspresję dwóch białek z rodziny S100, ściśle związanych z regulacją czynności układu immunologicznego, a mianowicie S100A8 i S100A9. Podrupa tych białek nazywana jest często kalgranulinami. Heterodimer S100A8/A9 nosi też zwyczajową nazwę kalprotektyna [45, 67]. Białka te produkowane są głównie przez neutrofile, ale także przez aktywowane monocyty i makrofagi [67, 203, 206].

Badania obecne przeprowadzono z zastosowaniem dwóch różnych przeciwciał poliklonalnych skierowanych przeciwko ludzkim białkom S100A8 oraz S100A9. Rolę tych białek we wrodzonej odporności oraz rekrutacji leukocytów do miejsc zapalenia opisano we Wstępie pracy. Efekty biologiczne tych białek występują zarówno w ostrej, jak i przewlekłej fazie zapalenia.

Ilościowe wyniki własne dotyczą ekspresji tych białek wyłącznie w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego. Oba białka wykazano u wszystkich pacjentów obu grup (wykrywalność 100%). Reakcja immunocytochemiczna na oba białka była z reguły bardzo wyraźna i dotyczyła cytoplazmy licznych komórek nacieków zapalnych (głównie neutrofile, monocyty i makrofagi) zlokalizowanych zarówno w *lamina propria*, jak i pomiędzy komórkami nabłonka pęcherzyka. Zarówno w przypadku S100A8, jak i S100A9, immunopozytywne komórki występowały licznie w świetle naczyń. Obecność obu białek potwierdzono w komórkach odczynowych węzłów chłonnych. Lokalizacja komórkowa S100A8

i S100A9 wykazana w tym opracowaniu jest zasadniczo zgodna z obserwacjami z piśmiennictwa [65, 86, 203, 206].

Analiza ilościowa wykazała istotnie większą ekspresję zarówno białka S100A8, jak i S100A9 w ostrym *cholecystitis* w porównaniu z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego. Wzajemne porównanie ekspresji obu białek w każdej z grup pacjentów, ujawniło z kolei znamienne przewagę ekspresji białka S100A9 nad S100A8 w każdej z grup chorych. W przypadku białka S100A8, wykazano dodatkowo większą ekspresję tego białka u starszych pacjentów w porównaniu z młodymi chorymi (do 25 r.ż.).

Porównanie ekspresji tych białek z markerem komórek dendrytycznych (białko S100B, opisane wcześniej) wykazało znamienne przewagę S100A8 i S100A9 nad S100B w ostrym *cholecystitis*. Grupa z przewlekłym *cholecystitis* miała podobną ekspresję markera komórek dendrytycznych oraz S100A9, natomiast ekspresja S100A8 była niższa u tych chorych w porównaniu z ekspresją S100B.

Badając różnice w ekspresji obu kalgranulin w zależności od płci, kobiety i mężczyźni obu grup wykazywali podobną ekspresję tych białek. Natomiast wykazano większą ekspresję S100A8 i S100A9 u kobiet z grupy ACC (ostre *cholecystitis*) w porównaniu z grupą CCC. Także u mężczyzn z ostrym *cholecystitis* ekspresja S100A9 była znamienne wyższa niż u mężczyzn z przewlekłym zapaleniem narządu.

Ilościowych wyników nad ekspresją obu białek z grupy S100 nie da się odnieść do analogicznych prac z piśmiennictwa, gdyż nie znaleziono prac na ten temat w odniesieniu do chorób pęcherzyka żółciowego u człowieka. Wiadomo jednak, że kompleks S100A8/A9 jest ważnym mediatorem reakcji zapalnych w wielu chorobach przewodu pokarmowego [65, 66, 67]. Nadekspresja tego kompleksu białkowego opisana jest szczególnie w przewlekłych chorobach zapalnych jelit oraz gruczolakorakach u człowieka [67, 75]. Badanie stężeń tych białek w surowicy krwi może służyć do monitorowania aktywności choroby i odpowiedzi na leczenie [65].

W chorobach przewodu pokarmowego kompleks S100A8/A9 („kałowa” kalprotektyna) uznany jest za marker ostrych stanów zapalnych jelita

i odzwierciedla aktywację fagocytów [131]. Uważa się, że kalgranuliny uwalniane są z cytoplazmy obumarłych neutrofilów i dostają się do płynnej zawartości ropnia [126]. Prace te opierają się na hipotezie, że w zapalnych chorobach przewodu pokarmowego, aktywowane leukocyty infiltrujące błonę śluzową, przenikają do światła jelit i mogą być wykrywane w kale [131].

Są również prace uwidaczniające ekspresję białek S100A8 i S100A9 z zastosowaniem metod immunocytochemicznych w fagocytach nacieków zapalnych jelita [150]. Zapalnie zmienione fragmenty jelit w różnych chorobach przewodu pokarmowego u człowieka wykazywały zawsze większą ilość białek S100A8 i S100A9 (oraz S100A12) w porównaniu z kontrolną błoną śluzową [67, 142, 143]. Badanie kompleksu S100A8/A9 (kalprotektyna) w próbce kału uznawano za marker pomocny w diagnostyce różnicowej chorób przewodu pokarmowego także u dzieci [235].

Z badań przeprowadzonych w obecnej pracy wynika, że oba białka S100A8 i S100A9 są produkowane i wydzielane w większej ilości w ostrym zapaleniu pęcherzyka niż w przewlekłym *cholecystitis*. Ich podstawowym źródłem komórkowym w pęcherzykach żółciowych były głównie neutrofile, ale białka te mogą być także produkowane przez aktywowane monocyty i makrofagi i wiele innych typów komórek [65, 66, 67, 86, 203, 206]. Prawdopodobnie biorą aktywny udział w zapoczątkowaniu ostrej reakcji zapalnej pod wpływem stresu komórkowego [66, 67]. W zapaleniu ostrym (także w przypadku moich pacjentów) obserwowano więcej komórek nacieków zapalnych, stąd także kalgranuliny były produkowane przez większą liczbę komórek o właściwościach fagocytarnych. Oprócz neutrofilów mogły to być aktywowane monocyty i makrofagi, obecne w istotnie większej liczbie także w zapaleniu ostrym. Zgodnie z danymi literaturowymi, źródłem tych białek mogą być również uszkodzone komórki nacieków zapalnych [67]. Swoje efekty prozapalne białka S100A8 i S100A9 wywołują prawdopodobnie równolegle, o czym może świadczyć wykazana w tej pracy wysoka pozytywna korelacja wzajemnej ekspresji obu białek zarówno w ostrym *cholecystitis* ( $r=0,6735$ ), jak i przewlekłym zapaleniu pęcherzyka żółciowego ( $r=0,6856$ ). W obu grupach chorych i w przypadku obu badanych białek: S100A8 i S100A9 wykazano pozytywną zależność ekspresji tych białek także od nasilenia zmian zapalnych



w błonie mięśniowej i surowiczej (parametr G2), ale jedynie w grupie z ostrym *cholecystitis* korelacje te były wysokie ( $r=0,5119$ ,  $r=0,5704$ , odpowiednio). Wynik ten wskazuje, że zwłaszcza w ostrym kamiczym zapaleniu pęcherzyka żółciowego tkankowa ekspresja kalgranulin może służyć za marker aktywności zapalnej.

Na podstawie wyników obecnej pracy można sądzić ponadto, że w przewlekłym zapaleniu pęcherzyka żółciowego, bardziej niż w ostrym *cholecystitis* w proces zapalny zaangażowane są komórki dendrytyczne (S100B-pozytywne). Jednak dużą rolę odgrywają także białka S100A9 oraz S100A8 (choć produkowane w mniejszej ilości). Niektórzy z badaczy uważają, że kompleks S100A8/S100A9 pełni ważną funkcję właśnie w przewlekłej fazie zapalenia, ponieważ wykazywano jego nadekspresję szczególnie w takich schorzeniach u człowieka [65-68, 75, 112]. Sugerowane mechanizmy zewnątrzkomórkowego działania białek S100A8/A9 to nasilanie chemotaksji neutrofilów i monocytów oraz zwiększanie ekspresji integryn. W przypadku samego białka S100A9 dołącza się także udział tego białka w migracji makrofagów i potęgowaniu ich funkcji, w indukowaniu bólu wywołanego zapaleniem oraz w wywoływaniu zmian miażdżycowych w naczyniach krwionośnych [86]. W hodowli komórkowej wykazano także bezpośrednie działanie antybakteryjne (i to w stosunku do wielu patogenów) oraz przeciwgrzybicze kalgranulin [104]. Wynikać ma ono z hamowania bakteryjnych metaloproteinaz, zapoczątkowania migracji neutrofilów do miejsca stanu zapalnego oraz zwiększania ich zdolności do fagocytowania [235].

W badaniach własnych wykazano korelacje ekspresji białek z rodziny S100 z ekspresją innych markerów komórek nacieków zapalnych i to właśnie u chorych z przewlekłym *cholecystitis*. Obserwowano jedynie słabą pozytywną zależność pomiędzy ekspresją białka S100A8 i cząsteczki CD68 (marker makrofagów) w błonie śluzowej zapalnie zmienionego pęcherzyka żółciowego ( $r=0,3527$ ). Może to sugerować związek funkcjonalny tego białka z rodziny S100 i aktywowanych monocytów i makrofagów, jednak obserwację tę należałoby jednak zweryfikować z zastosowaniem również innego markera makrofagów.

Co do związku ekspresji białek z rodziny S100 z ekspresją cytokin prozapalnych u pacjentów z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka, wykazano jedynie dwie słabe zależności dotyczące ekspresji białka S100A8. Ekspresja tego białka była pozytywnie skorelowana z ekspresją IL-1 $\alpha$  ( $r=0,3325$ ), a negatywnie z ekspresją IL-6 ( $r=-0,3189$ ). Potwierdzenie klinicznego znaczenia tych obserwacji wymaga dalszych badań, być może także w modelu *in vitro* na hodowanych komórkach nabłonka pęcherzyka żółciowego.

Żadnych istotnych korelacji pomiędzy ekspresją białek S100 i ekspresją cytokin nie obserwowano w grupie z ostrym *cholecystitis*. Ponadto w żadnej z grup pacjentów w obecnej pracy nie udało się wykazać korelacji pomiędzy ekspresją komórkową TNF- $\alpha$  a ekspresją białek z rodziny S100. Dane literaturowe opisują aktywujący wpływ TNF- $\alpha$  na ekspresję S100A8 i S100A9 w keratynocytach naskórka [17]. Opisano również, że S100A8/A9-pozytywne makrofagi produkują i wydzielają TNF- $\alpha$  [120], czego nie można potwierdzić w uzyskanych wynikach tej pracy.

Badania własne wykazały dodatkowo, że u pacjentów z przewlekłym *cholecystitis*, ekspresja białka S100A8 pozytywnie koreluje z indeksem masy ciała pacjentów (podobnie jak ekspresja IL-1 $\alpha$ ) oraz z liczbą leukocytów we krwi. Ekspresja obu białek S100A8 i S100A9 była także, ale negatywnie skorelowana z liczbą kamieni żółciowych ( $r=-0,4181$ ;  $r=-0,3394$ , odpowiednio). Niskie współczynniki korelacji Spearmana we wszystkich wspomnianych zależnościach nie pozwalają jednak na wyciąganie wiążących wniosków.

