

62. Wigle, J.T. An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J.* 21, 1505–1513 (2002).
63. Wirzenius M., Tammela T., Uutela M., He Y., Odorisio T. Distinct vascular endothelial growth factor signals for lymphatic vessel enlargement and sprouting. *J. Exp. Med.* 204, 1431–40, (2007).
64. Witte M.H. et al. Lymphangiogenesis and lymphangiodysplasia: from molecular to clinical lymphology. *Microsc. Tech. Res.* 55, 122-145 (2001).
65. Witzenbichler B., Asahara T., Murohara T., Silver M., Spyridopoulos I. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGFR-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. *Am.J.Pathol.* 153, 381-394, (1998).
66. Yuan L., Pardanaud L., Breant C., Karkkainen M.J. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development* 129, 4797-806, (2002).
67. Zhang X., Groopman J.E., Wang J.F. Extracellular matrix regulates endothelial functions through interaction of VEGFR-3 and integrin $\alpha 5\beta 1$. *J. Cell Physiol.* 202, 205–14, (2005).

ROLUL PROTEINAZELOR LIZOZOMALE ÎN PROCESUL DE REGRESIE A CIROZEI HEPATICE EXPERIMENTALE

Elena Rîvneac, Valentin Gudumac, Valeriu Rudic, Ruslan Pretula, Victor Rîvneac
Laboratorul Morfologie

Summary

The role of the lysosome proteinases in the process of the regression of the experimental hepatic cirrhosis

It was investigated the role of the lysosome cisteine proteinases - cathepsins B, H and L - in cirrhotic rat liver during the cirrhosis regression and the influence of the remedy BioR^{Se} on the activity of these enzymes. It was determined that the hepatic cirrhosis provoked an increase of lysosome proteinases activity, which continued to be elevated during the post cirrhotic regeneration of the liver. It's of great interest that the activity of the enzyme was much higher in the liver tissue of the animals treated with the remedy BioR^{Se}. The considerable increase of the cathepsins activity contributes to enlarge the liver proteolytic ability for a more efficient catabolism of the fibrous tissue in the liver.

Rezumat

S-a studiat rolul proteinazelor cisteinice lizozomale - catepsinelor B, H și L - în ficat în procesul de regresie a cirozei hepatice experimentale și influența remediului BioR^{Se} asupra activității acestor enzime. A fost determinat, că ciroza hepatică provoacă o creștere a activității proteinazelor lizozomale, care continuă a fi elevată și în perioada restabilirii postcirotice a ficatului. Prezintă interes faptul, că activitatea enzimelor s-a dovedit a fi și mai înaltă în țesutul hepatic al animalelor tratate cu remediul BioR^{Se}. Sporirea esențială a activității catepsinelor contribuie la creșterea capacității proteolitice a ficatului întru catabolizarea mai eficientă a țesutului fibros din ficat.

Fibroza - depunerea în exces de țesut conjunctiv fibros - reprezintă consecința majorității afecțiunilor hepatice survenite în urma unor agresiuni cronice exercitate de diverși agenți (virali, toxici, imunologici, metabolici). În prezent posibilitatea reversibilității modificărilor cirotice din ficat este demonstrată experimental și nu trezește îndoieli [10]. Procesul de bază al involuției modificărilor sclerotice cronice ale ficatului este resorbția țesutului fibros și, în special, a colagenului [5,7]. Însă, majoritatea detaliilor mecanismelor acestui proces *in vivo* nu sunt cunoscute.

O serie de exploratori atribuie proteinazelor cisteinice rolul central în procesul de resorbție a țesutului fibros [1,4]. Se consideră, că circa 90% ai proteolizei intralizozomale se

realizează pe baza activității coerente a endopeptidazelor cisteinice - catepsinelor B, H și L [2]. În special, catepsina B este aptă să degradeze componentele principale ale matricei intercelulare: colagenul, inclusiv cel insolubil, și proteoglicanii.

Prezintă interes și aspectul practic al problemei date - elaborarea procedurilor de stimulare a resorbției țesutului fibros în ficat și restabilirii parenchimului. În acest context deosebit de avantajoase par a fi încercările de a stimula activitatea regenerativă a țesutului hepatic cirozat prin metode terapeutice (farmacologice). În ultimii ani un interes sporit trezește utilizarea în aceste scopuri a preparatelor obținute din surse naturale, și în special din microalge.

