



Zmiany w aktywności metaloproteinaz 2 i 9 w wątrobie szczura w doświadczalnym modelu cholestazy z uwzględnieniem czasu jej trwania, wraz z oceną wybranych jej cech

Changes in activity of metalloproteinases 2 and 9 in rat liver in experimental model of cholestasis taking into account its duration and assessment of selected features

Krzysztof Suszyński¹, Natalia Białoń¹, Dariusz Górka¹, Anna Dolińska¹, Mikołaj Górka²

¹Zakład Medycyny Sportowej i Fizjologii Wysiłku Fizycznego, Wydział Nauk o Zdrowiu w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach / Department of Sports Medicine and Physiology of Physical Effort, Faculty of Health Sciences in Katowice, Medical University of Silesia, Katowice, Poland

²Centrum Medycyny Doświadczalnej, Wydział Nauk Medycznych w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach / Department of Experimental Medicine, Faculty of Medical Sciences in Katowice, Medical University of Silesia, Katowice, Poland

STRESZCZENIE

WSTĘP: Cholestaza, inaczej zastój żółci, pojawia się wówczas, gdy dochodzi do zablokowania przepływu żółci. Obecnie wyróżnia się dwa rodzaje cholestazy: zewnątrzwątrobową i wewnątrzwątrobową. Do czynników wywołujących cholestazę zalicza się m.in.: alkoholowe i niealkoholowe stłuszczenia wątroby, infekcje, choroby dróg żółciowych, nowotwory dróg żółciowych czy choroby trzustki. Celem przeprowadzonych badań była ocena cech cholestazy i zmian w aktywności metaloproteinaz 2 i 9.

MATERIAŁ I METODY: Materiał badawczy stanowiło 36 szczurów samców szczepu Sprague-Dawley o masie ciała 350–420 g. Zwierzęta podzielono na 3 grupy badane i 3 grupy kontrolne, po 6 zwierząt w każdej. W grupach badanych wywołano model cholestazy zewnątrzwątrobowej. Zwierzęta z grup badanych i kontrolnych reoperowano kolejno po upływie 3, 7 i 14 dni. Aktywność wybranych metaloproteinaz określono metodą zymograficzną. Następnie ocenie mikroskopowej poddano preparaty histopatologiczne, oceniając charakterystyczne dla wątroby szczura cechy cholestazy.

WYNIKI: Wszystkie grupy poddano analizie statystycznej z użyciem testu Kruskala i Wallisa dla wartości nieparametrycznych. Komputerowa analiza densytometryczna wyników zymografii uzyskanych z pobranego materiału wykazała aktywność MMP-2 i MMP-9. Znamienne statystycznie różnice oznaczono w przypadku MMP-2, stwierdzając jej podwyższoną aktywność w grupach I C, III C (* $p < 0,05$) w porównaniu z grupami kontrolnymi. Zaobserwowano tendencję wzrostową.

Received: 28.09.2022

Revised: 28.11.2022

Accepted: 29.12.2022

Published online: 19.07.2023

Adres do korespondencji: mgr Natalia Białoń, Zakład Medycyny Sportowej i Fizjologii Wysiłku Fizycznego, Wydział Nauk o Zdrowiu w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Medyków 12, 40-752 Katowice, tel. +48 32 208 87 12, e-mail: d201080@365.sum.edu.pl



Artykuł opublikowany w modelu Open Access i udostępniony na licencji Creative Commons Uznanie autorstwa-Na tych samych warunkach 4.0 Międzynarodowe (CC BY-SA 4.0), określającej zasady jego wykorzystania. Dozwolone jest kopiowanie, zmienianie, rozprowadzanie i przedstawianie utworu w dowolnym celu, także komercyjnym, pod warunkiem oznaczenia autorstwa i wykonanych modyfikacji utworu, jeśli takie zostały wykonane, a przetwarzając lub tworząc na podstawie utworu, należy udostępnić swoje dzieło na tej samej licencji co oryginał. Pełny tekst licencji dostępny na stronie <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/legalcode.pl>.

Wydawca: Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach



WNIOSKI: Wraz z upływem czasu trwania cholestazy wzrasta aktywność MMP-2. Wyniki analizy histopatologicznej wybranych cech cholestazy wykazały, iż znamienne wyższe oceny uzyskiwały zwierzęta w doświadczalnym modelu cholestazy.

SŁOWA KLUCZOWE

MMP-2, MMP-9, cholestaza zewnątrzwątrobową, metaloproteiny macierzy pozakomórkowej

ABSTRACT

INTRODUCTION: Cholestasis, otherwise known as bile stasis, occurs when the flow of bile is blocked. There are currently two types of cholestasis: extrahepatic and intrahepatic. The factors causing cholestasis include alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease, infections, biliary tract disease, biliary tract tumours or pancreatic disease. The aim of this study was to assess the features of cholestasis and changes in the activity of metalloproteinases 2 and 9.

MATERIAL AND METHODS: The study material consisted of 36 male rats of the Sprague-Dawley strain weighing 350–420 g. The animals were divided into 3 study groups and 3 control groups, each with 6 animals. An extrahepatic cholestasis model was induced in the study groups. In both groups, the animals were reoperated on consecutively after 3, 7 and 14 days. The activity of the selected metalloproteinases was assessed by zymography. The histopathological preparations were then assessed microscopically, evaluating the characteristic features of cholestasis in rat liver.

RESULTS: All the groups were statistically analysed using the Kruskal-Wallis test for non-parametric values. Computerised densitometric analysis of the zymography results obtained from the collected material showed the presence of MMP-2 and MMP-9 activity. Statistically significant differences were determined for MMP-2, where its activity was found to be elevated in groups I C, III C (* $p < 0.05$) compared to the control groups. An increasing trend was observed.

CONCLUSIONS: MMP-2 activity increases with the duration of cholestasis. The results of the histopathological analysis of selected features of cholestasis showed that significantly higher scores were obtained by the animals in the experimental cholestasis model.

KEY WORDS

MMP-2, MMP-9, extrahepatic cholestasis, extracellular matrix metalloproteinases

WSTĘP

Cholestaza (*cholestasis*; zastój żółci) określana jest w medycynie jako zaburzenie wynikające z utrudnionego przepływu żółci lub zahamowania jej wydzielania; uczestniczą w niej hepatocyty i cholangiocyty. Patologia ta charakteryzuje się podwyższonym poziomem kwasu żółciowego w wątrobie i w osoczu, prowadząc do uszkodzenia hepatocytów oraz dróg żółciowych. Występuje w różnych okolicznościach klinicznych, prowadząc do ciężkich zaburzeń czynności wątroby. Drogi żółciowe stanowią integralną, anatomiczną i czynnościową część wątroby [1,2]. Do typowych objawów cholestatycznej choroby wątroby należą: przewlekłe zmęczenie, świąd skóry, zaburzenia syntezy enzymów wątrobowych, ból stawów, zespół suchości błon śluzowych, a także niedobory witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, zwłóknienie, marskość czy nowotwory dróg żółciowych bądź wątroby [1,3]. Konsekwencją cholestazy są zaburzenia w procesach krążenia jelitowo-wątrobowego kwasów żółciowych cholanowych i wchłaniania jelitowego, co może doprowadzić do wtórnego uszkodzenia wątroby [1]. Ze względu na miejsce występowania zaburzenia cholestazę dzieli

się na zewnątrzwątrobową oraz wewnątrzwątrobową [4]. W praktyce klinicznej z cholestazą zewnątrzwątrobową spotykamy się wówczas, gdy dochodzi do mechanicznego zablokowania przepływu żółci, np. wskutek niedrożności dróg żółciowych bądź patologicznego wydzielania żółci i jej uwalniania do dwunastnicy przez wątrobę. Najczęściej występuje u pacjentów z nowotworami pola trzustkowo-dwunastniczego (głowy trzustki, brodawki Vatera i dystalnego odcinka dróg żółciowych), kamicą przewodową i jatrogennymi uszkodzeniami dróg żółciowych. Do rzadszych przyczyn cholestazy zewnątrzwątrobowej zalicza się przewlekłe zapalenie trzustki, zespół Mirizziego i wady rozwojowe dróg żółciowych. Z kolei do cholestazy wewnątrzwątrobowej dochodzi w sytuacji, gdy żółć, nie mogąc wydostać się do przewodu pokarmowego, zaczyna się gromadzić w wątrobie lub przewodach żółciowych. Z czasem powoduje to wzrost ciśnienia w drogach żółciowych, co w konsekwencji może wpłynąć nawet na uszkodzenie hepatocytów. Następnie wzrasta stężenie metabolitów i żółci, co prowadzi do ich odkładania się w skórce, powodując świąd. Dodatkowo rozwija się żółtaczka. W wyniku niedoboru żółci w przewodzie pokarmowym dochodzi do nieprawidłowości w trawieniu tłuszczów oraz wchłanianiu witamin



rozpuszczalnych w tłuszczach (A, D, E i K). Wśród przyczyn cholestazy wewnątrzwątrobowej wyróżnia się: zwężenie wewnątrzwątrobowych dróg żółciowych, choroby zakaźne, niedobór alfa-1-antytrypsyny (choroba dziedziczna), stan po zabiegach operacyjnych, nowotwory, przyjmowanie niektórych leków, ciężę (cholestaza ciężarnych) [1,5].