Należy przypomnieć, że rola białek S100 produkowanych przez fagocyty w patogenezie *cholelithiasis* właściwie nie była poruszana i brakuje danych w dostępnym piśmiennictwie. Opisano jedynie prognostyczne znaczenie nadprodukcji białka S100A4 (gorsza prognoza) w raku pęcherzyka żółciowego [169].

Na podstawie wyników obecnej pracy można przyjąć, że oba białka S100A8 i S100A9, których ekspresja zachodzi przede wszystkim w granulocytach obojętnochłonnych są dobrymi wskaźnikami aktywności procesu zapalnego w kamiczym *cholecystitis*. Pozytywną korelację z nasileniem zmian zapalnych wykazano dla obu kalgranulin i to niezależnie od grupy pacjentów (ACC i CCC).

Badania nad rolą białek z rodziny S100, produkowanych przez aktywne fagocyty powinny być kontynuowane, z wykazaniem kolokalizacji tych białek z innymi markerami komórek nacieków zapalnych w różnych fazach zapalenia. Dalszych badań wymaga udział tkankowej ekspresji tej grupy białek w kancerogenezie pęcherzyka żółciowego.

## 6. Podsumowanie najistotniejszych wyników badań

Badania morfologiczne pęcherzyka żółciowego w *cholelithiasis* potwierdzają zróżnicowany obraz histopatologiczny w zależności od typu zapalenia narządu (ostre i przewlekłe). Pewne różnice w obrazie morfologicznym wykazano w grupie najmłodszych pacjentów (do 25 r.ż.) w porównaniu z 50-latkami z przewlekłym *cholecystitis*.

Z badanych markerów komórek nacieków zapalnych (uczestniczących w odpowiedzi zapalnej), w ostrym *cholecystitis* obserwowano większą ekspresję markera neutrofilów (białka S100A8 i S100A9), monocytów/makrofagów (cząsteczka CD68) i liczbę eozynofiliów w porównaniu z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego. Z populacji limfocytów, największa ekspresja dotyczyła cząsteczki CD20 (marker limfocytów B) oraz cząsteczki CD4 (marker limfocytów T pomocniczych). Podobną ekspresję (a pośrednio i liczbę) w ostrym i przewlekłym *cholecystitis* wykazano dla tryptazy (komórki tuczne) oraz cząsteczki CD8 (limfocyty T cytotoksyczne/regulatorowe). W grupie z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego istotnie większą ekspresję (w porównaniu z ostrym *cholecystitis*) wykazano dla markera komórek dendrytycznych (S100B). Należy dodać, że wykazanie lokalizacji komórkowej oraz ilościowe oszacowanie ekspresji tego markera komórek dendrytycznych w ścianie zapalnie zmienionego pęcherzyka żółciowego w przebiegu kamicy, jest pierwszym tego typu opracowaniem.

Z badanych cytokin prozapalnych, ilościowo podobna ekspresja w obu grupach dotyczyła IL-1 $\alpha$  i IL-6, natomiast ekspresja TNF- $\alpha$  była istotnie wyższa w grupie pacjentów z przewlekłym w porównaniu z ostrym zapaleniem pęcherzyka żółciowego. Analiza wzajemnej ekspresji trzech cytokin prozapalnych

w grupach, wykazała istotną dominację ekspresji TNF- $\alpha$  nad pozostałymi cytokinami (przewlekłe *cholecystitis*) lub tylko w stosunku do ekspresji IL-6 (ostre *cholecystitis*). Tylko w grupie z ostrym zapaleniem pęcherzyka żółciowego ekspresja TNF- $\alpha$  korelowała z ekspresją markera makrofagów (CD68) oraz była wprost proporcjonalna do aktywności zapalnej (całkowity *grading*) i do liczby leukocytów we krwi pacjentów. Dla interleukiny 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) w badanych pęcherzykach żółciowych obu grup pacjentów nie udało się wykazać silnych korelacji między innymi parametrami stanu zapalnego w *cholelithiasis*. Słabe pozytywne korelacje między ekspresją IL-1 $\alpha$  i ekspresją białka S100A8 oraz BMI w przewlekłym zapaleniu pęcherzyka żółciowego wymagają potwierdzenia i kontynuacji badań.

Najniższa pod względem ilościowym spośród trzech badanych cytokin w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego w obu typach *cholecystitis*, okazała się interleukina 6 (IL-6). Pojedyncze słabe i to z reguły negatywne korelacje (choć istotne statystycznie) pomiędzy ekspresją IL-6 i innymi wykładnikami przewlekłej fazy procesu zapalnego (*grading*, ekspresja białka S100A8, liczba leukocytów we krwi), nie pozwalają na wyciągnięcie wiążących wniosków.

Wszystkie cytokiny pozapalne badane w ramach obecnej pracy (IL-1 $\alpha$ , IL-6 i TNF- $\alpha$ ) zostały zlokalizowane zarówno w komórkach nabłonka pęcherzyka żółciowego, jak i w szerokim spektrum komórek nacieków zapalnych i innych typach komórek tkanki łącznej *lamina propria* i to niezależnie od typu zapalenia narządu.

Ocena białek S100A8 i S100A9 (produkowanych przez fagocyty) należy do pionierskich badań pod kątem ich tkankowej ekspresji w kamiczym zapaleniu pęcherzyka żółciowego. Częstość występowania tych białek w ścianie narządu w obu grupach chorych wynosiła 100%. Ilościową przewagę na poziomie błony śluzowej pęcherzyka żółciowego miała ekspresja S100A9 w porównaniu z S100A8 i to niezależnie od grupy. Porównując ekspresję tych białek pomiędzy grupami (ostre vs. przewlekłe *cholecystitis*), większą ekspresję obu białek wykazano w ostrym *cholecystitis*. Ekspresja tych białek z rodziny S100 dotyczyła głównie neutrofilów, obecnych liczniej w ostrym zapaleniu pęcherzyka żółciowego. Najsilniejszą pozytywną korelację obserwowano pomiędzy

wzajemną ekspresją obu białek S100A8 i S100A9. W ostrym zapaleniu pęcherzyka żółciowego ekspresja obu tych białek była pozytywnie skorelowana także z aktywnością zapalną w głębszych warstwach ściany pż (parametr G2).

W grupie z przewlekłym *cholecystitis* również wykazano wysoką korelację pomiędzy wzajemną ekspresją obu kalgranulin, a także słabe pozytywne korelacje dotyczące głównie ekspresji białka S100A8 i innych badanych komórkowych markerów stanu zapalnego (IL-1 $\alpha$ , CD68, liczba leukocytów we krwi). W grupie tej, ekspresja białek S100A8 i S100A9 była pozytywnie skorelowana (jednak niższe współczynniki korelacji Spearmana) także z aktywnością zapalną w pęcherzyku żółciowym (parametr G2, G1+G2).

Istotna wprost proporcjonalna zależność pomiędzy wzajemną ekspresją obu białek z rodziny S100 (produkowanych przez fagocyty) wykazana w dwóch typach zapalenia pęcherzyka żółciowego, pozwala wyrazić opinię, że białka te są ściśle powiązane w swoich funkcjach prozapalnych i każde z nich może być przydatnym wskaźnikiem (przynajmniej lokalnej) aktywności zapalnej w *cholelithiasis*.

Badania obecne pozwoliły na wykazanie różnic w składzie komórek nacieków zapalnych pomiędzy grupą młodych (do 25 r.ż.) i starszych pacjentów w grupie z przewlekłym *cholecystitis*. Do najważniejszych wyników w tym zakresie należy wykazanie większej liczby eozynofiliów w naciekach zapalnych, a mniejszej ekspresji tryptazy, cząsteczki CD68 oraz białka S100A8 u najmłodszych pacjentów w porównaniu z 50-latkami.

Badania obecne wykazały także różnice między kobietami i mężczyznami obu grup pacjentów, jak również różnice płciowe dotyczące liczby komórek (eozynofile) oraz ekspresji niektórych cząsteczek markerowych komórek nacieków zapalnych. I tak, liczba eozynofiliów w ścianie pęcherzyka żółciowego była istotnie wyższa u pacjentek z ostrym *cholecystitis* w porównaniu z kobietami z przewlekłym zapaleniem narządu. Większa ekspresja cząsteczki CD68 i białka S100A8 dotyczyła także pęcherzyków żółciowych kobiet z ostrym w porównaniu z kobietami z przewlekłym *cholecystitis*. Natomiast u kobiet z przewlekłym *cholecystitis* większa była ekspresja TNF- $\alpha$ . Mężczyźni z ostrym zapaleniem pęcherzyka żółciowego mieli większą ekspresję białka S100A9

w porównaniu z mężczyznami z przewlekłym *cholecystitis*. Istotnie większą ekspresję IL- $\alpha$  wykazano u mężczyzn w porównaniu z kobietami w grupie z ostrym zapaleniem pęcherzyka żółciowego. Nie wykazano różnic płciowych w ekspresji IL-6 i białka S100B.

## WNIOSKI

1. W ostrym zapaleniu pęcherzyka żółciowego występuje większa komórkowa ekspresja białek markerowych neutrofilów (S100A8 i S100A9), monocytów/makrofagów (CD68) i limfocytów B (CD20) w porównaniu z przewlekłym kamiczym zapaleniem narządu.
2. U młodych pacjentów (do 25 r.ż.) z przewlekłym kamiczym *cholecystitis*, występuje mniejsza ekspresja tryptazy (komórki tuczne), białka S100A8 (neutrofile) oraz cząsteczki CD68 (monocyty/makrofagi), a większa liczba eozynofików w naciekach zapalnych pęcherzyka żółciowego w porównaniu ze starszymi pacjentami (ok. 50 r.ż.).
3. Spośród trzech cytokin prozapalnych (IL-1 $\alpha$ , IL-6 i TNF- $\alpha$ ), ekspresja TNF- $\alpha$  koreluje z wykładnikami ostrego zapalenia pęcherzyka żółciowego, a większa ekspresja TNF- $\alpha$  w błonie śluzowej z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego, sugeruje dodatkową rolę tej limfokiny w patogenezie kamicy żółciowej.
4. Komórkowa lokalizacja białka S100B (komórki dendrytyczne) w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego oraz wykazanie przewagi ekspresji S100B u pacjentów z przewlekłym, w porównaniu z ostrym *cholecystitis*, jest nowością obecnych badań.
5. Stopień nasilenia komórkowej ekspresji białek S100A8 i/lub S100A9 w błonie śluzowej może być nowym, przydatnym wskaźnikiem aktywności zapalnej w kamiczym zapaleniu pęcherzyka żółciowego.

## STRESZCZENIE

### **Immunocytochemiczna ekspresja wybranych białek z rodziny S100 oraz cytokin prozapalnych w kamiczym zapaleniu pęcherzyka żółciowego**

Istnieje wiele hipotez dotyczących udziału reakcji zapalnej w patogenezie kamicy żółciowej (*cholelithiasis*). Założenia obecnej pracy wynikają z obserwacji zwiększonego surowiczego stężenia cytokin prozapalnych (IL-1 $\alpha$ , IL-6 i TNF- $\alpha$ ) u pacjentów z kamiczym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (*cholecystitis*) oraz mało poznanej roli lokalnej ekspresji tych białek w patogenezie choroby. Ponadto nie badano udziału białek z rodziny S100 produkowanych przez fagocyty w kamiczym zapaleniu pęcherzyka żółciowego u człowieka.