Scopul prezentului studiu constă în determinarea modificărilor activității proteinazelor cisteinice lizozomale (catepsinelor L, B și H) în țesutul hepatic cirozat, precum și a gradului de angajare a acestora în procesul de regresie a cirozei hepatice experimentale pe fond de medicație cu preparatul din microalge BioR^{Se}.

Metodele de investigație

Ciroza hepatică a fost provocată la animale de laborator (șobolani albi masculi cu masa circa 200 g) prin injecții subcutanante bisăptămânale a soluției de 50 % de tetraclorură de carbon (CCl₄) în ulei de măsline în doză de 0,3 ml la 100 g a masei corpului timp de 13 săptămâni (lotul I). După încetarea administrării noxei hepatotrope unui lot de animale li s-a introdus subcutanant preparatul din microalge BioR^{Se} bisăptămânal în decursul primelor 30 zile a perioadei de regresie a cirozei hepatice experimentale (lotul II). Totodată unui lot de animale (lotul III) preparatul din microalge BioR^{Se} s-a administrat concomitent cu tetraclorura de carbon timp de 13 săptămâni, iar țesutul hepatic a fost colectat îndată după încetarea injecțiilor. Cercetarea țesutului hepatic și a serului sanguin s-a produs în decursul primei luni de regresie a cirozei (la 7, 14, 21, 30 zile de regresie) după sacrificarea animalelor prin decapitare.

Investigațiile biochimice s-au efectuat în omogenat de ficat. A fost determinată activitatea unor tioproteinaze lizozomale - catepsinelor L, B și H.

Procedeele de determinare a activității catepsinei L este bazat pe hidroliza enzimatică a azocazeinei [8,11]. Produsele degradării proteolitice ale azocazeinei sunt peptide cu o colorație galbenă, intensitatea cărora corelează cu activitatea enzimei și poate fi estimată spectrofotometric. Pentru excluderea participării în reacția dată a catepsinei D, care de asemenea este capabilă să hidrolizeze azocazeina, în mediul de reacție se adaugă Pepstatină.

Procedeele de determinare a activității catepsinelor B și H sunt bazate pe proprietatea ambelor enzime de a hidroliza substratul sintetic - N,α-benzoil-D,L-arginină-p-nitroanilidhydrochlorid (BAPNA) (SERVA, Germania) cu formarea p-nitroanilinei de culoare galbenă, a cărei intensitate se determină spectrofotometric [8]. Hidroliza substratului de către catepsina H se petrece la pH 6,8, iar de către catepsina B - la pH 6,0. Spre deosebire de catepsina H, catepsina B este inhibată puternic de Leupeptină (Ikesawa et al., 1971), ceea ce permite determinarea separată a catepsinelor B și H, folosind același substrat.

Rezultatele obținute

Activitatea catepsinelor L, B și H în ficat la dezvoltarea maximă a cirozei s-a dovedit a fi sporită esențial, depășind valorile lotului martor (animale intacte) cu 17% (P<0.05), 150 % (P<0.05) și 628 % (P<0.001) respectiv. Sporirea activității proteinazelor studiate e necesară atât pentru degradarea țesutului conjunctiv, format în exces, cât și a structurilor celulare lezate.

Pe parcursul perioadei de regresie a cirozei activitatea proteinazelor examinate rămîne sporită. Astfel, nivelul funcțional al catepsinei L, înregistrînd valori maxime după 7 și 21 zile, ajunge să depășească cu 70% (P<0.001) și cu 55% (P<0.001) respectiv valorile de referință. De remarcat faptul, că la 14 zile se atestă o diminuare temporară a activității enzimei, care la acest termen depășește valorile martor doar cu 28% (P<0.001). La 30 zile de regresie activitatea catepsinei L manifestă o tendință de reducere, deosebindu-se de valorile referențiale cu 28% (P<0.05).

