

27. Şaptefraţi L. Progresia neoplaziei de cervix uterin şi activarea limfangiogenezei. *Curierul Medical*, 2 (308), 8-10, (2009).
28. Tsurusaki T., Kanda S., Sakai H. Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis. *Br. J. Cancer*, 80, 309-313, (1999).
29. Ueda M., Hung Y.C., Terai Y. Vascular endothelial growth factor-C expression and invasive phenotype in ovarian carcinomas. *Clin. Cancer Res.*, 11, 3225-3232, (2005).
30. Veikkola T., Karkkainen M., Claesson-Welsh L., Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res.*, 60, 203-212, (2000).
31. Vleugel M.M., Bos R., van der Groep P. Lack of lymphangiogenesis during breast carcinogenesis. *J. Clin. Pathol.*, 57, 746-751, (2004).
32. Wigle J.T., Oliver G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 98, 769-778 (1999).
33. Williams C.S., Leek R.D., Rpbson A.M. Absence of lymphangiogenesis and intratumoral lymph vessels in human metastatic breast cancer. *J. Pathol.*, 200, 195-206, (2003).
34. Wirzenius M., Tammela T., Uutela M., He Y., Odoriso T. Distinct vascular endothelial growth factor signals for lymphatic vessel enlargement and sprouting. *J. Exp. Med.* 204, 1431-40, (2007).

FACTORII MOLECULARI AI LIMFANGIOGENEZEI EMBRIONARE

Vitalie Mazuru

Catedra Histologie, Citologie şi Embriologie USMF „Nicolae Testemiţanu”

Summary

Molecular agents of embryonic lymphangiogenesis

Lymphatic vessels represent a duplication of venous vascular system. Promote the connection between all compartments of lymphatic system and, as a result, make possible the realizing of its specific functions such as: immune function, drainage, maintenance of the intratissular pressure, mechanic cleaning, recirculation of the lymphocytes etc. Are involved in pathogenesis of a wide variety of diseases, among which the main interest is focused on malignant tumors. There were made a lot of efforts in studying of lymphatic vessels both in norm and pathology, during the last decades. Different mechanisms that can inhibit the growth of new lymphatics, initially is studied in experimental models on avian and rodent embryos. That's why is so important, for understanding of new lymphatic vessels formation in different diseases, to know the embryonic lymphangiogenesis. The aim of this article is to highlight the molecular players and the mechanisms which through these players lead to embryonic morphogenesis of lymphatic vessels.

Rezumat

Sistemul vascular limfatic reprezintă o dublare a sistemului vascular venos. Asigură unitatea morfologică între toate compartimentele sistemului limfatic, făcând astfel posibilă realizarea funcţiilor specifice lui: imună, drenare, menţinerea presiunii intratisulare, curăţire mecanică, recircularea limfocitelor etc. Este implicat în patogenia multor afecţiuni dintre care un interes deosebit îl prezintă neoplaziile maligne. În ultimele decenii s-au făcut eforturi susţinute în studierea vaselor limfatice atât în normă, cât şi în patologie. Procesul de studiere al diferitor mecanisme de inhibare a creşterii vaselor limfatice noi se face iniţial în modele experimentale pe embrioni de pasăre sau rozătoare. Din aceste considerente reiese importanţa cunoaşterii limfangiogenezei embrionare pentru înţelegerea formării noilor limfatice în cadrul diferitor patologii. Scopul acestei lucrări este trecerea în revistă a ultimelor date despre factorii moleculari contribuabili la morfogeneza embrionară a limfaticelor.

Date generale

Sistemul limfatic este compus dintr-o rețea de vase limfatice și organe limfoide (ganglioni limfatici, amigdale, plăci Payer, splină, timus). Vasele limfatice se împart în capilare limfatice, limfatice eferente (intra- și extraorganice) și trunchiuri limfatice.

Spre deosebire de sistemul vascular sangvin, cel limfovacular nu formează o rețea de tip închis, limfa fiind transportată unidirecțional de la țesuturi spre circulația sangvină, punctul de confluență al acestor două sisteme fiind reprezentat de unghiul jugular[64].