Większość chorych z żółtaczką mechaniczną na tle pozostałych schorzeń wymaga leczenia operacyjnego [6,7]. Liczne wyniki badań wykazujące szereg zmian patologicznych i upośledzenie funkcji wątroby oraz innych narządów w przypadku cholestazy zewnątrzwątrobowej stały się przesłanką do stosowania u chorych z żółtaczką mechaniczną przedoperacyjnych zabiegów drenażowych [8]. Należy do nich endoskopowe protezowanie dróg żółciowych, przezskórny drenaż przezwątrobowy (*percutaneous transhepatic drainage* – PTD) czy drenaż sposobem Kehra. Od kilku lat dostępna jest nowa technika drenażu dróg żółciowych – drenaż w asyście endosonografii (*endoscopic ultrasound-guided biliary drainage* – EUS-BD), który może być korzystną alternatywą dla drenażu przezskórnego [9]. Badania kliniczne wykazały jednak, że mimo normalizacji wyników badań laboratoryjnych u pacjentów z guzami głowy trzustki odsetek powikłań pooperacyjnych po pankreatoduodenektomii poprzedzonej zabiegiem drenażowym nie jest mniejszy niż u pacjentów operowanych z żółtaczką mechaniczną bez drenażu [10,11,12,13,14]. Zakładając, iż przedoperacyjny drenaż dróg żółciowych nie poprawia wyników operacji, pojawia się pytanie, kiedy chorego należy operować – tak szybko, jak to możliwe, czy po upływie pewnego czasu. W literaturze brakuje prac odpowiadających na pytanie, jaki jest wpływ czasu trwania cholestazy na wyniki leczenia operacyjnego. Poznanie zmian aktywności metaloproteinaz w cholestazie zewnątrzwątrobowej może się przyczynić do lepszego zrozumienia jej patofizjologii. Do oznaczeń wybrano metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej 2 oraz 9 (*matrix metalloproteinase 2* – MMP-2, *matrix metalloproteinase 9* – MMP-9), ponieważ ich aktywacja występuje jako odpowiedź na uszkodzenie wątroby. Aktywność metaloproteinaz regulowana jest na trzech poziomach: transkrypcji genów, potranslacyjnej aktywacji zymogenów oraz interakcji wydzielanych MMP ze specyficznymi inhibitorami TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*; tkankowe inhibitory metaloproteinaz). Wybrane dwie żelatynazy stanowią główny składnik przestrzeni Dissego, opisywanej jako wolna przestrzeń pomiędzy mikrokosmkami hepatocytów a śródbłonkiem sinusoidy. Są szczególnie zaangażowane w degradację kolagenu IV i fibronektyny, dlatego też ich zwiększona aktywność może prowadzić do rozwoju przewlekłych, w tym cholestatycznych chorób wątroby.

Analizując przegląd literatury, autorzy podjęli próbę oceny aktywności MMP-2 i MMP-9, ponieważ w prze-

ciwieniu do pozostałych metaloproteinaz jako jedyne spełniają kryteria i stanowią dobry biomarker do oceny stopnia zaawansowania cholestazy.

Model zwierzęcy wiarygodnie odwzorowuje stan fizjologiczny lub patologiczny zachodzący w innym organizmie, umożliwia też stosunkowo łatwe zbadanie procesów biologicznych, takich jak rozwój czy przebieg chorób. Najczęściej stosowanym modelem zwierzęcym w badaniach naukowych są gryzonie, zwłaszcza szczury (*Rattus norvegicus*) i myszy (*Mus musculus*). W doświadczeniu wykorzystano szczury płci męskiej. Samce szczurów charakteryzują się bardziej stabilnym środowiskiem hormonalnym i mniejszymi wahaniami masy ciała.

Wykorzystano szczury zwierzęcy model szczepu Sprague-Dawley, łatwy w prowadzeniu hodowli i o łagodnym usposobieniu. Zastosowanie w badaniach modeli zwierzęcych pozwala symulować warunki cholestazy, a uzyskane wyniki odnieść do organizmu ludzkiego. Model zwierzęcy umożliwia wielokrotne powtarzanie badań i opracowanie metod najmniej inwazyjnych. Po zabiegu zwierzęta wybudzają się i żyją na tyle długo, aby można było ocenić efekty cholestazy i porównać aktywność wybranych metaloproteinaz.

Metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej są grupą enzymów proteolitycznych zdolnych do trawienia składników macierzy pozakomórkowej (*extracellular matrix* – ECM) [15]. Główną rolą metaloproteinaz jest degradacja białek ECM, takich jak kolagen, laminina, proteoglikany i fibronektyny. Działanie to ułatwia migrację komórek, powoduje też uwolnienie czynników wzrostu, oddziałujących na komórki [16]. Dodatkowo metaloproteinazy w warunkach fizjologicznych kontrolują embriogenezę, regulują procesy rozwojowe, począwszy od implantacji zarodka w jamie macicy, poprzez rozwój płodu, poród i dalszy rozwój osobniczy. Decydują o prawidłowej migracji komórek, stymulują wzrost komórek nerwowych, biorą udział w budowie tkanki zrębowej wszystkich narządów oraz w angiogenezie. Uczestniczą w procesie tworzenia receptorów komórkowych, a także w wielu procesach immunologicznych [16]. Metaloproteinazy biorą udział w reakcji zapalnej poprzez degradację składników błony podstawnej naczyń, co umożliwia komórkom odpowiedzi zapalnej przedostanie się do uszkodzonych tkanek. Warunkują prawidłowe gojenie się ran i tworzenie blizn poprzez właściwą odnowę tkanki łącznej. Uczestniczą także w regeneracji nerwów obwodowych [17]. Metaloproteinazy 2 i 9 są żelatynazami należącymi do czwartej klasy MMP. Pierwsza z nich, MMP-2 (żelatynaza A), jest białkiem o masie cząsteczkowej 72 kDa, obecnym w większości komórek organizmu, głównie zaś w układzie nerwowym; jej substratami są liczne białka ECM i białka mieliny. Z kolei MMP-9 (żelatynaza B), o masie cząsteczkowej 92 kDa, jest charakterystyczna dla leukocytów, miocytów, śródbłonka na-



czyn, tkanki nerwowej oraz licznych guzów; do jej substratów zalicza się liczne białka ECM (szczególnie kolageny) oraz białka mieliny [16,18].

Zaburzenia przemian ECM leżą u podstaw wielu schorzeń degeneracyjnych, zapalnych oraz nowotworowych. Aktywność metaloproteinaz zauważono także w obrębie ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Liczne badania dowodzą, że enzymy te uczestniczą w procesach zapalnych, uszkadzając barierę krew–mózg, a także warunkują zwiększenie napływu leukocytów, uwalnianie cytokin czy czynników wzrostowych [16]. Zwiększoną ekspresję MMP obserwuje się w różnych stanach patologicznych, m.in. w chorobach neurodegeneracyjnych: chorobie Alzheimera, chorobie Parkinsona, stwardnieniu zanikowym bocznym, chorobie Huntingtona, stwardnieniu rozsianym, a także w stanach neurozapalnych, takich jak urazowe uszkodzenie mózgu, zapalenie opon mózgowych i udar. Rozwijające się neurozapalenie stymuluje aktywność MMP w barierach OUN, co przyczynia się do wzrostu przepuszczalności bariery.

Metaloproteinazy mogą być także wykorzystywane w monitorowaniu różnych stanów zapalnych. Cechują się podwyższoną aktywnością związaną ze stanami patologicznymi, m.in. w rozwoju chorób reumatycznych, przewlekłych stanach zapalnych, formowaniu guzów czy chorobach układu krążenia. Żelatynazy A i B są podstawowymi metaloproteinazami opisywanymi w remodelingu serca. Mogą więc pełnić istotną funkcję, przyjmując rolę markera w badaniach terapeutycznych, ponieważ MMP-2 jest proponowana jako potencjalny biomarker we wczesnych zmianach chorobotwórczych w obrębie serca. Ponadto może być wykorzystywana jako biomarker późnego włóknienia i ciężkiej przebudowy serca u pacjentów kardiologicznych [19].