Celem pracy była (1) histopatologiczna ocena zmian morfologicznych oraz aktywności zapalnej (*grading*) w pęcherzyku żółciowym u pacjentów z ostrym i przewlekłym zapaleniem narządu; (2) immunocytochemiczna analiza komórkowej ekspresji klasycznych cytokin prozapalnych (IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  i IL-6) oraz białek z rodziny S100 (S100B, S100A8 i S100A9) w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego u pacjentów z ostrym i przewlekłym kamiczym zapaleniem pęcherzyka żółciowego; (3) immunocytochemiczna ocena fenotypu komórek nacieków zapalnych w pęcherzyku żółciowym w kamiczym zapaleniu narządu oraz (4) analiza porównawcza oraz korelacje pomiędzy tkankową ekspresją cytokin prozapalnych i białek z rodziny S100 a wybranymi danymi klinicznymi w obu grupach chorych, z uwzględnieniem grupy najmłodszych pacjentów (poniżej 25 roku życia) z objawową kamicą żółciową.

Badania przeprowadzono na archiwalnych bloczkach parafinowych z materiałem tkankowym (pęcherzyki żółciowe) od 16 pacjentów z ostrym (grupa ACC, ang. *acute calculous cholecystitis*) i 55 pacjentów z przewlekłym zapaleniem pęcherzyka żółciowego (grupa CCC, ang. *chronic calculous cholecystitis*). W grupie CCC wyodrębniono dwie podgrupy: pacjentów do 25 r.ż. (n=35) oraz chorych około 50 r.ż. (n=20). Materiał kontrolny stanowiły fragmenty zapalnie zmienionych mięsotętniaków oraz odczynowych węzłów chłonnych. Tkanki utrwalone były w 4% zbuforowanej formalinie przez 24 h i zatopione w parafinie. Seryjne skrawki o grubości około 5  $\mu$ m po skrojeniu, zabarwiono



hematoksyliną i eozyną i dokonano oceny histologicznej (opisowej i w skali półilościowej). W skali półilościowej oceniono także liczbę eozynofilów w naciekach zapalnych całej ściany pęcherzyka żółciowego. Do wykrywania tkankowej ekspresji białek wykorzystano klasyczną technikę immunocytochemiczną (strept)awidyna-biotynyłowana-peroksydaza (ABC) oraz mono- lub poliklonalne przeciwciała na wykrywanie: CD68, tryptazy, CD3, CD8, CD4, CD20, IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , S100 (S100B), S100A8 oraz S100A9. Produkt reakcji immunocytochemicznej na preparatach pęcherzyków żółciowych archiwizowano na obrazach spod mikroskopu świetlnego w programie LUCIA Image\_5.0 i oceniono ilościowo z wykorzystaniem techniki wizualizacji przestrzennej. Ostateczny wynik przedstawiono jako % pozytywnej reakcji markera na pole błony śluzowej pęcherzyka żółciowego. Markery fenotypowe limfocytów oceniano w całej ścianie pęcherzyka żółciowego. Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy programu Statistica PL v. 9 oraz odpowiednich testów. Wyniki uznano za statystycznie istotne na poziomie istotności  $p \leq 0,05$ .

Wykazano większą aktywność zapalną (*grading*: G1, G2, G1+G2) w pęcherzykach żółciowych u pacjentów z grupy ACC, którzy także posiadali większą liczbą leukocytów we krwi. Liczba eozynofilów w naciekach zapalnych była również wyższa w grupie ACC w porównaniu z CCC, ale jedynie w grupie CCC liczba eozynofilów korelowała z *grading* (G2). U pacjentów z CCC, istotnie więcej eozynofilów wykazano w ścianie pęcherzyków żółciowych u młodych pacjentów (do 25 r.ż.) w porównaniu z 50-latkami. Ilościowo większą ekspresję cząsteczki CD68 (monocyty/makrofagi) wykazano w pęcherzykach żółciowych grupy ACC w porównaniu z grupą CCC. U pacjentów z przewlekłym *cholecystitis* przewagę ilościową makrofagów (CD68+) mieli pacjenci starsi w porównaniu z młodymi (do 25 r.ż.). Podobnie u starszych pacjentów z grupy CCC wykazano więcej tryptazododatnich komórek tłuszcznych w błonie śluzowej w porównaniu z młodymi chorymi. W całej grupie CCC obserwowano przewagę tryptazododatnich mastocytów nad CD68-dodatnimi makrofagami, a ilościowa ekspresja tryptazy była podobna w grupie z ACC i CCC. Ekspresja białka S100B (komórki dendrytyczne) była większa w grupie CCC w porównaniu z ACC. Ekspresja markerów limfocytów T i B w ścianie zapalnie zmienionych

pęcherzyków w badanych grupach pacjentów była zróżnicowana zarówno jeśli chodzi o wykrywalność jak i nasilenie ekspresji cząsteczek fenotypowych tych komórek. W grupie ACC przeważały limfocyty B (CD20+) nad pozostałymi populacjami limfocytów T, a w CCC dominowały limfocyty T (CD8+). Po raz pierwszy w tym opracowaniu wykazano lokalizację i ilościowo zanalizowano ekspresję białka S100B (komórki dendrytyczne) w kamiczym *cholecystitis*. Ekspresja tego białka była istotnie większa w grupie CCC w porównaniu z ekspresją w błonie śluzowej w ostrym *cholecystitis*. Na podstawie pionierskich badań nad białkami S100A8 i S100A9 w pęcherzykach żółciowych można przyjąć, że oba te białka są dobrymi wskaźnikami aktywności procesu zapalnego w kamiczym *cholecystitis*. Pozytywną korelację z nasileniem zmian zapalnych wykazano dla obu kalgranulin i to niezależnie od grupy pacjentów.

Pracę podsumowano następującymi wnioskami: (1) W ostrym zapaleniu pęcherzyka żółciowego występuje większa komórkowa ekspresja białek markerowych neutrofilów (S100A8 i S100A9), monocytów/makrofagów (CD68) i limfocytów B (CD20) w porównaniu z przewlekłym kamiczym zapaleniem narządu; (2) U młodych pacjentów (do 25 r.ż.) z przewlekłym kamiczym *cholecystitis*, występuje mniejsza ekspresja tryptazy (komórki tuczne), białka S100A8 (neutrofile) oraz cząsteczki CD68 (monocyty/makrofagi), a większa liczba eozynofiliów w naciekach zapalnych pęcherzyka żółciowego w porównaniu ze starszymi pacjentami (ok. 50 r.ż.); (3) Spośród trzech cytokin prozapalnych (IL-1 $\alpha$ , IL-6 i TNF- $\alpha$ ), ekspresja TNF- $\alpha$  koreluje z wykładnikami ostrego zapalenia pęcherzyka żółciowego, a większa ekspresja TNF- $\alpha$  w błonie śluzowej z przewlekłym *cholecystitis*, sugeruje dodatkową rolę tej limfokiny w patogenezie kamicy żółciowej; (4) Komórkowa lokalizacja białka S100B (komórki dendrytyczne) w błonie śluzowej pęcherzyka żółciowego oraz wykazanie ilościowej przewagi ekspresji S100B u pacjentów z przewlekłym w porównaniu z ostrym *cholecystitis* jest nowością obecnych badań; (4) Stopień nasilenia komórkowej ekspresji białek S100A8 i/lub S100A9 w błonie śluzowej może być nowym, przydatnym wskaźnikiem aktywności zapalnej w kamiczym zapaleniu pęcherzyka żółciowego.

## SUMMARY

### **Immunocytochemical expression of selected proteins in S100 family and proinflammatory cytokines in calculous cholecystitis**

Several hypotheses have been formulated pertaining involvement of inflammatory reaction in pathogenesis of cholelithiasis. Foundations of this study stem from the observation of increased serum proinflammatory cytokine (IL-1 $\alpha$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ) levels in patients with calculous cholecystitis and a poorly recognised role of local expression involving the proteins in pathogenesis of the disease. Moreover, respective involvement of family S100 proteins has not been examined, even if the proteins are produced by phagocytes in patients with calculous cholecystitis. Therefore, the study aimed at (1) histopathological evaluation of the morphological changes with estimation of grading of inflammation in gallbladder in patients with acute and chronic calculous cholecystitis; (2) immunocytochemical analysis of cellular expression involving classical proinflammatory cytokines (IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) and proteins of S100 family (S100B, S100A8 and S100A9) in gallbladder mucosa of patients with acute and chronic calculous cholecystitis; (3) immunocytochemical evaluation of phenotype in cells of inflammatory infiltrate in gallbladder in calculous cholecystitis and (4) comparative analysis and of correlation between tissue expression of proinflammatory cytokines and family of S100 proteins on one hand and histopathological data and selected clinical data on the other in both groups of patients, including the group of the youngest patients (below 25th year of age) with symptomatic cholelithiasis.

The studies were conducted on archival paraffin blocks with tissue material (gallbladders) obtained from 16 patients with acute calculous cholecystitis (ACC) and 55 patients with chronic inflammation of gallbladder (CCC). Within CCC group two subgroups were distinguished, including patients up to 25th year of life (n=35) and patients around 50th year of age (n=20), respectively. The control material involved inflamed fragments of gingivae and reactive lymph nodes. The tissues were fixed in 4% buffered formalin for 24 hours and embedded in paraffin. Serial sections of around 5  $\mu$ m in thickness were stained

with hematoxylin and eosin and subjected to histological evaluation (descriptive and semiquantitative one). In the semiquantitative evaluation number of eosinophils in inflammatory infiltrates in gallbladder walls was also appraised. Detection of tissue expression of the proteins took advantage of the classical immunocytochemical technique of (strept)avidine-biotinylated peroxidase (ABC) and the following mono- or polyclonal antibodies, specific for CD68, tryptase, CD3, CD8, CD4, CD20, IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , S100 (S100B), S100A8 or S100A9. Product of immunocytochemical reaction in gallbladder preparations was archived in microscope images using LUCIA Image\_5.0 software and quantitatively evaluated using spatial visualization technique. The final result was presented as % positive reaction for the marker per field of gallbladder mucosa. Phenotypic markers of lymphocytes were evaluated in the entire wall of gallbladder. Statistical analysis was conducted using Statistica PL v. 9 software and respective tests. Differences assumed to be significant at  $p \leq 0.05$ .