Nivelul de activitate a catepsinei B în perioada de regresie a cirozei este în creștere ascendentă, înregistrând cota maximă la 30 zile - 194% ($P < 0.001$) și o diminuare temporară la 14 zile - 137% ($P < 0.01$). O evoluție similară a dinamicii de activitate se deduce și pentru catepsina H, indicii enzimozității fiind de o amploare excepțională. Astfel, la 7 zile de regresie a cirozei valorile activității enzimei depășesc de 8 ori și mai mult parametrele de referință ($P < 0.001$), menținându-se la acest nivel în decursul întregii perioade investigaționale.

Deci, ciroza hepatică provoacă o sporire esențială a activității proteinazelor lizozomice, care continuă a fi elevată și în perioada regenerării postcirotice a ficatului. Prezența a două maxime pe curbele dinamicului de activitate a catepsinelor cercetate este, probabil, o manifestare a implicării în procesele de proteoliză atât a sistemelor enzimatice lizozomice ale elementelor celulare ale țesutului conjunctiv (mai ales la etapele inițiale), cât și ale hepatocitelor (cu precădere la etapele mai avansate ale procesului de regresie a cirozei). Scăderea bruscă a activității enzimelor (în special a catepsinelor L și B) după 14 zile de regresie corespunde, probabil, micșorării numărului de macrofagi, fibroblaste și alte celule ale țesutului conjunctiv, care are loc în această perioadă [9]. Finisarea formării sistemului lizozomal în hepatocitele noi, apărute în rezultatul proceselor proliferative din țesutul hepatic are loc numai după circa 20 zile de regresie a cirozei ficatului [3], ceea ce se manifestă prin sporirea activității catepsinei L la 21 zile și a catepsinelor B și H la 30 zile după ultima injectare a noxei hepatotrope. Diferența în activitatea proteinazelor lizozomice cercetate se datorește, probabil, inducției selective a enzimelor la nivelul genomului în perioada de regresie a cirozei.

În lotul de animale, cărora concomitent cu CCl_4 li s-a administrat preparatul din microalge BioR^{Se} , la dezvoltarea maximă a cirozei se atestă o sporire notabilă a activității catepsinei L cu 53% ($P < 0.001$) în raport cu valorile animalelor intacte, ceea ce constituie 31% ($P < 0.01$) peste nivelul de enzimozitate înregistrat în ciroză. Modificările în activitatea catepsinelor B și H în acest lot se deosebesc neimportant de cele înregistrate în ciroză. Deci, administrarea preparatului din microalge BioR^{Se} în perioada de evoluție a procesului patologic în ficat conduce la amplificarea activității proteolitice în țesutul hepatic datorită sporirii nivelului funcțional al catepsinei L.

Administrarea preparatului din microalge BioR^{Se} în perioada de regresie conduce la influențe marcante asupra dinamicii de activitate a tuturor proteinazelor investigate. Astfel, la 7 zile de regresie se atestă un maxim de activitate a catepsinei L, care cu 8 % depășește nivelul indicelui respectiv al lotului, în care regresia cirozei a decurs fără medicație. Pentru catepsina B această devansare constituie 25 % ($P < 0.01$), iar pentru catepsina H - 19% ($P < 0.01$). Evoluția ulterioară a activității catepsinei L se află într-o descendență continuă, marcând la 14 zile de regresie indici superiori, iar la 21 zile indici inferiori celor din lotul fără medicație. La termenul de 30 zile valorile activității enzimei înregistrate pentru ambele loturi practic nu se deosebesc. Dinamica activității catepsinei B urmează o evoluție deosebită de cea a catepsinei L, intersectând valori superioare celor din lotul I atât la 14 zile, cât și la 21 zile de regresie. Indicii de activitate ai catepsinei H la acești termeni nu se deosebesc esențial de cei înregistrați în lotul I, iar la 30 zile de regresie a cirozei activitatea catepsinelor B și H estimată în lotul II scade comparativ cu cea din lotul I cu 16 % ($P < 0.05$) și 24 % ($P < 0.001$) respectiv.