Capilarele limfatice se deosebesc structural foarte mult de capilarele sangvine prin faptul că încep orb, sunt lipsite de fenestre, nu posedă o membrană bazală continuă (chiar existența ei fiind un subiect de controverse), lipsesc pericitele. Capilarele limfatice sunt formate dintr-un singur rând de celule endoteliale, unite între ele prin joncțiuni ocluzive și aderente. Endoteliocitele limfatice mai formează un tip de joncțiuni intercelulare moi de tip „valvă”. Între celule sunt mulți pori largi, iar pe versantul extern al capilarelor se poziționează filamentele de ancorare care le fixează la componentele matrixului extracelular. Aceste caracteristici fac din capilarele limfatice structuri înalt permeabile pentru macromolecule, diverși agenți patogeni și celule migratorii. În contrast cu capilarele limfatice, vasele limfatice colectoare posedă membrană bazală continuă, tunică musculară, tunică adventițială și valve ce previn fluxul retrograd al limfei. Pe lângă structurile avasculare, cum ar fi epidermul, părul, unghiile, cartilajele, corneea, vasele limfatice nu sunt prezente nici într-un șir de organe vascularizate precum creierul, măduva spinării, retina, măduva osoasă, splina, placenta.

Embriogeneza vaselor limfatice. Sistemul vascular limfatic se dezvoltă în paralel, dar secundar sistemului vascular sangvin, procesul fiind denumit limfangiogeneza (LAG). La păsări și la majoritatea mamiferelor, inițierea LAG este marcată de formarea sacilor limfatici primitivi ca rezultat al fuzionării capilarelor limfatice din zona jugulară, subclaviculară, dorsală, retroperitoneală. La oameni primii saci limfatici se observă între săptămâna a 6-a și a 7-a de dezvoltare embrionară, aproape peste o lună de la apariția primelor vase sangvine. La șoareci sistemul limfatic începe să se dezvolte în jurul zilei 10 de dezvoltare embrionară, atunci când sistemul cardiovascular este deja funcțional [41,57].

Sursa de formare a sacilor limfatici nu este elucidată totalmente nici până în prezent, existând 2 teorii de bază pe seama acestui subiect. Prima din ele este „teoria centrifugală”, care fost propusă în 1902 de către Florence Sabin[50,51]. Conform ei, sacii limfatici (primele elemente morfologice decelabile ale LAG) apar prin înmugurirea endoteliocitelor sangvine din venele cardinale ale embrionului. În perioada precoce de dezvoltare embrionară se formează mai mulți saci limfatici. Ulterior, celulele din acești saci, prin înmugurire continuă cu vector centrifug de deplasare al structurilor nou-formate, dau naștere la capilare limfatice noi. Conform acestui model, doi saci limfatici jugulari apar în apropierea venelor subclaviculare. Capilarele limfatice cu punct de pornire din acești doi saci, vor asigura vascularizarea limfatică a capului, gâtului, membrilor superioare și toracelui. Sacul limfatic retroperitoneal se formează lângă v. cava inferior din vv. mezonefrice, iar limfaticele apărute din acest sac vor vasculariza viscerele abdominale și diafragma. Ductul toracic se formează din cisterna chyli. Sacul limfatic posterior apare lângă confluența venelor iliace primitive cu venele cardinale posterioare, dând naștere limfaticelor peretelui abdominal, zonei pelviene, membrilor inferioare.

A doua teorie – „teoria centripetă” - a fost propusă de Huntington și McClure în 1910[20]. Conform acesteia, endoteliocitele limfatice apar direct din mezenchim, independent de venele cardinale, joncțiunea dintre sistemul limfatic și cel venos stabilindu-se ulterior. Structurile mezenchimale progenitoare ale endoteliului limfatic au fost denumite limfangioblaste. Conform lui Huntington, în zona venelor jugulare apar niște spații tapetate cu limfangioblaste, umplute cu sânge. Aceste spații se unesc între ele, formând un plex de vase limfatice, la rândul-le pline cu sânge (plexul limfatic hemoforic), care posedă numeroase joncțiuni cu venele cardinale jugulare. Vasele plexului fuzionează, formând sacii limfatici jugulari, care se unesc la venele jugulare și refulează în acestea conținutul său sangvin[19]. După aceasta se întrerupe joncțiunea cu componentul vascular venos, iar limfaticele periferice, formate tot din limfangioblaste,

proliferează în sens centripet, în direcția sacilor limfatici, la care se vor uni în final. Când rețeaua limfovasculară este formată în întregul organism și e deja conectată la sacii limfatici, aceștia din urmă se reonectează în unghiul venos. În opinia lui Davis (1915) și Kinnaert (1973), aceste mecanisme complexe de dezvoltare pot explica multiplele conexiuni dintre ductul toracic și sistemul venos, frecvent observate la oameni[10,33]. În teoria centripetă figurează doar o pereche de saci limfatici primitivi.

