

## Bibliografie

1. Изосимова Ш.С. О микроморфологии рецепторной иннервации надкостницы верхней конечности человека. Автореф. дисс. к. м. н., Казань, 1958.
2. Недорезова В.А. Нервы костей предплечья человека (макромикроскопическое и микроскопическое исследование). Автореф. к. м. н., Симферополь, 1981.
3. Потапенко Г.В. Иннервация надкостницы костей предплечья. Тр. II Украинской конф. АГЭ, Харьков, 1958.
4. Poburnaia E.V. Inervația periostului oaselor antebrăului omului. Autoref. tezei de doctor în științe medicale, Chișinău, 1993.
5. Тыщук Е.А. Анатомическая характеристика синдрома боли при переломах лучевой кости в типичном месте. Ортопедия, травматология и протезирование, I, 1959, стр. 34–36.

## Rolului catepsinelor B și L în resorbția colagenului în procesul de regresie a cirozei hepatice experimentale

\*V. Rîvneac, V. Gudumac, E. Rîvneac, O. Tagadiuc

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova

\*Corresponding author: E-mail: victorrivneac@yahoo.com

### Role of the cathepsins B and L in the collagen resorbption during the regression of the experimental liver cirrhosis

V. Rîvneac, V. Gudumac, E. Rîvneac, O. Tagadiuc

The activity of cysteinic proteinases (CP) – cathepsins B and L and the content of hydroxyproline (HYP) were investigated in cirrhotic rat liver and during the recovery from hepatic cirrhosis. It was determined an increase of CP activities in cirrhosis and during the postcirrhotic period. The modifications revealed a phase character. A high positive correlation between the dynamics of investigated enzymes activity and the modification of HYP level during the recovery period indicate to a direct impication of CP in fibrous tissue resorbption in liver.

**Kez words:** cathepsins B, cathepsins L, resorbption.

Была изучена активность цистеиновых протеиназ (ЦП) – катепсинов В и L, а также содержание оксипролина в цирротически измененной печени и при регрессии экспериментального цирроза печени у крыс. При циррозе и в постцирротический период происходит увеличение активности изученных ЦП, а динамика изменений имеет фазовый характер. Высокая положительная корреляция между динамикой активности исследованных ферментов и изменением количества оксипролина во время регрессии цирроза печени доказывает непосредственное участие ЦП в резорбции фиброзной ткани в печени.

**Ключевые слова:** катепсин В, катепсин L, резорбция.

Tradițional s-a creat o atitudine pesimistă față de fibroza hepatică și un timp îndelungat a fost unanim acceptat, că odată apărută, fibroza devine ireversibilă. Însă, pe parcursul ultimilor decenii, tot mai numeroși cercetători își îndreaptă eforturile spre studierea țesutului conjunctiv fibros în ciroză, ca subiect al degradării și resorbției [2].

Datele experimentale sugerează că reducerea excesului de colagen se realizează printr-un proces de resorbție activă și nu apare doar ca rezultat al sistării neoformației fibrilare. În rezultatul acestor investigații, mecanismul resorbției țesutului fibros excesiv în ficat a devenit subiectul principal al cercetărilor în problema reversibilității cirozei hepatice.

Actualmente, este general acceptat conceptul, bazat pe datele experiențelor efectuate *in vitro* și postulat de către Woessner J. [7], conform căruia etapa inițială în degradarea matricei extracelulare (MEC) este un proces proteolitic extracelular, care se poate solda cu scindarea colagenului sub acțiunea colagenazei. Fragmentele generate prin aceste atacuri proteolitice pot fi fagocitate de către macrofagi și supuse ulterior prelucrării intralizozomale. În prezent enzime-cheie în biodegradarea MEC sunt considerate a fi exo- și endopeptidazele matriceale (metalo-, serin-, cistein- și aspartil-proteinazele) [1], sintetizate de către celulele țesutului conjunctiv, mediul de acțiune al său fiind atât cel intracelular, cât și cel extracelular [9].

Se consideră că circa 90% ai proteolizei intralizozomale se realizează pe baza activității coerente a endopeptidazelor cisteinice – catepsinelor B, H și L [3]. Aceste proteinaze manifestă *in vitro* o specificitate excepțională față de substratele proteice în general și față de colagen în special. Interesul față de proteinazele cisteinice a sporit

enorm după ce s-a demonstrat că catepsina B exercită funcții reglatoare, se implică în activizarea postsintetică a precursorilor de hormoni peptidici și enzime (în special, a collagenazei) [5].