W wyniku uszkodzenia mięśnia szkieletowego spowodowanego degradacją ECM dochodzi do uwolnienia z niej różnych czynników wzrostu, które modyfikują tym samym swój wpływ na mioblasty i włókna mięśniowe. Enzymami zaangażowanymi w przekształcanie struktury macierzy poprzez degradację jej składników są MMP [18]. Jak wynika z przeglądu literatury, podstawową funkcją MMP-9 w uszkodzonym mięśniu na etapie miolizy jest degradacja białek ECM oraz ułatwianie proliferacji bądź migracji mioblastów. Zauważono również, że poziom syntezy MMP-9 w uszkodzonej tkance mięśniowej jest związany z rozwojem stanu zapalnego oraz martwicą włóknien. Z kolei synteza MMP-2 wiąże się z przekształceniem środowiska komórkowego, towarzyszącym powstawaniu nowych włóknien w późniejszych etapach regeneracji [20,21,22].

Wyróżnia się tkankowe inhibitory metaloproteinaz (TIMPs) zdolne do ich inaktywacji. Obecnie znane są cztery izoformy TIMPs (TIMP-1, -2, -3, -4), z których każda jest zdolna do blokowania większości metaloproteinaz. Są to cząsteczki o masie 21–28 kDa, stabilizowane sześcioma wiązaniami disiarczkowymi [23].

Nieswoistym inhibitorem wszystkich metaloproteinaz jest produkowana przez wątrobę α 2-makroglobulina [16,23]. Zaburzenie stosunku MMPs do TIMPs w ścianach naczyń ma znaczenie w procesie ich niszczenia w przebiegu miażdżycy oraz w patomechanizmie tętniaków. Metaloproteinazy odgrywają istotną rolę w patomechanizmie chorób autoimmunologicznych – układowego toczenia trzewnego, reumatoidalnego zapalenia stawów i in. Podwyższoną aktywność MMPs wykazano również w zmienionych zapalnie odcinkach jelita w chorobie Leśniowskiego i Crohna. Metaloproteinazy biorą istotny udział w rozroście nowotworów. Wydzielane są przez komórki nowotworowe, leukocyty oraz komórki podporowe. Wykazano dodatnią korelację między aktywnością MMPs w guzie nowotworowym a jego skłonnością do naciekania i przerzutów. Zależność taką stwierdzono w przypadku glejaków złośliwych, raka piersi, nerki, jelita grubego, prostaty i pęcherza moczowego. Udział MMPs w szerzeniu się komórek nowotworowych polega na uszkadzaniu ścian naczyń i uwalnianiu czynników wzrostowych. Zaburzenia aktywności MMPs i TIMPs wykazano w marskości wątroby zarówno alkoholowej, jak i pozapalnej, a także w hemochromatozie. Nadmierne włóknienie wątroby w przebiegu marskości spowodowane jest prawdopodobnie niedostateczną degradacją kolagenu, wynikającą ze spadku aktywności MMPs i wzrostu aktywności TIMPs [15,24,25].

Badanie metaloproteinaz w płynach ustrojowych i wyciągach tkankowych polega na oznaczeniu ich aktywności i stężenia. Stężenie określa się za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Aktywność natomiast ocenia się metodą zymograficzną, która obejmuje zymograficzny rozdział białek z wizualną identyfikacją enzymatycznej aktywności wybranego białka [26]. Zymografia jest metodą prostą, czułą i półilościową. Dla MMP-2 próg wykrywalności wynosi około 10 pg [27,28].

Celem niniejszej pracy były ocena aktywności MMP-2 i MMP-9 w wątrobie szczura w doświadczalnym modelu cholestazy z uwzględnieniem czasu jej trwania oraz analiza histopatologiczna wybranych, charakterystycznych cech cholestazy z zastosowaniem technik mikroskopowych.

MATERIAŁ I METODY

Opieka nad zwierzętami i postępowanie z materiałem były zgodne z zasadami 3R (*replacement, reduction, and refinement*). Wszystkie doświadczenia przeprowadzone były zgodnie z obowiązującą Ustawą z dnia 21 stycznia 2005 r. o doświadczeniach na zwierzętach, po wcześniejszym uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Katowicach. Materiał badawczy stanowiło 36 szczurów samców szczepu Sprague-Dawley o masie ciała 350–



–420 g. Wszystkie zwierzęta przez cały czas eksperymentu przebywały w klatkach, w temp. 20°C, wilgotności względnej 59–69% oraz cyklu oświetlenia 12/12. Zwierzęta z grup badanych przed zabiegiem umieszczane były po 5 sztuk w jednej klatce, po zabiegu każdy osobnik przebywał osobno. Zwierzęta karmiono paszą standardową do dnia zabiegu włącznie. Po zabiegu przez 24 godz. otrzymywały jedynie wodę, następnie dalej były karmione paszą standardową. Zwierzęta podzielono na 3 grupy badane oraz 3 grupy kontrolne, po 6 zwierząt w każdej.

Zabiegi operacyjne przeprowadzono w znieczuleniu ogólnym ksylazyną i ketaminą podawanymi domięśniowo w dawkach: ksylazyna 10 mg/kg m.c., ketamina 30 mg/kg m.c. U zwierząt z grup badanych wywołano cholestazę zewnątrzwątrobową poprzez podwiązanie i przecięcie przewodu żółciowego wspólnego. Zabieg wykonywano z cięcia pośrodkowego po uprzednim ogoleniu i odkażeniu pola operacyjnego. Przewód żółciowy wspólny podwiązywano dwiema podwiązkami, następnie przecinano go pomiędzy nimi dla zapewnienia całkowitego przerwania ciągłości. U zwierząt z grup kontrolnych wykonano laparotomię i manipulację na przewodzie żółciowym wspólnym, co polegało na odpreparowaniu przewodu od pozostałych struktur więzadła wątrobowo-dwunastniczego, podobnie jak przed założeniem podwiązek.

Zwierzęta z grup badanych i kontrolnych reoperowano po upływie 3 (I grupa), 7 (II grupa) i 14 dni (III grupa). Zabiegi również wykonywano w znieczuleniu ogólnym ksylazyną i ketaminą, podawanymi domięśniowo w takich samych dawkach jak uprzednio. Po odkażeniu pola operacyjnego jamę brzuszną otwierano z cięcia pośrodkowego przez bliźnię. Zwierzęta poddawano eutanazji przez przedawkowanie pentobarbitalu sodu (200 mg/kg m.c. i.p.).

Pobraną tkankę ważono. Jednorazowo waga tkanki wynosiła około 0,8 g. Do pobranej tkanki dodawano roztwór R1 o składzie 0,01 M CaCl₂, 0,25-proc. Triton X-100. Całość homogenizowano homogenizatorem ultradźwiękowym (Ultrasonic Processor) przez 1 min w temp. 4°C. Uzyskany homogenat wirowano przez 30 min przy 6000 obr./min. Po odwirowaniu otrzymano supernatant T, gdzie znajdowała się frakcja rozpuszczalna w Tritonie, oraz osad nr 1. Osad umieszczano w buforze do ekstrakcji na ciepło o składzie 0,05 M TRIS, pH 7,4, 0,1 M CaCl₂ i worteksowano. Proces ten zachodził przez 15 min w temp. 60°C. Tak zawieszony osad wirowano przez 30 min przy 10 000 obr./min. W ten sposób otrzymano supernatant HE i osad nr 2. Następnie z supernatantu wytrącano białko. Do tego celu użyto 96-proc. alkoholu etylowego schłodzonego do temp. –70°C. Po wytrąceniu próbkę wirowano przez 5 min. w chłodni przy 15 300 xg. Po usunięciu etanolu otrzymywano osad nr 3. Elektroforezę przeprowadzano w żelu poliakrylamidowym za-