În opinia lui G. Oliver (2004) și altor autori[41,16,62,42], LAG este un proces complex, multistadial care se desfășoară în patru etape: competența celulelor precursore a endoteliocitelor limfatice, comitare limfoendotelială, specificare (diferențiere) limfoendotelială, diferențierea și maturarea vaselor limfatice.

Competența celulelor precursore a endoteliocitelor limfatice este capacitatea celulelor de a răspunde la un semnal inițial de inducție; acest stadiu pare a fi autonom și dirijat de către „ceasornicul biologic” (developmental timer)[15]. Cu toate că factorii moleculari care reglează stadiul inițial al competenței limfatice încă nu sunt cunoscuți, expresia receptorului pentru hialuronan al endoteliocitelor vaselor limfatice (LYVE1) de către un număr mic de endoteliocite care tapetează venele cardinale anterioare ale embrionului de șoarece cu vârsta de 9 zile, este considerat a fi primul indiciu morfologic al faptului că endoteliocitele venoase sunt deja competente de a răspunde la semnalele de inducție limfatică. LYVE1 este expresat în perioada embrionară de către endoteliocitele tuturor vaselor limfatice (la adulți expresia este restricționată la nivelul capilarelor limfatice), de către endoteliocitele sangvine de la nivelul sinusoidelor hepatice și lienale și de către macrofage[62,40]. Reprezintă o glicoproteină transmembranară ce conține un domeniu de atașare pentru proteina hialuronan. De acest domeniu se pot atașa atât forma solubilă, cât și cea legată a hialuronanului[5]. Hialuronanul este un component important al matricei extracelulare, fiind un mediator al migrării celulelor în timpul embriogenezei și al metastazării tumorale[34]. Probabil este implicat și în popularea ganglionilor limfatici cu leucocite CD44+[23,34]. LYVE1 participă la transportul hialuronanului prin peretele limfaticelor și reglează extravazarea leucocitelor din limfatice în interstițiu[23] (funcție mediată de hialuronanul atașat la LYVE1 pe fața luminală a vasului limfatic). Concentrațiile cele mai mari de hialuronan sunt în piele și în țesutul muscular scheletal, fiind metabolizat rapid. Degradarea hialuronanului are loc în ganglionii limfatici și în ficat, destinații la care ajunge prin patul vascular limfatic. Probabil LYVE1 nu determină competența limfoendotelială, deoarece deleția țintită a genei pentru LYVE1, la embrionul de șoarece, nu influențează în nici un mod dezvoltarea ulterioară a sistemului limfovascular[5]. Factorii moleculari responsabili de această competență sunt încă neidentificați. Datorită specificității înalte față de endoteliul limfatic și restricției expresării la nivelul endoteliului vascular sangvin (cu mici excepții), LYVE1 este unul din cei mai utilizați markeri limfoendoteliali[22].

Comitarea limfoendotelială – după stadiul inițial, celulele competente obțin abilitatea de a da naștere unui tip particular de celule (comitare limfatică); acest stadiu depinde de țesutul indus[15]. La mijlocul zilei 10 de dezvoltare a embrionului de șoarece (E9,5), după câteva ore de la debutul expresării LYVE1 de către celulele venelor cardinale, tot în aceste vene începe expresia factorului transcripțional prospero-related homeobox (Prox1) [61]. Spre deosebire de expresia LYVE1, care la această etapă este expresat de toate celulele endoteliale ale venelor cardinale anterioare, expresia Prox1 este restricționată doar la o subpopulație de endoteliocite, aflate toate de aceeași parte a peretelui venos[61]. Celulele progenitoare de endoteliocite limfatice Prox1+, au o amplasare polarizată în peretele venelor cardinale (toate de aceeași parte), înmugurirea lor ulterioară păstrând acest patern polarizat, moment ce indică prezența unui mecanism de ghidare a migrării celulare de tip special[61]. La moment nu este clară cauza acestei localizări specifice – ea este determinată de particularitățile mecanismului de inducție sau de heterogenitatea populației endoteliocitelor sangvine?