The most pronounced inflammatory activity (grading: G1, G2, G1+G2) was detected of ACC group, who manifested also the highest values of WBC. Also the number of eosinophils in inflammatory infiltrates was higher in ACC group, as compared to CCC group, but the number of eosinophils correlated with grading (G2) only in CCC group. In patients with CCC a significantly higher number of the cells was demonstrated in young patients (up to 25 years of age) as compared to 50 year-old patients. As compared to CCC group, a quantitatively higher expression of CD68 molecule (monocytes/macrophages) was demonstrated in gallbladders of patients in ACC group. In patients with chronic cholecystitis, the older patients manifested a more pronounced quantitative prevalence of macrophages (CD68+) as compared to younger patients (up to 25th year of age). Similarly in the older patients of CCC group more tryptase-positive mast cells were demonstrated in mucosa as compared to younger patients. In the entire CCC group prevalence of tryptase-positive mastocytes was demonstrated over CD68-positive macrophages while quantitatively estimated expression of tryptase was similar in ACC and CCC groups. Expression of S100B protein (dendritic cells) was more pronounced in CCC than in ACC group. Expression of lymphocytes T and B markers in the wall of inflamed gallbladder in the examined groups of patients varied both in

respect to detectability and intensity of expression involving phenotypic molecules of the cells. In ACC group lymphocytes B (CD20+) prevailed over lymphocytes T while lymphocytes T (CD8+) prevailed in CCC. In this study we have for the first time demonstrated localization of S100B expression (dendritic cells) and evaluated it quantitatively in calculous cholecystitis. Expression of the protein was significantly more pronounced in CCC group as compared to its expression in mucosa in patients with acute cholecystitis. The pioneering studies on proteins S100A8 and S100A9 in gallbladders permit to assume that the two proteins represent good indices of inflammation activity in calculous cholecystitis. Positive correlation with intensity of inflammation has been demonstrated for both calgranulins and this has been so in either group of patients.

The study was summed up in the following conclusions: (1) In acute cholecystitis higher expression of neutrophil markers (S100A8+ and S100A9+), monocyte/macrophage marker (CD68+) and lymphocyte B marker (CD20+) are noted as compared to the chronic cholecystitis; (2) In young patients (up to 25 years of age) with chronic calculous cholecystitis lower expression of tryptase (mast cells), of protein S100A8 (neutrophils) and CD68 molecule (monocytes/macrophages) are noted and higher numbers of eosinophils are encountered in gallbladder inflammatory infiltrates than in older patients (around 50 years of age) with the disease; (3) Among the three proinflammatory cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ), expression of TNF- $\alpha$  manifested a correlation with exponents of acute cholecystitis while the more pronounced mucosal expression of TNF- $\alpha$  in chronic cholecystitis suggested an additional role of the lymphokine in pathogenesis of cholelithiasis; (4) Cellular localization of S100B protein (dendritic cells) in gallbladder mucosa and demonstration of quantitative prevalence of S100B expression in patients with chronic as compared to patients with acute cholecystitis represents a new finding of this study; (5) The degree of cellular expression manifested by S100A8 and/or S100A9 proteins in mucosa may represent a new, useful index of inflammatory activity in calculous cholecystitis.

## PIŚMIENICTWO

1. Abbas A, Lichtman A: Cytokines. In: Cellular and molecular immunology. Elsevier Saunders, Philadelphia 2005, 243-274.
2. Acres RB, Larsen A, Conlon PJ: IL1 expression in a clone of human T cells. *J Immunol* 1987; 138: 2132-2136.
3. Akira S, Isshiki H, Nakajima T, Kinoshita S, Nishio Y, Natsuka S, Kishimoto T: Regulation of expression of the interleukin 6 gene: structure and function of the transcription factor NF-IL-6. *Ciba Found Symp* 1992; 167: 47-62.
4. Al-Azzawi HH, Nakeeb A, Saxena R, Maluccio MA, Pitt HA. Cholecystosteatosis: an explanation for increased cholecystectomy rates. *J Gastrointest Surg* 2007; 11: 835-842.
5. Amazon F, Rywlin AM: Ceroid granulomas of the gallbladder. *Am J Clin Pathol* 1980; 73:123-127.
6. Angelin B, Einarsson K, Ewerth S, Leijd B: Biliary lipid composition in obesity. *Scand J Gastroenterol* 1981; 16: 1015-1019.
7. Arend WP, Massoni RJ: Characteristics of bacterial lipopolysaccharide induction of interleukin 1 synthesis and secretion by human monocytes. *Clin Exp Immunol* 1986; 64: 656-664.
8. Aroni K, Kittas C, Papadimitriou CS, Papacharalampous NX. An immunocytochemical study of the distribution of lysozyme, a1-antitrypsin and a1-antichymotrypsin in the normal and pathological gall bladder. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1984; 403: 281-289.
9. Atkins E: Pathogenesis of fever. *Physiol Rev* 1960; 40: 580-646.
10. Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, Mucci SF, Rich A, Wolff SM, Dinarello CA: Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 7907-7911.
11. Averill MM, Barnhart S, Becker L, Li X, Heinecke JW, LeBoeuf RC, Hamerman JA, Sorg C, Kerkhoff C, Bornfeld KE: S100A9 differentially modified phenotypic states of neutrophils, macrophages, and dendritic cells. Implications for atherosclerosis and adipose tissue inflammation. *Circulation* 2011; 123: 1216-1226.
12. Baffet G, Braciak TA, Fletcher RG, Gaudie J, Fey GH, Northemann W: Autocrine activity of interleukin 6 secreted by hepatocarcinoma cell lines. *Mol Biol Med* 1991; 8: 141-156.
13. Baig SJ, Biswas S, Das S, Basu K, Chattopadhyay G: Histopathological changes in gallbladder mucosa in cholelithiasis: correlation with chemical composition of gallstones. *Trop Gastroenterol* 2002; 23: 25-27.
14. Baker E, Chen LZ, Smith CA, Callen DF, Goodwin R, Sutherland GR: Chromosomal location of the human tumor necrosis factor receptor genes. *Cytogenet Cell Genet* 1991; 57: 117-118.
15. Bailey PV, Connors RH, Tracy TF Jr, Sotelo-Avila C, Lewis JE, Weber TR: Changing spectrum of cholelithiasis and cholecystitis in infants and children. *Am J Surg* 1989; 158: 585-588.
16. Bakouche O, Brown DC, Lachman LB: Subcellular localization of human monocyte interleukin 1: evidence for and inactive precursor molecule and a possible mechanism for IL1 release. *J Immunol* 1987; 138: 4249-4255.

17. Banno T, Gazel A, Blumenberg M: Pathway-specific profiling identifies the NF-kappa B-dependent tumor necrosis factor alpha-regulated genes in epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* 2005; 280: 18973-18980.
18. Bellón JM, Manzano L, Bernardos L, Ga-Honduvilla N, Larrad A, Buján J, Alvarez-Mon M: Cytokine levels after open and laparoscopic cholecystectomy. *Eur Surg Res* 1997; 29: 27-34.
19. Beutler B, Cerami A: Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *N Engl J Med* 1987; 316: 379-385.
20. Beutler B, Cerami A: The biology of cachectin/TNF-a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 625-655.
21. Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, Chang M, Pan YC, Mathison J, Ulevitch R, Cerami A: Identity of tumor necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 1985; 316: 552-554.
22. Bigda J, Okrój M: Rola czynnika martwicy nowotworu (TNF) w procesie angiogenezy. *Współczesna Onkologia* 2002; 6: 57-59.
23. Bischoff SC, Lorentz A, Schwengberg S, Weier G, Raab R, Manns MP: Mast cells are an important cellular source of tumour necrosis factor  $\alpha$  in human intestinal tissue. *Gut* 1999; 44: 643-652.
24. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, et al.: A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 1997; 385: 729-733.
25. Bondarev VI, Golovnia PF, Bondarenko SI, Radomskii VT, Belonenko GA: Disorders of immunoreactivity in acute cholecystitis in middle-aged and elderly patients and their correlation in preventing postoperative complications. *Klin Khir (Article in Russian)* 1990; 9: 27-29.
26. Bradding P, Roberts JA, Britten KM, Montefort S, Djukanovic R, Mueller R, Heusser CH, Howarth PH, Holgate ST: Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 10: 471-480.
27. Bradding P, Okayama Y, Howarth PH, Church MK, Holgate ST: Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content. *J Immunol* 1995; 155: 297-307.
28. Brody DT, Durum SK: Membrane IL-1: IL-1 alpha precursor binds to the plasma membrane via a lectin-like interaction. *J Immunol* 1989; 143: 1183-1187.
29. Bruce MD, Smith M, Walker CB, Heys SD, Binnie NR, Gough DB, Broom J, Eremin O: Minimal access surgery for cholelithiasis induces an attenuated acute phase response. *Am J Surg* 1999; 178: 232-234.
30. Burck HCh: Technika histologiczna. PZWL, Warszawa 1975; 131-140.
31. Burns K, Martinon F, Esslinger C: MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J Biol Chem*: 1998; 273: 12203-12209.
32. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B: An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 3666-3670.

33. Castell JV, Gomez-Lechon MJ, David M, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC: Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS Lett* 1988; 232: 347-350.
34. Chaudhary D, Verma GR, Gupta R, Bose SM, Ganguly NK: Comparative evaluation of the inflammatory mediators in patients undergoing laparoscopic versus conventional cholecystectomy. *Aust N Z J Surg* 1999; 69: 369-372.
35. Chen G, Goeddel DV: TNF-R1 signalling: a beautiful pathway. *Science* 2002; 296: 1634-1635.
36. Chen CC, Wang SS, Lee FY, Chang FY, Lee SD: Proinflammatory cytokines in early assessment of the prognosis of acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1999; 24: 213-218.
37. Choi J, Klinkspoor JH, Yoshida T, Lee SP: Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* stimulates mucin secretion by cultured dog gallbladder epithelial cells. *Hepatology* 1999; 29: 1352-1357.
38. Clark BD, Collins KL, Gandy MS, Webb AC, Auron PE: Genomic sequence for human prointerleukin 1 beta: possible evolution from a reverse transcribed prointerleukin 1 alpha gene. *Nucleic Acids Res* 1986; 14: 7897-7914 (erratum *Nucleic Acids Res* 1987; 15 (2): 868).
39. Coceani F: Prostaglandins and fever, in Machowiak P (ed): *Fever: Basic Mechanisms and Management*. New York, NY, Raven, 1991, p 59.
40. Cohan VL, Scott AL, Dinarello CA, Prendergast RA: Interleukin-1 is a mucus secretagogue. *Cell Immunol* 1991; 136: 425-434.
41. Coley WB: The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas; with a report of ten original cases. *Am J Med Sci* 1893; 105: 487-511.
42. Cozzutto C, Carbone A: The xanthogranulomatous process. *Xanthogranulomatous inflammation*. *Pathol Res Pract* 1988; 183, 395-402.
43. Csendes A, Smok G, Burdiles P, Diaz JC, Maluenda F, Korn O: Histological findings of gallbladders mucosa in 95 control subjects and 80 patients with asymptomatic gallstones. *Digestive Dis Sci* 1998; 43: 931-934.
44. Dabbs DJ: Eosinophilic and lymphoeosinophilic cholecystitis. *Am J Surg Pathol* 1993; 17: 497-501.
45. Dale I, Fagerhol MK, Naesgaard I: Purification and partial characterization of a highly immunogenic human leukocyte protein, the L1 antigen. *Eur J Biochem* 1983; 134: 1-6.
46. Dhillon AP, Rode J, Dhillon DP, Moss E, Thompson RJ, Spiro SG, Corrin B: Neural markers in carcinoma of the lung. *Br J Cancer* 1985; 51: 645-652.
47. Dinarello CA: Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 1991; 77: 1627-1652.
48. Dinarello CA: The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of the septic shock syndrome. *J Infect Dis* 1991; 163: 1177-1184.
49. Dinarello CA: Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996; 87: 2095-2147.