wierającym żelatynę w stężeniu 2 mg/ml żelu. Rozdziały elektroforetyczne przygotowywano w pionowych żelach poliakrylamidowych. Stosowano 12,5-proc. żel rozdzielający (12,1875-proc. akrylamid; 0,3125-proc. N,N`Metylenobisakrylamid; 0,225 M TRIS, pH 8,8; 0,1-proc. sodowy siarczan dodecyłu (SDS); 0,04-proc. nadsiarczan amonu (APS); 0,075-proc. N,N,N`,N`metyleno-etyleno-diamine (TEMED)) oraz 5-proc. żel zagęszczający (4,875-proc. akrylamid; 0,125-proc. N,N`Metylenobisakrylamid; 0,0125 M TRIS, pH 6,8; 0,1-proc. SDS; 0,1-proc. APS; 0,2-proc. TEMED); wszystkie odczynniki firmy Sigma-Aldrich. Komorę o wymiarach 140 × 100 × 1,2 mm wypełniano żelem rozdzielającym. Żel nawarstwiano 1 ml mieszaniny alkoholu butylowego i 0,2-proc. roztworem SDS w stosunku 1 : 1 i pozostawiano na 120 min do polimeryzacji. Następnie наносono żel zagęszczający, który polimeryzował w czasie 15–20 min. Komorę z żelami umieszczano w zestawie do elektroforezy, który wypełniano buforem przewodzącym (3 g Tris; 14,4 g glicyny; 0,1 g SDS na 1 l buforu). Przed nanoszeniem próbek wykonywano tzw. *pre-run*, poddający żel działaniu prądu stałego o natężeniu 10 mA przez 190 min. Próbkę białka mieszano z buforem do nanoszenia (0,02 M TRIS, pH 8,8; 0,002 M EDTA; 5-proc. SDS; 10-proc. 2-merkapto-etanol; 0,2-proc. błękit bromofenolowy) w stosunku 2 : 1. Następnie наносono do kieszonki w żelu zagęszczającym wyizolowane frakcje w objętości nieprzekraczającej 40 µl. Elektroforezę prowadzono prądem stałym o natężeniu 5 mA do momentu wejścia błękitu bromofenolowego do żelu rozdzielającego, następnie zwiększano natężenie prądu do 10 mA. Elektroforezę kończono, gdy błękit bromofenolowy znajdował się w odległości około 15 mm od końca żelu. Każdorazowo, obok próbek badanych, наносono na żel mieszaninę białek wzorcowych MMP-2 i MMP-9. Po zakończeniu elektroforezy żełe płukano 2-krotnie po 15 min w 2,5-proc. Tritonie. Następnie umieszczano w buforze do inkubacji w 37°C na 48 godz. Żele barwiono przez 1 godz. w 0,1-proc. Coomassie Brilliant Blue w 40-proc. propan-2-olu.

W celu uwidocznienia wytrawionych z udziałem żelatynaz prążków żełe odbarwiono w mieszaninie metanolu, lodowatego kwasu octowego i wodzie destylowanej. Metaloproteinazy z grupy żelatynaz trawią żelatynę znajdującą się w żelu poliakrylamidowym, pozostawiając biały prążek. Odbarwianie prowadzono do momentu pojawienia się maksymalnego kontrastu między białymi prążkami a niebieskim tłem.

Dokumentację prowadzono każdorazowo po zakończeniu elektroforezy. W tym celu żełe suszono i fotografowano. Analizę rozdziałów elektroforetycznych przeprowadzono za pomocą opracowanego w tym celu programu obliczeniowego do oceny masy molowej białek po rozdzielaniu elektroforetycznych w żelach poliakrylamidowych i agarozowych, wykorzystując oprogra-



mowanie NI Vision for LabWindows/CVI ver. 7.1. Masę cząsteczkową białek obliczono na podstawie wzorców mas cząsteczkowych.

Wycinki przeznaczone do oznaczania aktywności i stężeń metaloproteinaz umieszczono w probówkach Eppendorf w temp. -70°C . Do badania histopatologicznego pobierano wycinki o objętości około 1 cm^3 z płata pośrodkowego wątroby i zalewano formaliną. Ciała zwierząt umieszczano w przeznaczonych do tego celu pojemnikach, przekazywanych następnie do utylizacji przez spalenie.

Dla określenia adekwatnego testu statystycznego dla prób przeprowadzono test normalności pozwalający na sprawdzenie hipotezy, że populacja ma określony typ rozkładu. W przypadkach gdy wyniki testów wskazywały na odchylenia od rozkładu normalnego, stosowano test U Manna i Whitneya oraz nieparametryczną alternatywę analizy wariancji w postaci testu Kruskala i Wallisa. Testy nieparametryczne wykorzystywane są do weryfikacji nieparametrycznych hipotez. Ocenia się różnice między próbami, co sprawdza hipotezę zerową. Jeśli różnice są duże – wymagają odrzucenia hipotezy zerowej. Dla prób niepowiązanych stosowano test U Manna i Whitneya, z kolei dla powiązanych test Wilcoxon, który bada istotność różnicy sumy rang obserwacji w dwóch próbach. Za pomocą testu Kruskala i Wallisa badano, czy pomiędzy kilkoma grupami istnieją różnice statystycznie istotne. Test nie wymaga założeń co do rozkładu normalnego i homogeniczności wariancji. W przypadku zmiennych powiązanych zastosowano test Friedmana z analizą post-hoc Dunn z korektą/poprawką Bonferroniego.

WYNIKI

Preparaty do badania histopatologicznego zostały przygotowane w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii i Diagnostyki Molekularnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, a ocenione w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wro-

clawiu. W ocenie mikroskopowej preparatów histopatologicznych zastosowano własną półilościową 4-stopniową skalę punktową, opracowaną na potrzeby niniejszego badania. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono skali spełniającej kryteria, które umożliwiłyby wiarygodne odzwierciedlenie wyników. Stworzona przez autorów skala uwzględnia charakterystyczne dla wątroby szczura cechy cholestazy, oznaczone jako: A – ogniska martwicy z rozproszonym naciekiem limfocytarnym, B – naciek limfocytarny niezależny od martwicy, C – proliferacja kanalików żółciowych z poszerzeniem światła, D – rozrost tkanki łącznej włóknistej i siateczki, E – zastój żółci w hepatocytach (tab. I).

Cechy A–C i E opisano za pomocą wspomnianej 4-stopniowej skali, oceniającej stopień rozwoju/zaawansowania danej cechy: 0 – brak zmian, 1 – zmiany małego stopnia, lekkie (*light*), 2 – zmiany umiarkowanego stopnia, średnie (*moderate*), 3 – zmiany dużego stopnia (*significant*). Cechę D opisano jako: 0 – brak włóknienia, 1 – włóknienie wrotne, 2 – włóknienie wrotne i okołowrotne oraz z wypustkami, 3 – włóknienie przesłowe i przegrodowe.

Grupy badane i kontrolne zostały opisane w następujący sposób: I C – grupa z cholestazą po upływie 3 dni, I K – grupa kontrolna po upływie 3 dni, II C – grupa z cholestazą po upływie 7 dni, II K – grupa kontrolna po upływie 7 dni, III C – grupa z cholestazą po upływie 14 dni, III K – grupa kontrolna po upływie 14 dni.

Wszystkie dane poddano analizie statystycznej testem Kruskala i Wallisa dla wartości nieparametrycznych. W tabelach II–VII przedstawiono wyniki tej analizy z zaznaczeniem znamienności statystycznej dla wybranych grup.

Komputerowa analiza densytometryczna wyników zy-mografii wykazała aktywności MMP-2 i MMP-9. Znamienne statystycznie różnice oznaczono w przypadku MMP-2, stwierdzając większą jej aktywność w grupach I C, III C (tab. IV i V) w porównaniu z grupami kontrolnymi, przy czym tendencja ta nasilała się wraz z wpływem czasu cholestazy. Istotnie znamienne różnice zauważono również pomiędzy grupami I C, II C (tab. II), II C, III C (tab. III) oraz I C, III C (tab. VII).