Dezvoltarea timpurie a sistemului vascular limfatic a fost studiată cel mai bine pe embrionul de șoarece. Embrionul de șoarece *Prox*^{-/-} nu posedă vase limfatice. Apariția expresării Prox1 pentru prima dată în endoteliocitele sangvine și absența vascularizării limfatice la

embrionii cu deleția țintită a genei pentru această substanță, reprezintă un suport puternic în favoarea teoriei lui Sabin, conform căreia celulele precursorale ale endoteliocitelor limfatice provin din endoteliocitele vasculare[61].

Prox1 este expresat de către endoteliocitele limfatice embrionare și adulte, dar nu este expresat în celulele endoteliale vasculare[62,61]. Restricționarea inițială a expresării Prox1 la o subpopulație de endoteliocite limfatice este un indiciu al faptului că, celulele Prox1+ sunt deja comitate pe calea dezvoltării limfatice și pot fi considerate precursori ai celulelor endoteliale limfatice (LEC). Absența vaselor limfatice la embrionii *Prox*^{-/-} este cauzată nu de incapacitatea precursorilor LEC de a înmuguri, ci din cauza că celulele competente LYVE1+ nu sunt comitate limfatic[62]. Celulele endoteliale care înmuguresc în E11-E11,5, din partea anterioară a venelor cardinale, la embrionii *Prox*^{-/-} nu exprimă markeri pentru LEC, în schimb exprimă markeri specifici pentru endoteliul vaselor sangvine[62]. Prin urmare expresia Prox1 este suficientă pentru a conferi endoteliocitelor sangvine un fenotip de LEC[3]. Experimental s-a demonstrat faptul că supraexpresia de Prox1 comitează cultura de endoteliocite sangvine spre un fenotip limfoendotelial; Prox1 induce în celule expresia genelor LEC-specifice și reprimă expresia genelor caracteristice celulelor endoteliale sangvine[17,45]. Prox1 este pozitiv în endoteliul limfaticelor embrionare, limfaticelor adulte și limfaticelor tumorale[62].

Specificarea limfoendotelială este stadiul în care celulele se vor diferenția spre fenotipul comitat, chiar dacă vor fi izolate de ceilalți componenți ambientali specifici[15]. Comitarea și specificarea limfoendotelială sunt două fenomene interpenetrante foarte strâns, fiind dificilă trasarea unei limite temporospațiale distincte între ele. Specificarea celulelor endoteliale limfatice reprezintă primul pas spre diferențierea limfatică finală. Pe parcursul acestui stadiu apare și se intensifică expresia mai multor markeri limfatici, în timp ce expresia unor markeri specifici endoteliului sangvin (spre exemplu, CD44, laminina) se micșorează progresiv[62]. Indiciul morfologic al specificării limfoendoteliale este înmugurirea LEC imature din venele cardinale, care la embrionul de șoarece începe în E10,5[41,62]. La embrionul de șoarece, în E10,5 ambii markeri (LYVE1 și Prox1) sunt expresați atât de endoteliul venos, cât și de LEC în proces de înmugurire.

La embrionii de șoarece, celulele limfoendoteliale ce înmuguresc din venele cardinale anterioare, pot fi detectate din E10,5 până la E12,5, atunci când își fac apariția primii saci limfatici. O trăsătură caracteristică pentru capilarele limfatice este absența unei membrane bazale continue. La începutul E11 începe descreșterea continuă a ratei de expresie în LEC aflate în procesul de înmugurire[62].

VEGFR-3 este receptor tirozin-kinazic membranar, relativ stabil, cu masa moleculară de 180 kDa. Datorită similarității structurale, VEGFR-1, -2 și -3 formează o subfamilie de receptori tirozin-kinazici clasa III. Au fost identificate 2 isoforme ale VEGFR-3, care se deosebesc între ele prin structura domeniului C-terminal[41].