50. Dinarello CA. Impact of basic research on tomorrow's medicine. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000; 118: 503-508.
51. Dinarello CA: IL-1 $\alpha$ . W: Cytokine reference, t.1, red.: J. Oppenheim, M. Feldmann. Academic Press, San Diego 2001, 307-318.
52. Dinarello CA: Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process. *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 447S-455S.
53. Dinarello CA, Renfer L, Wolff SM: Human leukocytic pyrogen: Purification and development of a radioimmunoassay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 4624-4627.
54. Donato R: Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type (review). *Biochim Biophys Acta* 1999; 1450: 191-231.
55. Donato R: Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* 2003; 60: 540-551.
56. Drela N: Interleukin 1 (IL-1) – synthesis and structure (Article in Polish). *Post Biol Kom* 1990; 17: 19-38.
57. Eisenberg SP, Brewer MT, Verderber E: Interleukin 1 receptor antagonist is a member of the interleukin 1 gene family: evolution of a cytokine control mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5232-5236.
58. English M, Hopwood D: Lipid in the human gallbladder mucosa. A histochemical study by light and electron microscopy. *J Pathol* 1985; 146: 333-336.
59. Esposito G, Cirillo C, Sarnelli G, De Filippis D, D'Armiento FP, Rocco A, Nardone G, Petruzzelli R, Grosso M, Izzo P, Iuvone T, Cuomo R: Enteric glial-derived S100B protein stimulates nitric oxide production in celiac disease. *Gastroenterology* 2007; 133: 918-925.
60. Estrada RL, Brown NM, James CE: Chronic follicular cholecystitis. Radiological, pathological, and surgical aspects. *Br J Surg* 1958; 48: 205-209.
61. Falini B, Flenghi L, Pileri S, Gambacorta M, Bigerna B, Durkop H, Eitelbach F, Thiele J, Pacini R, Cavaliere A, et al.: PG-M1: A new monoclonal antibody directed against a fixative-resistance epitope on the macrophage-restricted form of CD68 molecule. *Am J Pathol* 1993; 142: 1359-1372.
62. Feingold KR, Soued M, Adi S, Staprans I, Neese R, Shigenaga J, Doerrler W, Moser A, Dinarello CA, Grunfeld C: Effect of interleukin-1 on lipid metabolism in the rat. Similarities to and differences from tumor necrosis factor. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 495-500.
63. Feldmann M, Roiff I, Brostoff J, Male D: *Immunology*. 3<sup>rd</sup> ed. London. Mosby 1994; p 77-81.
64. Finzi L, Barbu V, Burgel P-R, et al: MUC5AC a gel-forming mucin accumulating in gallstone disease, is overproduced via an Epidermal Growth Factor Receptor pathway in the human gallbladder. *Am J Pathol* 2006; 169: 2031-2041.
65. Foell D, Frosch M, Sorg C, Roth J: Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation. *Clin Chim Acta* 2004; 344: 37-51.

66. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J: S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 28-37.
67. Foell D, Wittkowski H, Ren Z, Turton J, Pang G, Daebritz J, Ehrchen J, Heidemann J, Borody T, Roth J, Clancy R: Phagocyte-specific S100 proteins are released from affected mucosa and promote immune responses during inflammatory bowel disease. *J Pathol* 2008; 216: 183-192.
68. Foell D, Wittkowski H, Roth J: Monitoring disease activity by stool analysis: from occult blood to molecular markers of intestinal inflammation and damage. *Gut* 2009; 58: 859-868.
69. Fox H, Mainwaring AR: Eosinophilic infiltration of the gallbladder. *Gastroenterology* 1972; 63: 1049-1052.
70. Franco V, Aragona F, Genova G, Florena AM, Stella M, Campesi G: Xanthogranulomatous cholecystitis. Histopathological study and classification. *Pathol Res Pract* 1990; 186: 383-390.
71. Friesen CA, Neilan N, Daniel JF, Radford K, Schurman JV, Li D-Y, Andre L, St Peter SD, Holcomb III GW: Mast cell activation and clinical outcome in pediatric cholelithiasis and biliary dyskinesia. *BMC Research Notes* 2011; 4: 322-329.
72. Furutani Y, Notake M, Fukui T, Ohue M, Nomura H, Yamada M, Nakamura S: Complete nucleotide sequence of the gene for human interleukin 1 alpha. *Nuclei Acids Res* 1986; 14: 3167-3179. Erratur in: *Nuclei Acids Res* 1986; 14: 5124.
73. Gadina M, Ferguson PR, Johnston JA: New interleukins: are there any more? *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16: 211-217.
74. Gaïni S, Koldkjaer OG, Pedersen C, Pedersen SS: Procalcitonin, lipopolysacchaide-binding protein, interleukin-6 and C-reactive protein in community-acquired infections and sepsis: a prospective study. *Crit Care* 2006; 10: R53.
75. Gebhardt C, Németh J, Angel P, Hess J: S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. *Biochem Pharmacol* 2006; 72: 1622-1631.
76. Gery I, Gershon RK, Waksman BH: Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell. *J Exp Med* 1972; 136: 128-142.
77. Gery I, Waksman BH: Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. II. The cellular source of potentiating mediators. *J Exp Med.* 1972 July 1; 136(1):143-155
78. Gilloteaux J, Tomasello LM, Elgison DA: Lipid deposits and lipo-mucosomes in human cholecystitis and epithelial metaplasia in chronic cholecystitis. *Ultrastruct Pathol* 2003; 27: 313-321.
79. Giraud E, Arese M, Toniatti C, Strasly M, Primo L, Mantovani A, Ciliberto G, Bussolini F: IL-6 is an in vitro and in vivo autocrine growth factor for middle T antigen-transformed endothelial cells. *J Immunol* 1996; 157: 2618-2623.
80. Gnadiuk MS: Local immune reactions in cholecystitis. *Vestn Khir Im I I Grek (Article in Russian)* 1997; 156: 19-21.

81. Godziemba-Maliszewska E: Znaczenie żywienia w etiopatogenezie i leczeniu kamicy żółciowej. *Nowa Medycyna - Gastroenterologia i Żywnienie I*, 1999; 10.
82. Gołąb J, Jakóbisiak M: Cytokiny. W: *Immunologia*, Gołąb J, Jakóbisiak M, Lasek W, Stokłosa T (red). Wyd Nauk PWN SA 2008, rozdział 9, 108-153.
83. Gołąb J, Stokłosa T, Grzesiowski P, Hryniewicz W, Nowis D: Odporność przeciwwzakaźna. W: *Immunologia*. Gołąb J, Jakóbisiak M, Lasek W, Stokłosa T (red.), Wyd Nauk PWN SA, Warszawa 2008, rozdział 21, 305-342.
84. Gonzalez-Amaro R, Garcia-Monzon G, Garcia-Buey L, Moreno-Otero R, Alonso JL, Yague E, Pivel JP, Lopez-Cabrera M, Fernandez-Ruiz E, Sanchez-Madrid F: Induction of tumor necrosis factor alpha production by human hepatocytes in chronic viral hepatitis. *J Exp Med* 1994; 79: 841-848.
85. Gordon JR, Burd PR, Galli SJ. Mast cells as a source of multifunctional cytokine. *Immunol Today* 1990; 11: 458-464.
86. Goyette J, Geczy CL: Inflammation-associated S100 proteins: new mechanisms that regulate function. *Amino Acids* 2011; 41: 821-842.
87. Grossman RM, Krueger J, Yourish D, Granelli-Piperno A, Murphy DP, May LT, Kupper TS, Sehgal PB, Gottlieb AB: Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6367-6371.
88. Gulubova M, Vodenicharov A: Structural examination of tryptase-, and VIP-positive mast cells in the common bile duct of patients with lithiasis. *Acta Histochem* 2001; 103: 437-452.
89. Haq Z, Rahman M, Siddique MA, Roy RK, Rahman AM, Khatun M: Interleukin-6 (IL-6) and tumour necrosis factor-alpha in open and laparoscopic cholecystectomy. *Mymensingh Med J* 2004; 13: 153-156.
90. Hanada M, Tujimura T, Kimura M: Cholecystic granulomas in gallstone disease. A clinicopathological study of 17 cases. *Acta Pathol Jpn* 1981; 31: 221-231.
91. Hauser C, Saurat J-H, Schmitt A, Jaunin F, Dayer J-M: Interleukin-1 is present in normal epidermis. *J Immunol* 1986; 136: 3317-3323.
92. He S-H: Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 309-318.
93. Hedges S, Svensson M, Svanborg C: Interleukin-6 response of epithelial cell lines to bacterial stimulation in vitro. *Infect Immun* 1992; 60: 1295-1301.
94. Heizmann CW, Cox AJ: New perspectives on S100 proteins: a multi-functional Ca<sup>2+</sup>-, Zn<sup>2+</sup>- and Cu<sup>2+</sup>-binding protein family. *BioMetals* 1998; 11: 383-397.
95. Heizmann CW, Fritz G, Schafer BW: S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci* 2002; 7: 1356-1368.
96. Hermanowicz A, Dębek W, Dzienis-Koronkiewicz E, Chyczewski L: Topography and morphometry of intestinal mast cells in children with Hirschsprung's disease. *Folia Histochem Cytobiol* 2008; 46: 65-68.

97. Hernandez-Nazara A, Curier-Lopez F, Martinez-Lopez E, Hernandez-Nazara Z, Panduro A: Genetic predisposition of cholesterol gallstone disease. *Ann Hepatol* 2006; 5:140-149.
98. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, et al.: Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 1986; 324: 73-76.
99. Hirano T, Taga T, Yamasaki K, Matsuda T, Yasukawa K, Hirata Y, Yawata H, Tanabe O, Akira S, Kishimoto T: Molecular cloning of the cDNA for interelukin-6/B cell stymulatory factor 2 and its receptor. *Ann N Y Acad Sci* 1989; 557: 167-178.
100. Holtmann H, Resch K. Cytokines. *Naturwissenschaften* 1995; 82: 178-187.
101. Horobets' RM: Dynamics of cytokines, homocysteine contents, indices of oxydative and nitrosative stress and cytopathic hypoxia in patients after cholecystectomy for acute cholecystitis. Connection with rate of postoperative purulent-inflammatory complications (Article in Ukrainian). *Klin Khir* 2004; 10: 44-47.
102. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM: Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259: 87-91.
103. Hsu SM, Raine L, Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAO) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577-580.
104. Hsu K, Champaiboon C, Guenther BD, Sorenson BS, Khammanivong A, Ross KF, Geczy CL, Herzberg MC: Anti-infective protective properties of S100 calgranulins. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem* 2009; 8: 290-305.
105. Hudson I, Hopwood D: Macrophages and mast cells in chronic cholecystitis and „normal” gall bladders. *J Clin Pathol* 1986; 39: 1082-1087.
106. Iepishyn AV, Sherstiuk Pla, Khabarova NA: Clinical-immunological research in chronic inflammatory diseases of the biliary tract. *Klin Khir* (Article in Ukrainian) 1997; 7-8: 31-33.
107. Ikebuchi K, Wong GG, Clark SC, Ihle JN, Hirai Y, Ogawa M: Interleukin-6 enhancement of interleukin-3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9035-9039.
108. Inoue J, Ishida T, Tsukamoto N, Kobayashi N, Naito A, Azuma S, Yamamoto T: Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signalling. *Exp Cell Res* 2000; 254: 14-24.
109. Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13: 357-368.
110. Jakeways MS, Mitchell V, Hashim IA, Chadwick SJ, Shenkin A, Green CJ, Carli F: Metabolic and inflammatory responses after open and laparoscopic cholecystectomy. *Br J Surg* 1994; 81: 127-131.
111. Jakóbisiak M: Regulacja odpowiedzi immunologicznej, pamięć immunologiczna. W: *Immunologia*, Gołąb J, Jakóbisiak M, Lasek W, Stokłosa T (red). Wyd Nauk PWN SA 2008, rozdział 16, 250-261.