Conchidem, că la etapele timpurii ale regresiei cirozei hepatice experimentale (7 zile de regresie) administrarea preparatului din microalge BioR^{Se} influențează în sensul unei amplificări și mai pronunțate a activității proteolitice a tuturor enzimelor menționate, pe când la etapele avansate ale procesului (21 zile de regresie) înregistrăm o astfel de influență numai asupra catepsinei B. Este evidentă acțiunea selectivă a preparatului asupra activității enzimelor studiate, care depinde, probabil, de gradul de angajare a lor la diferite etape în procesele de degradare a țesutului conjunctiv.

Astfel, datele cercetărilor noastre demonstrează prezența unui efect de stimulare a activității funcționale a proteinazelor cisteinice în ficat, realizat de administrarea preparatului din microalge BioR^{Se} și maximal exprimat la termenii timpurii ai regresiei cirozei. În această perioadă cea mai mare parte a enzimelor lizozomice provine din elementele celulare ale țesutului

conjunctiv prezent în exces [9]. Probabil, amplificarea capacității proteolitice a ficatului la această etapă conduce la o catabolizare mai eficientă a țesutului fibros, ceea ce facilitează și accelerează degradarea ulterioară a lui de către enzimele hepatocitelor. Această presupunere e confirmată și de faptul, că în țesutul hepatic al animalelor supuse medicației cu preparatul din microalge BioR^{Se} scăderea activității funcționale a proteinazelor cercetate (deci și a intensității procesului de proteoliză enzimatică în ficat) începe mai devreme decât în lotul de animale netratate.

Concluzii

1. Ciroza hepatică provoacă o sporire esențială a activității cathepsinelor B, H și L, care continuă a fi elevată și în perioada regenerării postcirotice a ficatului.

2. Administrarea preparatului din microalge BioR^{Se} realizează un efect de stimulare a activității funcționale a proteinazelor cisteinice în ficat maximal exprimat la termenii timpurii ai regresiei cirozei.

3. Efectul stimulator al preparatului din microalge BioR^{Se} asupra proceselor de degradare proteolitică din ficat la regresia cirozei hepatice experimentale contribuie la catabolizarea mai eficientă a țesutului fibros, ceea ce favorizează restabilirea morfo-funcțională a ficatului.

Bibliografie

1. **Barrett A.J.** Introduction: the classification of proteinases // *Protein Degradation in Health and Disease.*-Amsterdam-Oxford-New York, 1980, - p.1-13.
2. **Bohley P., Kirschke H., Langner J. Et al.** *Acta Biol. Med. Germ.*, 1976, V. 35, P. 301-7.
3. **Fisher-Szafarz B.** Активность лизосомальных ферментов в регенерирующей печени крыс и гепатоме как удобных моделях для изучения деления нормальных и опухолевых клеток // *Структура и функции лизосом.* - М., 1976. -С.9-11
4. **Murphy J., Reynolds J.J.** Current views of collagen degradation // *BioEssays.*-1985.- Vol.2, N 2.- P.55-60.
5. **Okazaki I., Oda M., Maruyama K. et al.** Mechanism of collagen resorption in experimental hepatic fibrosis: With special reference to the activity of lysosomal enzymes // *Bioch.exp.Biol.*- 1974. - Vol.11, N 1. - P.15-28.
6. **Olhaberry I.U.** Biochemistry of zinc // *S.Afr.Med.J.* -1983. -V.26. -N.64 (23), p.894-5
7. **Popper H., Udenfriend S.** Hepatic fibrosis: Correlation of biochemical and morphologic investigations // *Am.J. Med.* -1970.- Vol. 49.- P.707-21.
8. **Короленко Т.А., Пупышев А.Б., Музураковская А.В.** Исследование внутрилизосомального катаболизма белка с использованием лизосомотропных препаратов - ингибиторов протеолиза и протеинов // *Вопр. мед. химии.*-1987.-Т.33.-№5.-С.93-6.
9. **Рывняк В.В.** Механизмы инволюции экспериментального цирроза печени. Автореф. Дис. ... д-ра мед.наук -М., 1990.- 32 с.
10. **Саркисов Д.С.** Регенерация и ее клиническое значение.- М., 1970.-284 с.
11. **Табгари С.И., Шубитидзе Т.М.** // *Вопр. мед. химии.* - 1988. - №5. - С. 110-3.