Catepsina B manifestă activitate dipeptidilcarboxipeptidazică, endopeptidazică, carboxi-peptidazică și este aptă să destructureze componentele principale ale matricei intercelulare: collagenul, inclusiv cel insolubil, și proteoglicanii, clivajul fiind realizat la valorile pH-ului de 4,0-6,0 [4]. Ea atacă de asemeni și segmentul spiralat al moleculei de collagen, element prin care diferă de mecanismul de acțiune a collagenazei. În ficat, catepsina B este localizată în celulele Kupffer, celulele endoteliale și în hepatocite [6].

Catepsina L scindează collagenul insolubil la pH 3,5, de altfel la acest pH activitatea specifică a enzimei crește de 5-10 ori peste cota atinsă de catepsina B. Efectul calitativ al catepsinei L asupra collagenului se bazează pe dezintegrarea peptidelor terminale, eliminând la fel și legăturile transversale. În ficat catepsina L a fost detectată imunohistochimic în celulele sinusoidale care, probabil, sunt celule Kupffer [6].

Totuși investigațiile privind participarea diferențiată și rolul catepsinelor lizozomice în degradarea collagenului în ficat s-au dovedit a fi puțin numeroase, fapt ce ne-a determinat să realizăm un studiu al particularităților de implicare a catepsinei L și B în resorbția țesutului fibros în ficat în procesul de regresie a cirozei hepatice experimentale.

**Scopul** prezentului studiu a urmărit determinarea activității proteinazelor cisteinice lizozomice (catepsinelor B și L) în țesutul hepatic cirozat și în procesul de regresie a cirozei hepatice experimentale, precum și corelația activității enzimelor studiate cu nivelul hidroxiprolinei tisulare.

### Metodele de investigație

Ciroza hepatică a fost provocată la animale de laborator (șobolani albi masculi) prin injecții subcutanate bisăptămânale a soluției de 50 % de tetracloră de carbon ( $CCl_4$ ) în ulei de măsline 3,0 ml la kilocorp în decurs de 13 săptămâni. Prelevarea materialului investigațional s-a efectuat la etapa dezvoltării maxime a cirozei hepatice și pe parcursul primei luni a perioadei de regresie a cirozei (la 7, 14, 21, 30 zile după ultima injecție a noxei hepatotrope) și după 2 luni de regresie.

*Procedeele de determinare a activității catepsinei L este bazat pe hidroliza enzimatică a azocazeinei [8]. Procedeele de determinare a activității catepsinei B este bazată pe proprietatea enzimei de a hidroliza N,  $\alpha$ -benzoi-D,L-arginină-p-nitroanilidhydrocloridul (BAPNA) (SERVA, Germania) cu formarea p-nitroanilinei [8]. Procedeele de determinare a hidroxiprolinei (HYP) este bazat pe proprietatea cloraminei B de a oxida HYP și pe condensarea ulterioară a produselor oxidării cu p-dimetilaminobenzaldehidă [10].*

### Rezultatele obținute

Activitatea catepsinelor B și L în ficat la dezvoltarea maximă a cirozei s-a dovedit a fi sporită esențial, depășind valorile înregistrate în lotul martor cu 17% ( $p < 0,05$ ) și 150 % ( $p < 0,05$ ) respectiv (tab. 1).

**Tabelul 1**

#### Conținutul de hidroxiprolină și activitatea catepsinelor B și L în țesutul hepatic la diferite etape de regresie a cirozei hepatice experimentale ( $M \pm m$ )