Tabela I. Wyniki badania histopatologicznego badanych grup z uwzględnieniem stopnia zaawansowania każdej cechy (A–E)
 Tabela I. Results of histopathological examination of examined groups, taking into account severity of each feature (A–E)

Grupa	Numer preparatu	Stopień zaawansowania cechy																								
		A				B				C				D				E								
		0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3					
I C	1	X				X				X				X				X				X				
	2	X				X				X				X				X				X				
	3		X			X				X				X				X				X				
	4	X				X				X				X				X				X				
	5			X		X				X				X				X				X				
	6		X			X				X				X				X				X				
I K	1	X				X				X				X				X				X				
	2		X			X				X				X				X				X				
	3			X		X				X				X				X				X				
	4	X				X				X				X				X				X				
	5	X				X				X				X				X				X				
	6	X				X				X				X			X			X		X				
II C	1			X		X				X				X				X				X				
	2		X				X			X				X				X				X				
	3		X				X			X				X				X				X				
	4			X			X			X				X				X				X				
	5		X			X				X				X			X			X		X				
	6			X			X			X			X			X			X			X				
II K	1	X				X				X				X				X				X				
	2		X			X				X				X			X					X				
	3	X				X				X				X				X			X					
	4	X				X				X				X				X				X				
	5		X			X				X				X				X				X				
	6	X				X				X				X				X				X				
III C	1		X				X				X			X				X				X				
	2	X					X		X			X		X				X				X				
	3		X				X		X				X					X				X		X		
	4		X				X		X				X				X					X		X		
	5			X			X		X				X					X			X		X			
	6		X				X			X			X					X			X		X			
III K	1	X				X				X				X				X				X				
	2	X				X				X				X				X				X				
	3		X			X				X				X				X				X				
	4	X				X				X				X				X				X				
	5	X				X				X				X				X				X				
	6	X				X				X				X				X				X				

Tabela II. Wartości średnich i odchylenia standardowego przy porównaniu grup I C i II C
Table II. Values of means and standard deviation when comparing groups I C and II C

Grupa	Średnia	Odchylenie standardowe
I C	75,00	9,1
II C	60,01	8,1

$p < 0,05$

Tabela III. Wartości średnich i odchylenia standardowego przy porównaniu grup II C i III C
Table III. Values of means and standard deviation when comparing groups II C and III C

Grupa	Średnia	Odchylenie standardowe
II C	60,01	8,6
III C	96,00	12,4

$p < 0,05$

Tabela IV. Wartości średnich i odchylenia standardowego przy porównaniu grup III C i K
Table IV. Values of means and standard deviation when comparing groups III C and K

Grupa	Średnia	Odchylenie standardowe
III C	96,00	9,1
K	58,06	8,5

$p < 0,05$

Tabela V. Wartości średnich i odchylenia standardowego przy porównaniu grup I C i K
Table V. Values of means and standard deviation when comparing groups I C and K

Grupa	Średnia	Odchylenie standardowe
I C	75,00	9,1
K	58,06	8,5

$p < 0,05$

Tabela VI. Wartości średnich i odchylenia standardowego przy porównaniu grup II C i K
Table VI. Values of means and standard deviation when comparing groups II C and K

Grupa	Średnia	Odchylenie standardowe
II C	60,01	8,1
K	58,06	8,5

$p = 0,7$

Tabela VII. Wartości średnich i odchylenia standardowego przy porównaniu grup I C i III C
Table VII. Values of means and standard deviation when comparing groups I C and III C

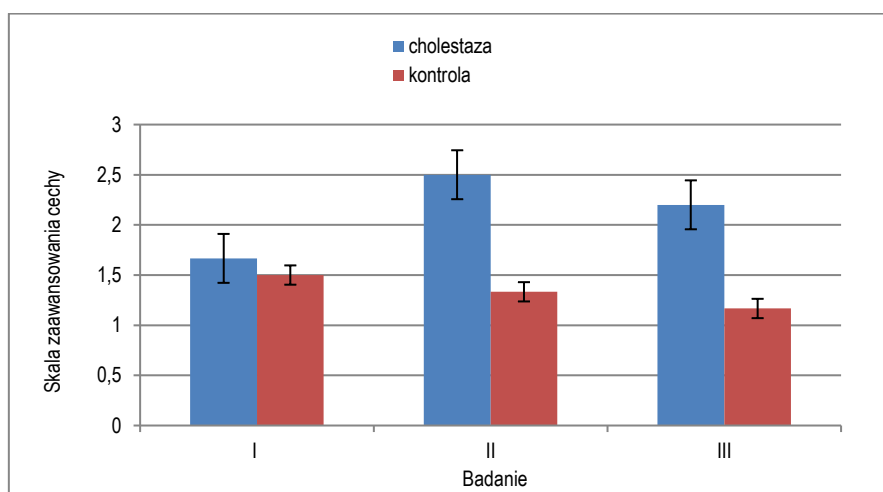
Grupa	Średnia	Odchylenie standardowe
I C	75,00	9,1
III C	96,00	12,4

$p < 0,05$

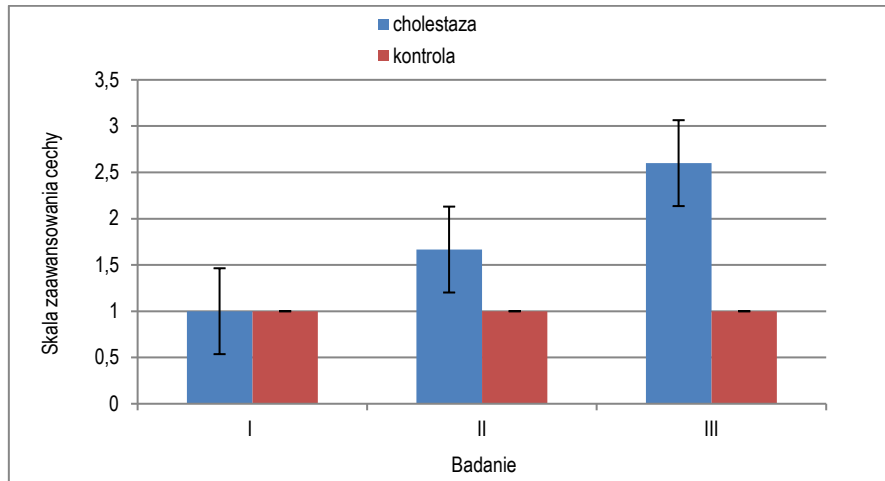
Wyniki analizy histopatologicznej

Ryciny 1–5 ilustrują wyniki ocen preparatów histopatologicznych dla wybranych cech cholestazy (oznaczonych jako A–E) w zależności od czasu jej trwania, z zaznaczeniem odchylenia standardowego.

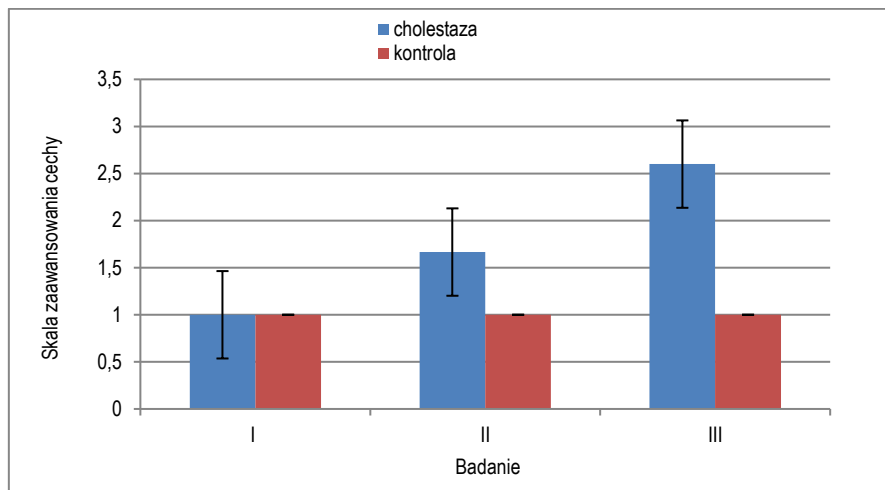
Analizując uzyskane wyniki dla cech A–D, znamienne wyższe oceny w skali uzyskały szczury z grup badanych. Dla cechy A wartość p wynosi 0,0112, natomiast dla cechy B 0,0005. Uzyskane wyniki w grupie szczurów z cholestazą cechują się istotnością statystyczną. Znamienne wyższe oceny w porównaniu z grupami kontrolnymi uzyskały także cechy cholestazy: C – $p = 0,004$ oraz D – $p = 0,0078$. Cecha E wykazała brak istotnych różnic statystycznych.



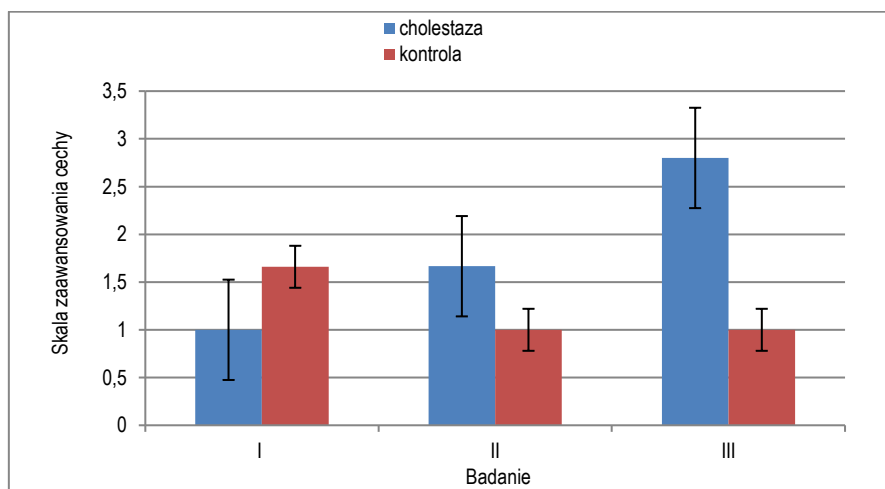
Ryc. 1. Wyniki oceny ognisk martwicy z rozproszonym naciekiem limfocytarnym w kolejnych badaniach (cecha A).
Fig. 1. Results of assessment of necrotic foci with diffuse lymphocytic infiltration in subsequent examinations (feature A).