112. Jastrzębska B, Filipek A: Funkcja białek wiążących jony  $\text{Ca}^{2+}$  z rodziny S100. *Post Biol Kom* 2003; 30: 383-397.
113. Jędrzejczak W. *Cytokiny*. Wrocław, Volumed, 1997; 4:33-50.
114. Kaczmarek E, Strzelczyk R: From two to three-dimensional visualisation of structures in light and confocal microscopy – applications for biomedical studies. In: Mendez-Vilas A, Labajos-Broncano L (Eds): *Current issues on multidisciplinary microscopy research and education*. FORMATEX microscopy book series no. II Formatex Research Centre, Badajoz 2005, 289-295.
115. Kang J, Der SD. Cytokine functions in the formative stages of a lymphocyte's life. *Curr Opin Immunol* 2004; 16: 180-190.
116. Karayiannakis AJ, Asimakopoulos B, Efthimiadou A, Tsaroucha AK, Polychronidis A, Simopoulos C: Serum leptin levels and their response during laparoscopic and open cholecystectomy. *Eur Cytokine Netw* 2005; 16: 91-96.
117. Kasprzak A, Zabel M, Biczysko W, Wysocki J, Adamek A, Spachacz R, Surdyk-Zasada J: Expression of cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , and IL-2) in chronic hepatitis C: comparative hybridocytochemical and immunocytochemical study in children and adult patients. *J Histochem Cytochem* 2004; 52: 29-38.
118. Kasprzak A, Malkowski W, Biczysko W, Seraszek A, Sterzyńska K, Zabel M. Histological alterations of gallbladder mucosa and selected clinical data in young patients with symptomatic gallstones. *Pol J Pathol* 2011; 1: 41-49.
119. Keränen U, Järvinen H, Kärkkäinen P, Kiviluoto T, Kivilaakso E, Soinila S: Substance P-an underlying factor for pouchitis? Prospective study of substance P- and vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive innervation and mast cells. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 1665-1671.
120. Kerkhoff C, Eue I, Sorg C: The regulatory role of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9) in the transendothelial migration of human leukocytes. *Pathobiology* 1999; 67: 230-232.
121. Kianmanesh R, Scaringi S, Castel B, Flamant Y: Precancerous lesions of the gallbladder. *J Chir (Paris)* 2007; 144: 278-286.
122. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T: Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 1995; 86: 1243-1254.
123. Kishimoto T: Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res Ther* 2006; 8(Suppl 2): S2.
124. Kitasato A, Tajima Y, Kuroki T, Tsutsumi R, Adachi T, Mishima T, Kanematsu T: Inflammatory cytokines promote inducible nitric oxide synthase-mediated DNA damage in hamster gallbladder epithelial cells. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6379-6384.
125. Kleinschmidt S, Meneses F, Nolte I, Hewicker-Trautwein M: Characterization of mast cell numbers and subtypes in biopsies from gastrointestinal tract of dogs with lymphocytic-plasmacytic or eosinophilic gastroenterocolitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 120: 80-92.
126. Kocher M, Kenny PA, Farram E, Abdul Majid KB, Finlay-Jones JJ, Geczy CL: Functional chemotactic factor CP-10 and MRP-14 are abundant in murine abscesses. *Infect Immun* 1996; 64: 1342-1350.

127. Kolb WP, Granger GA: Lymphocyte in vitro cytotoxicity: characterization of human lymphotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968; 61: 1250-1255.
128. Kołaczowska E: Zapalenie (ostre) jako reakcja korzystna dla organizmu – historia badań a najnowsze osiągnięcia. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych*. 2007; 56: 27-38.
129. Kopeć-Szlęzak J: Cytokiny w procesach odpornościowych. *Onkol Pol* 2005; 8, 4: 217-222.
130. Korobowicz A: Biologia czynnika martwicy nowotworów typu alfa (TNF- $\alpha$ ). *Pol Merk Lek* 2006;21 (124): 358-361.
131. Kosiara M, Paradowski L: Kalprotektyna. *Gastroenterologia Polska* 2008; 15: 333-335.
132. Kouroumalis E, Hopwood D, Ross PE, Bouchier IA: Human gallbladder epithelium: non-specific esterases in cholecystitis. *J Pathol* 1984; 142: 151-159.
133. Koval'chuk LA, Venger IK, Piatnochka VI: Disordered immunologic reactivity in patients with chronic calculous cholecystitis. *Klin Khir* 1989; 9: 6-7.
134. Kozicki I: Kamica pęcherzyka żółciowego. *Lekarz Rodzinny* 2008; r. XIII, nr 7-8: 794-799.
135. Krakauer T: Structural analysis of the charge heterogeneity of human interleukin 1. *Arch Biochem Biophys* 1984; 234: 371-376.
136. Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert L, Lu SD: A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 1988; 53: 45-53.
137. Krishnaswamy G, Kelley J, Johnson D, Youngberg G, Stone W, Huang SK, Bieber J, Chi DS: The human mast cells: functions in physiology and disease. *Front Biosci* 2001; 6: D1109-D1127.
138. Kristiansson M, Saraste L, Soop M, Sundqvist KG, Thörne AZ: Diminished interleukin-6 and C-reactive protein responses to laparoscopic versus open open cholecystectomy. *Acta Anaesthesiol Scand* 1999; 43: 146-152.
139. Krueger J, Ray A, Tamm I, Sehgal PB: Expression and function of interleukin-6 in epithelial cells. *J Cell Biochem* 1991; 45: 327-334.
140. Kumar S, Kumar S, Kumar S: Infection as a risk factor for gallbladder cancer. *J Surg Oncol* 2006; 93: 633-639.
141. Lasek W: Nadwrażliwość. W: *Immunologia*, Gołąb J, Jakóbisiak M, Lasek W, Stokłosa T (red). *Wyd Nauk PWN SA* 2008, rozdział 22, 343-375.
142. Leach ST, Mitchell HM, Geczy CL, Sherman PM, Day AS: S100 calgranulin proteins S100A8, S100A9 and S100A12 are expressed in the inflamed gastric mucosa of *Helicobacter pylori*-infected children. *Can J Gastroenterol* 2008; 22: 461-464.
143. Leach ST, Yang Z, Messina I, Song C, Geczy CL, Cunningham AM, Day AS: Serum and mucosal S100 proteins, calprotectin (S100A8/S100A9) and S100A12, are elevated at diagnosis in children with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 1321-1331.

144. Liao Z, Tu JH, Small CB, Schnipper SM, Rosenstreich DL: Increased urine interleukin-1 levels in aging. *Gerontology* 1993; 39: 19-27.
145. Lipsky PE: Interleukin-6 and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 2006; 8, Suppl (2): S4; doi: 10.1186/ar1918.
146. Locksley RM, Killen N, Lenardo MJ: The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001; 104: 487-501.
147. Lomedico PT, Gubler R, Hellmann CP, Dukovich M, Giri JG, Pan YE, Collier K, Semionow R, Chua AO, Mizel SB: Cloning and expression of murine interleukin-1 cDNA in *Escherichia coli*. *Nature* 1984; 312: 458-462.
148. Lotz M, Zuraw BL, Carson DA, Jirik FR: Hepatocytes produce interleukin-6. *Ann NY Acad Sci* 1989, 557, 509-511.
149. Lubecka-Macura A, Kohut A: Nadrodzina TNF – mechanizmy działania, funkcje biologiczne i możliwości terapeutyczne. *Przeegl Gastrol* 2010; 5: 303-309.
150. Luger N, Stoll R, Kucharzik T, Schmid KW, Rohlmann G, Burmeister G, Sorg C, Domschke W: Immunohistochemical distribution and serum levels of the Ca(2+)-binding proteins MRP8, MRP14 and their heterodimeric form MRP8/14 in Crohn's disease. *Digestion* 1995; 65: 406-414.
151. Lugo-Vicente HL: Trends in management of gallbladder disorders in children. *Pediatr Surg Int* 1997; 12: 348-352.
152. Luster AD: Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New Engl J Med* 1998, 338: 436-445.
153. Łukaszewicz M, Mroczo B, Szmitkowski M. Znaczenie kliniczne interleukiny 6 (IL-6) jako czynnika rokowniczego w chorobie nowotworowej. *Pol Arch Med Wewn* 2007; 117: 247-251.
154. Maclure KM, Hayes KC, Colditz GA, Stamfer MJ, Speizer FE, Willett WC: Weight, diet, and the risk of symptomatic gallstones in middle-aged woman. *N Engl J Med* 1989; 321: 563-569.
155. Malkowski W: Zmiany morfologiczne błony śluzowej pęcherzyka żółciowego i tkankowa ekspresja wybranych białek u pacjentów z kamcią żółciową. Praca doktorska. Poznań 2010.
156. March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Price V, Gillis S, Henney CS, Kronheim SR, Grabstein K, et al: Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* 1985; 315: 641-647.
157. Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G: S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322: 1111-1122.
158. Marsch-Ziegler U, Palme G: Effect of a lithogenic diet and starvation on the regeneration of gallbladder epithelium (Article in German). *Leber Magen Darm* 1982; 12: 157-161.
159. Maruszyński M, Pojda Z: Interleukin 6 (IL-6) levels In the monitoring of surgical trauma. A comparison of serum IL-6 concentrations in patients treated by cholecystectomy via laparotomy or laparoscopy. *Surg Endosc* 1995; 9: 882-885.