Condiții de experiment	Hidroxiprolina $\mu\text{mol/g}$	Catepsina B $\text{nM/s} \times \text{g}$	Catepsina L $\text{NM/s} \times \text{g}$
Valorile martor	$3,97 \pm 0,28$ (100%)	$0,127 \pm 0,008$ (100%)	$0,385 \pm 0,012$ (100%)
Ciroza	$11,13 \pm 0,77^*$ (280%)	$0,317 \pm 0,059^*$ (250%)	$0,448 \pm 0,022^*$ (117%)
7 zile de regresie	$13,34 \pm 0,80^{***}$ (336%)	$0,351 \pm 0,042^{**}$ (277%)	$0,656 \pm 0,033^{***}$ (170%)
14 zile de regresie	$10,06 \pm 0,62^{***}$ (254%)	$0,301 \pm 0,042^{**}$ (237%)	$0,494 \pm 0,013^{***}$ (128%)
21 zile de regresie	$10,48 \pm 0,64^{***}$ (264%)	$0,357 \pm 0,027^{***}$ (281%)	$0,595 \pm 0,009^{***}$ (155%)
30 zile de regresie	$8,68 \pm 0,45^{***}$ (219%)	$0,374 \pm 0,007^{***}$ (294%)	$0,493 \pm 0,044^*$ (128%)
60 zile de regresie	$7,14 \pm 0,52^{***}$ (180%)	$0,229 \pm 0,032^{**}$ (180%)	$0,425 \pm 0,054^*$ (110%)

**Notă:** \* – diferență statistic semnificativă cu lotul martor,  $p < 0,05^{**}$  –  $p < 0,01$ ;  $^{***}$  –  $p < 0,001$ .

Pe parcursul perioadei de regresie a cirozei activitatea proteinazelor examinate rămâne sporită. Astfel, nivelul funcțional al catepsinei L, înregistrând valori maxime după 7 zile și 21 zile, ajunge să depășească cu 70% ( $p < 0.001$ ) și cu 55% ( $p < 0.001$ ) respectiv parametrii 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 – 294 % ( $p < 0.001$ ) și o diminuare temporară la 14 zile – 237% ( $p < 0.01$ ).

Diferența parametrilor de activitate a enzimelor cercetate se datorește, probabil, inducției lor selective în perioada de regresie a cirozei.

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 dinamicii de activitate a enzimelor cercetate este, probabil, o manifestare a caracterului fazic al procesului studiat, precum și a implicării în procesele proteoglicolitice atât a sistemelor enzimatică 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 activității enzimelor după 14 zile de regresie corespunde, probabil, micșorării numărului de macrofage, fibroblaste și alte celule ale țesutului conjunctiv, care are loc în această perioadă.

Pentru a verifica relațiile funcționale ale enzimelor cu resorbția collagenului în ficat s-a realizat analiza corelațională (tab. 2), care a relevat atât un grad înalt de corelație între dinamica de activitate ale enzimelor investigate, cât și o corelație substanțială a acestora cu nivelul de hidroxiprolină tisulară.

**Tabelul 2**

**Indicii coeficienților de corelație (r) între dinamică de activitate a proteinazelor investigate și nivelul hidroxiprolinei tisulare (HYP)**

	<b>Catepsina L</b>	<b>HYP</b>
Catepsina B	0,71	0,82
Catepsina L		0,79

**Notă:**  $r = 0 - 0,3$  – corelație scăzută;  $r = 0,3 - 0,7$  – corelație medie;  $r = 0,7 - 1$  – corelație înaltă.

Aceste date atestă faptul acțiunii coerente a catepsinelor collagenolitice întru catabolizarea matricei extracelulare hepatice pe parcursul perioadei investigaționale, precum și implicarea directă a acestor enzime în degradarea țesutului conjunctiv în ficat.

**Concluzii**

În ciroza hepatică și în perioada postcirotică are loc sporirea activității proteinazelor cisteinice catepsinelor B și L în ficat, dinamica enzimozactivității manifestând un caracter fazic.

Catepsinele B și L sunt implicate direct în degradarea collagenului în ficat în procesul de regresie a cirozei hepatice experimentale, fapt demonstrat de gradul înalt de corelație pozitivă între modificările activității lor și cantității de hidroxiprolină în ficat.

**Bibliografia**

1. **Barrett A.J.** Introduction: the classification of proteinases // Protein Degradation in Health and Disease. – Amsterdam-Oxford-New-York, 1980. – P.1-13.
2. **Benyon R.C., Iredale J.P.** Is liver fibrosis reversible? // Gut. – 2000. – Vol.46. – P.443-446.
3. **Bohley P., Kirschke H., Langner J. et al.** // Acta Biol. Med. Germ. – 1976. – V.35. – P.301-307.
4. **Cardozo C., Kurtz C., Lesser M.** Degradation of rat lung collagens by cathepsin B. // J of Laboratory & Clinical Medicine. – 1992. – Vol. 199, N 2. – P. 169-175.
5. **Kirschke H., Barret AJ., Rawlinds N.** Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. // Protein Profile.-1995.- Vol.2, N 14. – P.1581-1643.
6. **Ii K., Hizawa K., Kominami E. et al.** Different immunolocalizations of cathepsins B, H and L in the liver // J.Histochem.Cytochem. – 1985. – V.33, N 11. – P.1173-1175.
7. **Woessner J.F.** Biological mechanisms of collagen degradation // Treatise on Collagen.- New York, 1968. – Vol.2, Part B.- P.253-330.