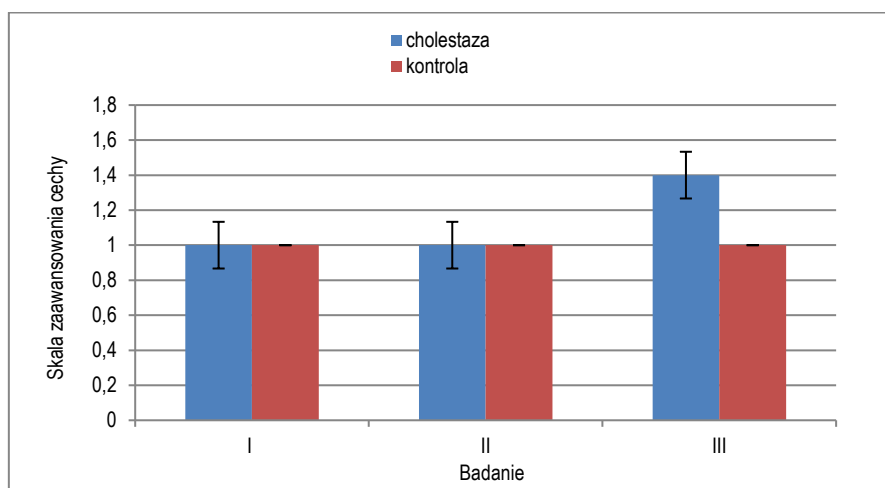
Ryc. 2. Wyniki oceny nacieków limfocytarnych niezależnych od martwicy w kolejnych badaniach (cecha B).
Fig. 2. Results of assessment of lymphocytic infiltrations independent of necrosis in subsequent examinations (feature B).



Ryc. 3. Wyniki oceny proliferacji kanalików żółciowych z poszerzeniem światła w kolejnych badaniach (cecha C).
Fig. 3. Results of assessment of bile duct proliferation with dilated lumen in subsequent examinations (feature C).



Ryc. 4. Wyniki oceny rozrostu tkanki łącznej włóknistej i siateczki w kolejnych badaniach (cecha D).
Fig. 4. Results of assessment of hyperplasia of fibrous connective tissue and reticulum in subsequent examinations (feature D).



Ryc. 5. Wyniki oceny zastojów żółci w hepatocytach w kolejnych badaniach (cecha E).

Fig. 5. Results of assessment of bile stasis in hepatocytes in subsequent examinations (feature E).

DYSKUSJA

Doświadczenia polegające na wywołaniu cholestazy zewnątrzwątrobowej u zwierząt przez podwiązanie przewodu żółciowego wspólnego w celu badania zaburzeń różnych funkcji wątroby i innych narządów oraz oceny wpływu wybranych substancji na rozwój cholestazy były już wykonywane i opisywane w literaturze. Modele zwierzęce często wykorzystuje się w badaniach naukowych w celu zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw ostrego i przewlekłego uszkodzenia wątroby. Większość tego typu badań została przeprowadzona na szczurach [29,30,31,32].

Jak wynika z przeglądu literatury, istnieją także prace dotyczące oceny stężenia wybranych metaloproteinaz w osoczu pacjentów z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym [15]. Ocenie poddano również aktywność MMP w chorobach neurodegeneracyjnych OUN [33]. Lucas-Grzelczyk i wsp. [34] wykazali korelację między zwiększoną ekspresją MMP-2 w tkance guza a stanem klinicznym czy występowaniem przerzutów. W literaturze naukowej wciąż jednak niewiele jest doniesień na temat oceny aktywności metaloproteinaz w cholestazie. To temat, który nadal wymaga dokładnego poznania.

Badania Guedesa i wsp. [35] potwierdziły, że w wyniku cholestazy pojawiają się modyfikacje i zmiany w ścianie pęcherzyka żółciowego. Przewody odprowadzające żółć stają się cienkie i sztywne, dochodzi do rozwoju martwicy o charakterze ogniskowym, co przyczynia się do wycieku toksycznych substancji. Wydzielają się hydrofobowe kwasy żółciowe, wywołując uszkodzenia wątroby. W wyniku nagromadzenia soli żółciowych błony hepatocytów zostają uszkodzone, co powoduje wzrost poziomu aminotransferaz w osoczu. Dodatkowo w grupie badanych szczurów, u których wywołano

cholestazę zewnątrzwątrobową poprzez podwiązanie dróg żółciowych, autorzy zaobserwowali także wyższą aktywność MMP-2 w porównaniu z grupą kontrolną. Udowodniono to również w naszym badaniu. We włóknieniu wątroby MMP-2 wykazuje ekspresję w miofibroblastach i może pełnić rolę profibrogenną [36].

Wzrost stężenia MMP-2 może być spowodowany aktywacją komórek gwiaździstych wątroby (*hepatic stellate cells* – HSCs), które w przypadku uszkodzenia wątroby przechodzą z fazy spoczynku do fazy aktywacji. Dlatego też patofizjologia włóknienia wątroby pozostaje w ścisłym związku z procesem aktywacji HSCs [35,37]. Proces ten składa się z dwóch etapów: inicjacji, określanej także fazą przedzapalną, oraz rozwinięcia i podtrzymywania aktywacji, kończącego się fazą rezolucji w okresie, gdy choroba wątroby wygasa [38].

W zdrowej wątrobie homeostaza ECM jest precyzyjnie regulowana stałą przemianą kierowaną przez grupę enzymów MMP oraz ich specyficznych inhibitorów – TIMPs. W razie przewlekłego uszkodzenia tkanki wątrobowej HSCs ulegają aktywacji i różnicują się do fenotypu fibroblastów. W aktywowanych HSCs ekspresja TIMP-1 jest szczególnie podwyższona, co prowadzi do zahamowania aktywności MMP, a następnie nagromadzenia białek macierzy w przestrzeni pozakomórkowej. W zdrowej tkance wątroby istnieje równowaga między TIMP a MMP, które kontrolują usuwanie i składanie ECM. W trakcie fibrogenyzy równowaga ta zostaje zaburzona, co powoduje wzrost ekspresji TIMPs i MMPs z nadmiarem TIMPs i tym samym zahamowaniem degradacji macierzy. Zatem aktywowane HSCs mogą również wpływać na regresję włóknienia poprzez uwalnianie proteaz degradujących ECM [39]. Proces włóknienia wątroby jest związany z zaburzeniem dynamicznej równowagi między syntezą a degradacją prawidłowych białek ECM. Rozwija się w wyniku przewlekłego uszkodzenia wątroby, które może



być wywołane czynnikami toksycznymi, zaburzeniami metabolicznymi lub procesami autoimmunologicznymi [40]. Dodatkowo obserwuje się także typowe cechy histopatologiczne u zwierząt poddanych podwiązaniu dróg żółciowych. W wyniku odkładania się ECM rozwija się przegroda włóknista z obecnością złogów, co indukuje zwłóknienie tkanki [4,35,41]. Obecnie w celu oceny stopnia zwłóknienia wątroby oprócz biopsji wykorzystuje się elastografię – prostą, nieinwazyjną metodę diagnostyczną, stosowaną także u pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi i cholestatycznymi wątroby [42].

W badaniach własnych zaobserwowano m.in. rozrost tkanki łącznej włóknistej i siateczki, istotnie wyższy statystycznie w zwierzęcym modelu cholestazy. Zmiany dotyczyły także innych badanych cech cholestazy, tj. proliferacji kanalików żółciowych, nacieku limfocytarnego niezależnego od martwicy czy rozwoju ogniska martwicy, które w modelu badawczym cechowały się znamiennej wyższą oceną. W praktyce klinicznej cholestatyczne choroby wątroby nadal pozostają głównym problemem dla pediatrów [43,44,45], choć choroby te występują również u kobiet ciężarnych [46,47,48,49,50,51].