160. Mathur A, Al-Azzawi HH, Lu D, Yancey KW, Swartz-Basile DA, Nakeeb A, Pitt HA: Steatocholecystitis: the influence of obesity and dietary carbohydrates. *J Surg Res* 2008; 147: 290-297.
161. Maurer KJ, Rao VP, Ge Z, Rogers AB, Oura TJ, Carey MC, Fox JG: T-cell function is critical for murine cholesterol gallstones formation. *Gastroenterology* 2007; 133: 1304-1315.
162. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA: Mast cells. *Physiol Rev* 1997; 77: 1033-1079.
163. Morales CR. Argentaffin and migrating mast cells in the bovine gallbladder epithelium. *Anat Anz* 1983; 154:419-423.
164. Mori M, Watanabe M, Sakuma M, Tsutsumi Y: Infectious etiology of xanthogranulomatous cholecystitis: immunohistochemical identification of bacterial antigens in the xanthogranulomatous lesions. *Pathol International* 1999; 49: 849-852.
165. Mosley B, Urdal D, Prickett KS, Larsen A, Cosman D, Conlon PJ, Gillis S, Dower SK: The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 alpha precursor but not the interleukin 1 beta precursor. *J Biol Chem* 1987; 262: 2941-2944.
166. Muraguchi A, Hirano T, Tang B, Matsuda T, Horii Y, Nakajima K, Kishimoto T: The essential role of B-cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J Exp Med* 1988; 167: 332-344.
167. Muraguchi A, Kishimoto T, Miki Y, Kuritani T, Kaieda T, Yoshizaki K, Yamamura Y: T cell-replacing factor (TRF)-induced IgG secretion in human B blastoid cell line and demonstration of acceptors for TRF. *J Immunol* 1981; 127: 412- 416.
168. Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res* 2002; 4 (Suppl 3): S233-S242.
169. Nakamura T, Ajiki T, Murao S, Kamigaki T, Maeda S, Ku Y, Kuroda Y: Prognostic significance of S100A4 expression in gallbladder cancer. *Int J Oncol* 2002; 20: 937-941.
170. Nakashiro H, Haraoka S, Fujiwara K, Harada S, Hisatsugu T, Watanabe T: Xanthogranulomatous cholecystitis. Cell composition and a possible pathogenic role of cell-mediated immunity. *Pathol Res Pract* 1995; 191: 1078-1086.
171. Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin J, Pennica D, Goeddel DV, Gray PW: Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res* 1985; 13: 6361-6373.
172. Newton RC: Human monocyte production of interleukin-1: parameters of the induction of interleukin-1 secretion by lipopolysaccharides. *J Leuk Biol* 1986; 39: 299-311.
173. Okada M, Kitahara M, Kishimoto S, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T: IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells. *J Immunol* 1988; 141: 1543-1549.
174. Old LJ: Tumor necrosis factor (TNF): *Science* 1985; 230: 630-632.
175. Orchard GE: Comparison of immunocytochemical labelling of melanocyte differentiation antibodies melan-A, tyrosinase and HMB 45 with NKIC3 and S100



- protein in the evaluation of benign naevi and malignant melanoma. *Histochem J* 2000; 32: 475-481.
176. Papadakis KA, Targan SR: Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors. *Gastroenterology* 2000, 119: 1148-1157.
  177. Papadas T, Batistatou A, Ravazoula P, Zolota V, Goumas P: S-100 protein-positive dendritic cells and CD34-positive dendritic interstitial cells in palatine tonsils. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2001; 258: 243-245.
  178. Pardo-Mindán FJ, Joly MA, Santamaria M, Muñoz Navas M: Eosinophil inflammatory reaction in isolated organs. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1980; 8: 23-30.
  179. Park JY, Pillinger MH: Interleukin-6 in pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2007; 65 (Suppl 1): S4-S10.
  180. Pauletzki J: Kurczliwość pęcherzyka żółciowego. *Magazyn Medycyny Współczesnej* 1999; 3: 33-37.
  181. Paul-Pletzer K: Tocilizumab: Blockade of interleukin-6 signaling pathway as a therapeutic strategy for inflammatory disorders. *Drugs Today* 2006; 42: 559-576.
  182. Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV: Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 1984; 312: 724-729.
  183. Pihusch M, Pihusch R, Fraunberger P, Pihusch V, Andreesen R, Kolb HJ, Holler E: Evaluation of C-reactive protein, interleukin-6 and procalcitonin levels in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Eur J Haematol* 2006; 76: 93-101.
  184. Pitt HA: Hepato-pancreato-biliary fat: the good, the bad and the ugly. *HPB* 2007; 9: 92-97.
  185. Polińska B, Matowicka-Karna J, Kemonia H: Cytokiny w nieswoistych zapalnych chorobach jelit. *Postępy Hig Med Dośw* 2009; 63: 389-394.
  186. Pritts T, Hungness E, Wang Q, Robb B, Hershko D, Hasselgren PO: Mucosal and enterocyte IL-6 production during sepsis and endotoxemia – role of transcription factors and regulation by the stress response. *Am J Surg* 2002; 183: 372-383.
  187. Prystowsky JB, Rege RV: Interleukin-1 mediates guinea pig gallbladder inflammation in vivo. *J Surg Res* 1997; 71: 123-126.
  188. Qwarnstrom EE, Page RC, Gillis S, Dower SK: Binding, internalization, and intracellular localization of interleukin-1 beta in human diploid fibroblasts. *J Biol Chem* 1988; 263: 8261-8269.
  189. Ramadori G, Sipe JD, Dinarello CA, Mizel SB, Colten HR: Pretranslational modulation of acute phase hepatic protein synthesis by murine recombinant interleukin 1 (IL-1) and purified human IL-1. *J Exp Med* 1985; 162: 930-942.
  190. Redmond HP, Watson RW, Houghton T, Condron C, Watson RG, Bouchier-Haves D: Immune function in patients undergoing open vs laparoscopic cholecystectomy. *Arch Surg* 1994; 129: 1240-1246.
  191. Rege RV: Inflammatory cytokines alter human gallbladder epithelial cell absorption/secretion. *J Gastrointest Surg* 2000; 4: 185-192.

192. Rege RV, Prystowsky JB: Inflammatory properties of bile from dogs with pigment gallstones. *Am J Surg* 1996, 171, 197-201.
193. Rege RV, Prystowsky JB: Inflammation and a thickened mucus layer in mice with cholesterol gallstones. *J Surg Res* 1998; 74: 81-85.
194. Reith HB, Kaman S, Mittelkötter O, Kilic Y, Kozuschek W: Cytokine activation in patients undergoing open or laparoscopic cholecystectomy. *Int Surg* 1997; 82: 389-393.
195. Robak T: Cytokiny stosowane jako leki. *Alergia Astma Immunologia* 1996; 1: 35-40.
196. Robak T: *Biologia i farmakologia cytokin*. Warszawa, Wyd Nauk PWN, 1995; 9: 122-133.
197. Robinson MJ, Tessier P, Poulsom R, Hogg N: The S100 affinity to heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans on endothelial cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 3658-3665.
198. Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, et al.: Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 1997; 6: 315-325.
199. Rosai J: Gallbladder and extrahepatic bile ducts. In: Rosai J (ed) *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*. Mosby, Edingburgh, London, N York, Oxford, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Toronto 2004, 1035-1055.
200. Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA: Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 227-236.
201. Rose-John S, Waetzig GH, Sheller J, Grötzinger J, Seegert D: The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11: 613-624.
202. Roth J, Burwinkel F, van den Bos C, Goebeler M, Vollmer E, Sorg C: MRP8 and MRP14, S-100-like proteins associated with myeloid differentiation, are translocated to plasma membrane and intermediate filaments in a calcium-dependent manner. *Blood* 1993; 82: 1875-1883.
203. Roth J, Vogl T, Sorg C, Sunderkotter C: Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules. *Trends Immunol* 2003; 24: 155-158.
204. Rozwadowska N, Fiszer D, Kurpisz M. Funkcja układu genów interleukiny 1 w procesach immunomodulacji, apoptozy i proliferacji w gonadzie męskiej. *Postępy Hig Med Dośw* 2005; 59: 56-67.
205. Rugtveit J, Brandtzaeg P, Halstenses TS, Fausa O, Scott H: Increased macrophage subset in inflammatory bowel disease: apparent recruitment from peripheral blood monocytes. *Gut* 1994; 35: 669-674.
206. Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA: Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol* 2003; 170: 3233-42.
207. Sanak M. Podstawy medycyny molekularnej. Odcinek 6: Układy sygnałowe komórki – cytokiny (szlak fosforylacji białek). *Med Prakt* 1998; 06:161-168.

208. Sanchez-Pobre P, Lopez-Rios Moreno F, Colina F, Yela C, Manzano M, Rodriguez S, Martin A, Casis B, Garfia C, Castellano G, Solis-Herruzo JA: Eosinophilic cholecystitis: an infrequent cause of cholecystectomy. *Gastroenterol Hepatol* 1997; 20: 21-23.
209. Sawada S, Harada K, Isse K, Sato Y, Sasaki M, Kaizaki Y, Nakanuma Y: Involvement of *Escherichia coli* in pathogenesis of xanthogranulomatous cholecystitis with scavenger receptor class A and CXCL16-CXCR6 interaction. *Pathol Int* 2007; 57: 652-663.
210. Savard CE, Blinman TA, Choi HS, LeeSK, Pandol SJ, Lee SP: Expression of cytokine and chemokine mRNA and secretion of tumor necrosis factor-alpha by gallbladder epithelial cells: response to bacterial lipopolysaccharides. *BMC Gastroenterol* 2002; 2: 23; doi: 10.1186/1471-230X-2-23.
211. Scheller J, Ohnesorge N, Rose-John S: Interleukin-6 (IL-6) trans-signaling in chronic inflammation and cancer. *Scand J Immunol.* 2006; 63: 321-329.
212. Schietroma M, Carlei F, Franchi L, Mazzotta C, Sozio A, Lygidakis NJ, Amicucci G: A comparison of serum interleukin-6 concentrations in patients treated by cholecystectomy via laparotomy or laparoscopy. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 1595-1599.
213. Schirmer BD, Winters KL, Edlich RF: Cholelithiasis and cholecystitis. *J Long Term Eff Med Implants* 2005; 15: 329-338.
214. Sehgal PB: Interleukin-6: molecular pathophysiology. *J Invest Dermatol* 1990; 94(6 Suppl): 2S-6S.
215. Sehgal PB: Interleukin-6-type cytokines in vivo: regulated bioavailability. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996; 213: 238-247.
216. Semenzato G. Tumor necrosis factor: a cytokine with multiple biological activities. *Br J Cancer* 1990; 61: 354-361.
217. Sen J, Belli A: S100B in neuropathologic states: the CRP of the brain. *J Neurosci Res* 2007; 85: 1373-1380.
218. Shabo Y, Lotem J, Rubinstein M, Revel M, Clark SC, Wolf SF, Kamen R, Sachs L: The myeloid blood cell differentiaton-inducing protein MGI-2A is interleukin-6. *Blood* 1988; 72: 2070-2073.
219. Shakov R, Simoni G, Villacin A, Baddoura W: Eosinophilic cholecystitis, with a review of the literature. *Ann Clin Lab Sci* 2007; 37: 182-185.
220. Shi JS, Zhou LS, Han Y, Zhu AJ, Sun XJ, Yang YJ: Expression of tumor necrosis factor and its receptor in gallstones and gallbladder carcinoma tissue. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004; 3: 448-452.
221. Shi JS, Zhou LS, Jiao XY, Lu Y, Hao XY, Han WS, et al. Clinical significance of detecting tumor necrosis factor and its receptor in serum and bile in patients with gallbladder cancer and gallstone. *Chin J Hepatobiliary Surg* 2001; 7: 82-83.
222. Shoïkhet IaN, Ovchinnikov VI, Platunov VD, Shuster LV: Correction of cellular and humoral defense reactions in the surgical treatment of acute cholecystitis. *Khirurgiia (Mosk)* (Article in Russian) 1991; 11: 18-21.