8. **Короленко Т.А., Пупышев А.Б., Музураковская А.В.** Исследование внутри-лизосомального катаболизма белка с использованием лизосомотропных препаратов – ингибиторов протеолиза и протеинов. // *Вопр. мед. химии.* – 1987. – Т.33. – №5. – С.93-6.
9. **Рывняк В.** Механизмы инволюции экспериментального цирроза печени // *Автореф.... доктора мед.наук.* – Москва, 1990.
10. **Шараев П.Н.** Метод определения свободного и связанного оксипролина в сыворотке крови. // *Лаб.дело,* 1981. – N 5. – С.283-285.

## Safe and durable plastination of anatomical preparations

\***D. Sivrev<sup>1</sup>, M. Gulubova<sup>2</sup>, N. Pirovski<sup>1</sup>, N. Dimitrov<sup>1</sup>, A. Georgieva<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Anatomy, Medical Faculty, University of Thrace, Stara Zagora, Bulgaria

<sup>2</sup>Department of General and Clinical Pathology, Medical Faculty, University of Thrace, Stara Zagora, Bulgaria

\*Corresponding author: E-mail: dsivrev@yahoo.com

### Abstract

Many years of experience from researchers in plastination of anatomical objects are introduced. The method is particularly relevant now, when there is a shortage of corpse training material for students in medicine, dentistry, and veterinary medicine. The reasons for failures of the plastination are analyzed: reduced duration of the plastination phases, operating temperature, composition of the plastination agent, and external contamination. Anatomical preparations made are absolutely safe for human health.

**Key words:** Plastination, Biodur, S10 technique, Anatomy, Education.

### Безопасность и прочность пластинации анатомических препаратов

Внедряется многолетний опыт работы с исследователями в области пластинации анатомических объектов. Этот метод особенно актуален сейчас, когда не хватает трупов для обучения студентов-медиков, стоматологов и ветеринаров. Причины неудач пластинации проанализированы: сокращенная продолжительность фазы пластинации, рабочая температура, состав агента пластинации и внешние загрязнения. Изготовленные анатомические препараты абсолютно безопасны для здоровья человека.

**Ключевые слова:** пластинация, Биодур, техника S10, анатомия, образование.

**Timeliness of the topic:** The study of morphological features in human and animals on corpse materials is the basis of anatomical education for medical students. Preservation and long-term storage of biological material is a major problem facing anatomists worldwide for centuries. The application of conservation techniques over the millennia was based on the latest physical and chemical factors for that time, but the prepared anatomical preparations have many shortcomings – most notably damage to human health, which is why research in this area continues today. Using plastinated anatomical objects for teaching anatomy is expensive in the short term, but in a long-term strategy, it is financially advantageous, as established morphological preparations are virtually timeless and can be used for decades without any special storage conditions. They are absolutely safe for human health and therefore can be studied by students and trainees in medicine, dentistry, and veterinary, for a long time without using special protective equipment.

### Material and methods

In the plastination process, two types of materials are used: organic matter (human and animal corpses or parts from them) and chemical agents (fixatives, dehydrating and impregnating agents, accelerators, colors, and gas-curing agents).

Physical and chemical changes that occur in the tissues after death hinder its preservation and exploration. Their organic ingredients are destroyed irreversibly by the action of microorganisms and the proteolytic enzymes present in cells whose function becomes uncontrollable after death. This resulted in the absence or insufficient protective measures into the decay and death of the tissue, and the destruction of anatomical teaching preparations that were made. Classic preservatives have a deleterious effect on the human body – causing inflammation and allergic reactions of the exposed mucous membranes, the respiratory organs, and airways.

In plastination methods, dehydrating and impregnating agents enter the dead tissue with a constantly changing cycle speed, and fill the tissue at a specific rate based on the tissues type.