Diagnostyka różnicowa cholestazy jest trudna z uwagi na mnogość przyczyn, dlatego niejednokrotnie stanowi wyzwanie diagnostyczno-terapeutyczne. Mimo iż żółtaczka cholestatyczna występuje u niemowląt dosyć rzadko (1 na 2500 żywo urodzonych dzieci), stanowi bardzo ważne zagadnienie w pediatrii z powodu szybko postępujących nieodwracalnych zmian destrukcyjnych w obrębie wątroby i dróg żółciowych. U niemowląt już 1-miesięczny zastój żółci może przyczynić się do żółciowej marskości wątroby. Niezdiagnozowane choroby metaboliczne, mogące być przyczyną cholestazy, prowadzą do niedorozwoju psychoruchowego dzieci; w wielu przypadkach można temu zapobiec, stosując np. odpowiednią dietę eliminacyjną. U pacjentów pediatrycznych w okresie niemowlęcym bardzo trudno różnicować cholestazę wewnątrz- i zewnątrzwątrobową na podstawie nieprawidłowości w badaniach biochemicznych [52].

U dorosłych częstość występowania pierwotnego zapalenia dróg żółciowych (*primary biliary cholangitis* – PBC) wykazuje zróżnicowanie geograficzne, z najwyższą zapadalnością w USA, a najniższą w Australii. W krajach zachodnich zachorowalność na PBC wynosi 0,3–5,8 na 100 000 osób, chorobowość 1,9–40,2 na 100 000 osób, z wyraźną dominacją kobiet w wieku 40–60 lat [1]. Przyczyny prowadzące do rozwoju cholestazy w wieku niemowlęcym obejmują: deficyt cytryny, postępującą rodzinną cholestazę wewnątrzwątrobową typu 4, utratę ekspresji receptora farnesoidowego X, deficyt aktywności kortyzolu bądź rodzinną hipercholanemię [43]. W obowiązującej dotychczas definicji jako przyczynę cholestazy przyjmowano zmniejszoną syntezę i sekrecję żółci do dwunastnicy. Definicja wymaga jednak modyfikacji, ponieważ w patogenezie cholestazy coraz częściej podkreśla się rolę zaburzonego metabolizmu bądź transportu kwasów żółciowych w obrębie hepatocytów [43].

Warto podkreślić, że nie brano pod uwagę symulacji cholestazy u pacjentów pediatrycznych. Jeśli zabieg wykonywano by na szczurach, których waga byłaby odzwierciedleniem wagi noworodka, mogłoby dojść do większej śmiertelności szczurów i problemu z ich wybudzeniem ze względu na niską wagę.

Poznanie aktywności wybranych enzymów oraz wiedza na temat rozwoju zmian histopatologicznych w obrębie badanych tkanek pozwalają na dobór odpowiedniego postępowania terapeutycznego u pacjentów z ciężkimi zaburzeniami czynności wątroby, co może stanowić obiecującą perspektywę leczenia.

WNIOSKI

1. Wraz z upływem czasu cholestazy wzrasta aktywność MMP-2.
2. Rozrost tkanki łącznej włóknistej i siateczki jest istotnie wyższy statystycznie u zwierząt w doświadczalnym modelu cholestazy w porównaniu z grupami kontrolnymi.