223. Singh DK, Shankar R, Gondal R, Mathotra V, Mishra P: Idiopathic eosinophilic cholecystitis with cholelithiasis: a case report and review of literature. *The Internet J Surg* 2008; 16, no 1.
224. Sośnik H, Sośnik K, Noga L: Kamica żółciowa a masa ciała. Analiza statystyczna materiału autopsyjnego. *Gastroenterol Pol* 2006; 13: 177-180.
225. Sperr WR, Jordan JH, Fiegl M, Escribano L, Bellas C, Dirnhofner S, Semper H, Simonitsch-Klupp I, Horny HP, Valent P: Serum tryptase level in patients with mastocytosis: correlation with mast cell burden and implication for defining the category of disease. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 128: 136-141.
226. Spirli C, Nathanson MH, Fiorotto R, Duner E, Denson LA, Sanz JMDi Virgilio F, Okolicsanyi L, Casagrande F, Strazzabosco M: Proinflammatory cytokines inhibit secretion in rat bile duct epithelium. *Gastroenterology* 2001; 121: 156-169.
227. Srikrishna G: S100A8 and S100A9: New insights into their roles in malignancy. *J Innate Immun* 2012; 4: 31-40.
228. Steinbakk M, Naess-Andersen CF, Lingaas E, Dale I, Brandtzaeg P, Fagerhol MK: Antimicrobial actions of calcium binding leukocyte L1 protein, calprotectin. *Lancet* 1990; 336: 763-765.
229. Stevenson FT, Bursten SL, Fanton C, Locksley RM, Lovett DH: The 31-kDa precursor of interleukin-1 $\alpha$  is myristoylated on specific lysines within the 16-kDa N-terminal propiece. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7245-7249.
230. Stevenson FT, Torrano F, Locksley RM, Lovett DH: Interleukin-1: The pattern of translation and intercellular distribution support alternative secretory mechanisms. *J Cell Physiol* 1992; 152: 223-231.
231. Stevenson FT, Turck J, Locksley RM: The N-terminal propiece of interleukin 1 $\alpha$  is a transforming nuclear oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997: 94: 508-513.
232. Straumann A. Idiopathic eosinophilic gastrointestinal diseases in adults. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2008; 22: 481-496.
233. Striz I, Trebichavský I: Calprotectin – a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. *Physiol Res* 2004; 53: 245-253.
234. Stulik J, Osterreicher J, Koupilová K, Knizek, Macela A. Bures J, Jandik P, Langr F, Dedic K, Jungblut PR. The analysis of S100A9 and S100A8 expression in matched sets of macroscopically normal colon mucosa and colorectal carcinoma: the S100A9 and S100A8 positive cells underlie and invade tumor mass. *Electrophoresis* 1999; 20: 1047-1054.
235. Szarszewski A, Korzon M, Kurlenda J, Liberek A, Kamińska B, Bogotko-Szarszewska M, Zagierski M: Faecal calprotectin: a new acute inflammatory reactant in the diagnosis of Childhood Inflammatory Bowel Disease – our experience. *Med Sci Monit* 2003; 9 (Suppl 4): 11-13.
236. Szczepański W, Stachura J. Patologia wątroby i dróg żółciowych. W: Patologia znaczy słowo o chorobie. Stachura J, Domagała W (red.), T II, Polska Akademia Umiejętności, Wydział Lekarski, Kraków 2009; 872-876.
237. Szczygieł Ł: Kamica żółciowa. *Gazeta Farmaceutyczna* 2008; 3: 40-42.

238. Szwed Z, Życiński P. 4xF – nadal aktualne czynniki ryzyka kamicy żółciowej. *Wiadomości Lekarskie* 2007, LX, 11-12; 570-573.
239. Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamsaki K, Yasukawa K, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T: Interleukin-6 triggers the association of its receptor with possible signal transducer, gp130. *Cell* 1989; 58: 573-581.
240. Taga T, Kawanishi K, Hardy RR, Hirano T, Kishimoto T: Receptors for B cell stimulatory factor 2 (BSF-2): Quantitation, specificity, distribution and regulation of the expression. *J Exp Med* 1987; 166: 967-981.
241. Takai Y, Wong GG, Clark SC, Burakoff SJ, Hermann SH: B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1988; 140: 508-512.
242. Tang P, Hung M-C, Klostergaard: Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* 1996; 35: 8216-8225.
243. Tateishi N, Shimoda T, Yada N, Shinagawa R, Kagamiishi Y: S100B: astrocyte specific protein. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 2006; 26: 11-16.
244. Tazuma S, Kajiyama G: Carcinogenesis of malignant lesions of the gall bladder. The impact of chronic inflammation and gallstones. *Langenbecks Arch Surg* 2001, 386, 224-229.
245. Teefey SA, Kimmey MB, Bigler SA, Trowers EA, Sillery JK: Gallbladder wall thickening: an in vitro sonographic study with histologic correlation. *Acad Radiol* 1994; 1:121-127.
246. Tohya K, Umemoto E, Miyasaka M: Microanatomy of lymphocyte-endothelial interactions at the high endothelial venules of lymph nodes. *Histol Histopathol* 2010; 25: 781-794.
247. Toledo OM, Morales CR, Pereyra LA, Jordão T, Montes GS: Migrating mast cells in the gallbladder epithelium of cattle and sheep. A comparative morphologic and histochemical study. *Histochemistry* 1981; 72: 433-442.
248. Tomecki R, Dzieniszewski J, Gerke W, Kalina Z, Marlicz K, Maliszewska E, Mandat A, Szwed Z, Tarnowska M, Butruk E: Cholecystolithiasis in the urban population in Poland (Article in Polish). *Pol Arch Med Wewn* 1995; 94: 243-249.
249. Tonini GP, Calasaro A, Cara A, Di Martino D: Inducible expression of calcycline, a gene with strong homology to S100 protein, during neuroblastoma cell differentiation and its prevalent expression in Schwann-like cell line. *Cancer Res* 1991; 51: 1733-1737.
250. Tsai C-J: Steatocholecystitis and fatty gallbladder disease. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 1857-1863.
251. Tsaregorodtseva TM, Zotina MM, Serova TI, Sokolova GN, Iakimchuk GN: Interleukins in chronic diseases of digestive organs (Article in Russian). *Ter Arkh* 2003; 75: 7-9.
252. Tsaregorodtseva TM, Serova TI, Il'ichenko Llu, Sukhareva GV, Sokolova GN, Trubitsyna IE, Nikol'skaia K, Klishina MV, Lazebnik LB: Cytokines and cytokine therapy in gastrointestinal diseases (Article in Russian). *Ter Arkh* 2004; 76: 69-72.

253. Ueyama M, Maruyama I, Osame M: Marked increase in plasma interleukin-6 in burn patients. *J Lab Clin Med.* 1992; 120: 693-698.
254. Vanden Berghe W, Vermeulen L, De Wilde G, De Bosscher K, Boone E, Haegeman G: Signal transduction by tumor necrosis factor and gene regulation of the inflammatory cytokine interleukin-6. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 1185-1189.
255. Viemann D, Strey A, Janning A, Jurk K, Klimmek K, Vogl T, et al.: Myeloid-related proteins 8 and 14 induce a specific inflammatory response in human microvascular endothelial cells. *Blood* 2005; 105: 2955-2962.
256. Voganatsi A, Panyutich A, Miyasaki KT, Murthy RK: Mechanism of extracellular release of human neutrophil calprotectin complex. *J Leukocyt Biol* 2001; 70: 130-134.
257. Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MA, Nacken W, Foell D, van der Poll T, Sorg C, Roth J: Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat Med* 2007; 13: 1042-1049.
258. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P: Tumor necrosis factor signalling: Cell Death Differ 2003; 10: 45-65.
259. Wakabayashi G, Gelfand JA, Jung WK, Connolly RJ: Staphylococcus epidermidis induces complement activation, tumor necrosis factor and interleukin-6, a shock-like state and tissue injury in rabbits without endotoxemia. Comparison to Escherichia coli. *J Clin Invest* 1991; 87:1925-1935.
260. Wang D Q-H: Aging per se is an independent risk factor for cholesterol gallstone formation in gallstone susceptible mice. *J Lipid Res* 2002; 43: 1950-1959.
261. Webb AC, Collins KL, Auron PE, Eddy RL, Nakai H, Byers MG, Haley LL, Henry WM, Shows TB: Interleukin-1 gene (IL1) assigned to long arm of human chromosome 2. *Lymphokine Res* 1986; 5: 77-85.
262. Weedon D. Pathology of the gallbladder. New York, 1984, Masson Publishing USA.
263. Welle M: Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J Leukoc Biol* 1997; 61: 233-245.
264. Xiao W, Hodge DR, Wang L, Yang X, Zhang X, Farrar WL: NF-kappaB activates IL-6 expression through cooperation with c-Jun and IL-6-AP1 site, but is independent of its IL-6-NFkappaB regulatory site in autocrine human multiple myeloma cells. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 1007-1017.
265. Xu K, Geczy CL: IFN-gamma and TNF regulate macrophage expression of the chemotactic S100 protein S100A8. *J Immunol* 2000; 164: 4916-4923.
266. Yamamoto S, Jiang H, Kato R: Inhibition of anthralin-caused skin tumor promotion and interleukin-1 alpha production by potent immunosuppressant FK506. *Cancer Lett* 1994; 83:185-189.
267. Yasoshima M, Kono N, Sugawara H, Katayanagi K, Harada K, Nakanuma Y: Increased expression of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in pathologic biliary epithelial cells: *Lab Invest* 1998; 78, 89-100.

268. Yen T, Harrison CA, Devery JM, Leong S, Iismaa SE, Yoshimura T, Geczy CL: Induction of the S100 chemotactic protein, CP-10, in murine microvascular endothelial cells by proinflammatory stimuli. *Blood* 1997; 90: 4812-4821.
269. Yol S, Kartal A, Vatansev C, Aksoy F, Toy H: Sex as a factor in conversion from laparoscopic cholecystectomy to open surgery. *JSLs* 2006; 10: 359-363.
270. Zen Y, Harada K, Sasaki M, Tsuneyama K, Katayanagi K, Yamamoto Y, Nakanuma Y: Lipopolysaccharide induces overexpression of MUC2 and MUC5AC in cultured biliary epithelial cells. Possible key phenomenon of hepatolithiasis. *Am J Pathol* 2002; 161: 1475-1484.
271. Zhang X, Mosser DM: Macrophage activation by endogenous danger signals. *J Pathol* 2008; 214: 161-178.
272. Zhang Y, Lin J, Vilcek J: Synthesis of interleukin-6 (interferon- $\beta$ 2/B-cell stimulatory factor2) in human fibroblasts is triggered by an increase in intracellular cyclic AMP. *J Biol Chem* 1988; 263: 6177-6182.
273. Zhao G, Luo M, Wu ZY, Zhang B, Gao RL, Zhang ZQ: Langerhans cell sarcoma involving gallbladder and peritoneal lymph nodes: a case report. *Int J Surg Pathol* 2009; 17: 347-353.