Author's contribution

Study design – K. Suszyński, D. Górka

Data collection – K. Suszyński, D. Górka

Data interpretation – K. Suszyński, N. Białoń

Statistical analysis – K. Suszyński, D. Górka, A. Dolińska

Manuscript preparation – N. Białoń, M. Górka

Literature research – M. Górka, A. Dolińska

PIŚMIENNICTWO

1. Hartleb M., Krawczyk M., Wunsch E., Raszeja-Wyszomirska J., Cichoż-Lach H., Żorniak M. i wsp. Choroby cholestatyczne u dorosłych – wytyczne postępowania Sekcji Hepatologicznej Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii (PTG-E). *Gastroenterol. Prakt.* 2018; 2: 5–32.
2. Li M., Cai S.Y., Boyer J.L. Mechanisms of bile acid mediated inflammation in the liver. *Mol. Aspects Med.* 2017; 56: 45–53, doi: 10.1016/j.mam.2017.06.001.
3. Pollock G., Minuk G.Y. Diagnostic considerations for cholestatic liver disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2017; 32(7): 1303–1309, doi: 10.1111/jgh.13738.
4. Shah R., John S. Cholestatic Jaundice. *StatPearls [Internet]*, 2021 Jul 19. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.
5. Romański K. Cholestaza u człowieka i zwierząt: występowanie, przyczyny, mechanizmy. *Życie Wet.* 2010; 85(1): 56–59.
6. Kozicki I. Chirurgia dróg żółciowych. Postępy w chirurgii w 2011 roku. *Med. Prakt. Chir.* 2012; 2: 19–25.
7. Mortelé K.J., Wiesner W., Cantisani V., Silverman S.G., Ros P.R. Usual and unusual causes of extrahepatic cholestasis: assessment with magnetic resonance cholangiography and fast MRI. *Abdom. Imaging* 2004; 29(1): 87–99, doi: 10.1007/s00261-003-0062-6.
8. Padillo J., Puente J., Gómez M., Dios F., Naranjo A., Vallejo J.A. i wsp. Improved cardiac function in patients with obstructive jaundice after internal biliary drainage: hemodynamic and hormonal assessment. *Ann. Surg.* 2001; 234(5): 652–656, doi: 10.1097/0000658-200111000-00010.
9. Krupa Ł., Staroń R., Gutkowski K. Drenaż dróg żółciowych w asyście endosonografii – review. *Białostockie. Gastroenterol. Klin.* 2019; 11(1): 29–32.
10. Chu J., He S., Ke Y., Liu X., Wang P., Zhang W. i wsp. The effect of preoperative biliary drainage with or without pancreatic stenting on complications after pancreatoduodenectomy: a retrospective cohort study. *Biomed Res. Int.* 2021; 2021: 5572395, doi: 10.1155/2021/5572395.
11. Duan F., Cui L., Bai Y., Li X., Yan J., Liu X. Comparison of efficacy and complications of endoscopic and percutaneous biliary drainage in malignant obstructive jaundice: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Imaging* 2017; 17(1): 27, doi: 10.1186/s40644-017-0129-1.
12. Pisters P.W., Hudec W.A., Hess K.R., Lee J.E., Vauthey J.N., Lahoti S. i wsp. Effect of preoperative biliary decompression on pancreaticoduodenectomy-associated morbidity in 300 consecutive patients. *Ann. Surg.* 2001; 234(1): 47–55, doi: 10.1097/0000658-200107000-00008.
13. Srivastava S., Sikora S.S., Kumar A., Saxena R., Kapoor V.K. Outcome following pancreaticoduodenectomy in patients undergoing preoperative biliary drainage. *Dig. Surg.* 2001; 18(5): 381–387, doi: 10.1159/000050178.
14. Sugara M., Peruvaje V., Krishnamurthy S., Kumar K.V.V., Chowdappa R. Effect of preoperative biliary stenting on outcomes of pancreaticoduodenectomy. *Indian J. Surg. Oncol.* 2021; 12(3): 554–560, doi: 10.1007/s13193-021-01387-5.
15. Baszczuk A., Koczyński Z., Thielemann A., Musiałik K., Koczyński J., Bielawska L. i wsp. Ocena stężenia metaloproteiny 2 (MMP-2) i metaloproteiny 9 (MMP-9) w surowicy chorych na pierwotne nadciśnienie tętnicze. *Forum Zab. Metab.* 2015; 6(2): 74–84.
16. Wysocka A., Giziński S., Lechowski R. Metaloproteiny macierzy – ich struktura oraz znaczenie. *Życie Wet.* 2014; 89(3): 223–227.
17. Woszczycka-Korczyńska I., Górka D., Matuszek I., Pietrucha-Dutczak M., Lewin-Kowalik J. Aktywność metaloproteinaz (MMP-2, MMP-9) w odcinkach dystalnych przeciętych nerwów kulszowych dorosłych szczurów. *Wiad. Lek.* 2005; 58: 411–414.
18. Trojanek J. Metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej i ich tkankowe inhibitory. *Post. Bioch.* 2012; 58(3): 353–362.
19. Medeiros N.I., Gomes J.A.S., Fiuza J.A., Sousa G.R., Almeida E.F., Novaes R.O. i wsp. MMP-2 and MMP-9 plasma levels are potential biomarkers for indeterminate and cardiac clinical forms progression in chronic Chagas disease. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 14170, doi: 10.1038/s41598-019-50791-z.
20. Kherif S., Lafuma C., Dehaupas M., Lachkar S., Fournier J.G., Verdière-Sahuqué M. i wsp. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. *Dev. Biol.* 1999; 205(1): 158–170, doi: 10.1006/dbio.1998.9107.
21. Zimowska M., Brzoska E., Swierczyńska M., Stremińska W., Moraczewski J. Distinct patterns of MMP-9 and MMP-2 activity in slow and fast twitch skeletal muscle regeneration in vivo. *Int. J. Dev. Biol.* 2008; 52(2–3): 307–314, doi: 10.1387/ijdb.072331mz.
22. Frisdal E., Teiger E., Lefaucheur J.P., Adnot S., Planus E., Lafuma C., D'Ortho M.P. Increased expression of gelatinases and alteration of basement membrane in rat soleus muscle following femoral artery ligation. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2000; 26(1): 11–21, doi: 10.1046/j.1365-2990.2000.00210.x.
23. Jung P., Zimowska M. Metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej w rozwoju, fizjologii i procesach degeneracyjnych mięśni szkieletowych. *Post. Bioch.* 2016; 62(1): 25–35.
24. Karowicz-Bilińska A., Kowalska-Koprek U., Estemberg D., Sikora-Szuberbert A. Ocena stężeń tkankowych inhibitorów metaloproteinaz TIMP-2 i TIMP-4 w III trymestrze ciąży. *Ginekol. Pol.* 2015; 86: 737–741, doi: 10.17772/gp/59364.
25. Śliwowska I., Koczyński Z. Metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej – charakterystyka biochemiczna i kliniczna wartość oznaczania u chorych na raka piersi. *Współcz. Onkol.* 2005; 9(8): 327–335.
26. Bogusiewicz M., Stryjecka-Zimmer M., Rechberger T. Aktywność metaloproteaz macierzy -2 i -9 (MMP-2 i MMP-9) oraz zawartość ich tkankowych inhibitorów w raku błony śluzowej macicy – doniesienie wstępne. *Ginekol. Pol.* 2007; 78: 366–372.
27. Pietrzak J., Wodziński D., Franiak-Pietryga I., Mirowski M. Charakterystyka elektroforetyczna aktywności metaloproteiny surowicy pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową – badania wstępne. *Folia Med. Lodz.* 2015; 42(1): 49–62.
28. Chen S., Meng F., Chen Z., Tomlinson B.N., Wesley J.M., Sun G.Y. i wsp. Two-dimensional zymography differentiates gelatinase isoforms in stimulated microglial cells and in brain tissues of acute brain injuries. *PLoS One* 2015; 10(4): e0123852, doi: 10.1371/journal.pone.0123852.
29. Xu F., Liu X., Wang C., Dai C. Prostaglandin E1 preconditioning attenuates liver ischemia reperfusion injury in a rat model of extrahepatic cholestasis. *Biomed Res. Int.* 2018; 2018: 3812424, doi: 10.1155/2018/3812424.
30. Lin S.Y., Wang Y.Y., Chen W.Y., Liao S.L., Chou S.T., Yang C.P. i wsp. Hepatoprotective activities of rosmarinic acid against extrahepatic cholestasis in rats. *Food Chem. Toxicol.* 2017; 108(Pt A): 214–223, doi: 10.1016/j.fct.2017.08.005.
31. Bebiashvili I.S., Kakabadze M.S., Gvidiani S.M., Tsomaia K.B., Gusev S.A., Kordzaia D.J. Features of ductular reaction in rats with extrahepatic cholestasis. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2022; 172(6): 770–774, doi: 10.1007/s10517-022-05475-6.
32. Zhang Z., Miao Y., Xu M., Cheng W., Yang C., She X. i wsp. TianJiu therapy for α -naphthyl isothiocyanate-induced intrahepatic cholestasis in rats treated with fresh *Ranunculus sceleratus* L. *J. Ethnopharmacol.* 2020; 248: 112310, doi: 10.1016/j.jep.2019.112310.
33. Tylec A., Skalecki M., Kocot J., Kurzepa J. Aktywność wybranych metaloproteinaz w chorobach neurodegeneracyjnych ośrodkowego układu nerwowego na przykładzie otępienia i schizofrenii. *Psychiatr. Pol.* 2021; 55(6): 1221–1233, doi: 10.12740/PP/126662.
34. Lucas-Grzelczyk W., Szemraj J., Józefowicz-Korczyńska M. Metaloproteiny w raku krtni. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2016; 70: 1190–1197.
35. Guedes P.L., Castañón M.C., Nagaoka M.R., Aguiar J.A. Increase of glycosaminoglycans and metalloproteinases 2 and 9 in liver extracellular matrix on early stages of extrahepatic cholestasis. *Arq. Gastroenterol.* 2014; 51(4): 309–315, doi: 10.1590/S0004-28032014000400008.
36. Préaux A.M., Mallat A., Nhieu J.T., D'Ortho M.P., Hembry R.M., Mavier P. Matrix metalloproteinase-2 activation in human hepatic fibrosis regulation by cell-matrix interactions. *Hepatology* 1999; 30(4): 944–950, doi: 10.1002/hep.510300432.
37. Liu R., Li X., Zhu W., Wang Y., Zhao D., Wang X. i wsp. Cholangiocyte-derived exosomal long noncoding RNA H19 promotes hepatic stellate cell activation and cholestatic liver fibrosis. *Hepatology* 2019; 70(4): 1317–1335, doi: 10.1002/hep.30662.
38. Cichoż-Lach H., Prozorow-Król B., Buk L., Swatek J., Celiński K., Słomka M. i wsp. Diagnostyka zmian ogniskowych wątroby – badania obrazowe czy biopsja? Doświadczenia własne. *Post. Nauk Med.* 2010; 1: 15–20.
39. Roeb E. Matrix metalloproteinases and liver fibrosis (translational aspects). *Matrix Biol.* 2018; 68–69: 463–473, doi: 10.1016/j.matbio.2017.12.012.
40. Yoshino K., Taura K., Iwaisako K., Masano Y., Uemoto Y., Kimura Y. i wsp. Novel mouse model for cholestasis-induced liver fibrosis resolution by cholecystojejunostomy. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2021; 36(9): 2493–2500, doi: 10.1111/jgh.15406.
41. Gabriel A., Radłowski P., Kukla M. Odwracalność włóknienia u chorych na przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu C. Cechy morfologiczne i ich ewolucja. *Hepatologia* 2017; 17: 72–78.
42. Milkiewicz P. Elastografia wątroby w codziennej praktyce klinicznej. *Gastroenterol. Klin.* 2017; 9(1): 1–6.
43. Lipiński P., Jankowska I. Co nowego w cholestazie – część I. Cholestaza z prawidłową aktywnością gamma-glutamylotranspeptydazy. *Pediatr. Pol.* 2017; 92(4): 366–372.



44. Feldman A.G., Sokol R.J. Recent developments in diagnostics and treatment of neonatal cholestasis. *Semin. Pediatr. Surg.* 2020; 29(4): 150945, doi: 10.1016/j.sempedsurg.2020.150945.
45. Feldman A.G., Sokol R.J. Neonatal cholestasis: updates on diagnostics, therapeutics, and prevention. *Neoreviews* 2021; 22(12): e819–e836, doi: 10.1542/neo.22-12-e819.
46. Zhang M., Xu M. Epigallocatechin-3-gallate ameliorates intrahepatic cholestasis of pregnancy by inhibiting matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2017; 31(5): 526–533, doi: 10.1111/fcp.12294.
47. Chen Z., Shen Z., Hu L., Lu M., Feng Y. Identification of matrix metalloproteinase-2 and 9 as biomarker of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Ann. Hepatol.* 2017; 16(2): 291–296, doi: 10.5604/16652681.1231589.
48. Lipiński P., Jankowska I. Postępująca rodzinna cholestaza wewnątrzwątrobową typu 3. *Dev. Period. Med.* 2018; 22(4): 385–389, doi: 10.34763/devperiodmed.20182204.385389.
49. Karowicz-Bilińska A. Cholestaza wewnątrzwątrobową w ciąży. *Gin. Perinat. Prakt.* 2019; 4(1): 16–22.
50. Wang X., Khalil R.A. Matrix metalloproteinases, vascular remodeling, and vascular disease. *Adv. Pharmacol.* 2018; 81: 241–330, doi: 10.1016/bs.apha.2017.08.002.
51. Lee M.H., Shin H.J., Yoon H., Han S.J., Koh H., Lee M.J. Periportal thickening on magnetic resonance imaging for hepatic fibrosis in infantile cholestasis. *World J. Gastroenterol.* 2020; 26(21): 2821–2830, doi: 10.3748/wjg.v26.i21.2821.
52. Hozyasz K., Rowicka G. Cholestazy u dzieci. *Patofizjologia, diagnostyka i leczenie. Med. Rodz.* 1999; 4: 22–27.