Până la înmugurirea precursorilor LEC din venele cardinale anterioare, VEGFR-3 este expresat în endoteliul vaselor sangvine, unde joacă un rol esențial în remodelarea și maturarea plexului capilar primar[12]. Ulterior, după E11, expresia sa în endoteliul vascular descrește, devenind în final restricționată la nivelul vaselor limfatice și al capilarelor fenestrate[26]. La adulți se expresează în vasele limfatice lipsite de miocite[36]. Conform opiniei lui Partanen și colab.[44], expresia VEGFR-3 la nivelul capilarelor cu endoteliu discontinuu și absența expresiei în capilarele cu endoteliu continuu, se explică prin rolul pe care îl are acest marker în permeabilitatea vasculară. Embrionii de șoarece, lipsiți de gena pentru VEGFR-3, mor la E9,5 din cauza insuficienței cardiace, ceea ce perechetează evaluarea detaliată a impactului VEGFR-3 asupra LAG[12]. Activarea continuă a receptorului VEGFR-3 de către ligandul specific duce la dezvoltarea și remodelarea vaselor limfatice în perioada embrionară și timp de 2 săptămâni după naștere, după care vasele limfatice devin independente față de VEGFR-3[32,35]. Inactivarea genei pentru VEGFR-3 prin mutație duce la apariția hipoplaziei limfatice și limfedemului congenital primar, lucru care demonstrează importanța majoră a acestui factor în dezvoltarea vaselor limfatice[21, 27,29].

VEGFR-3 are 2 liganzi specifici: VEGF-C și VEGF-D, ambii fiind mitogeni foarte puternici pentru endoteliul vaselor limfatice[24,58]. Cu toate că VEGF-C nu are nici un rol în comitarea limfoendotelială, este esențial pentru creșterea, migrarea direcționată și supraviețuirea ulterioară a celulelor endoteliale limfatice[28]. Deleția ambelor alele pentru VEGF-C duce la moartea embrionului, iar embrionii de șoarece heterozigoți (*Vegfc*^{+/-}) prezintă dereglări severe în dezvoltarea sistemului vascular limfatic[28]. În timpul dezvoltării embrionare, VEGF-D este implicat în creșterea endoteliului atât limfatic, cât și vascular. Unicul defect cauzat de deleția genei pentru VEGF-D constă în reducerea ușoară a numărului de vase limfatice în jurul bronhiolilor pulmonare – situsul primar de expresie a acestui marker[4].

Cu toate că VEGF-C și VEGF-D sunt factorii indispensabili ai creșterii limfatice (în speță VEGF-C), a fost demonstrată implicarea lor și în creșterea vaselor sangvine la mamifere[48,65]. In vitro, VEGF-C determină proliferarea endoteliului limfatic și celui vascular[25,37]. Afinitatea și modalitatea de atașare a acestor 2 factori de creștere la receptorul lor specific este reglată de procesarea proteolitică graduală a precursorilor proteici (forma sub care VEGF-C și -D sunt sintetizați). Precursorul inițial al acestor doi factori de creștere e constituit din 3 compartimente, fiecare reprezentând câte un dimer (în total 6 componente): capătul N-terminal (un dimer), capătul C-terminal (un dimer) și domeniul VHD (un dimer) (**V**egf **H**omologue **D**omain) care conține situsul de atașare cu receptorul și în lipsa celor două capete este considerat forma matură și cea mai activă a ambilor mediatori. Toate componentele precursorului sunt unite între ele. În stare neprocesată VEGF-C are o afinitate slabă pentru LEC și nu o are deloc pentru endoteliul sangvin (BEC). VEGF-D neprocesat are afinitate pentru ambele tipuri de endoteliu, dar în ambele cazuri afinitatea este slabă. Ambele capete, carboxi- și aminoterminal, sunt unite la VHD prin câte o pereche de legături disulfidice. Enzima care clivează precursorul proteic al factorului de creștere este plasmina[6]. Proteoliza precursorului include două etape, după fiecare etapă crescând progresiv afinitatea produsului de reacție față de receptor[30]. În rezultatul primei reacții câte un component de la domeniile laterale (dimerul C-terminal și cel N-terminal) pierde legătura cu VHD. Această substanță este un ligand puternic pentru VEGFR-3, dar nu se unește la VEGFR-2. După a doua reacție domeniile laterale sunt înlăturate definitiv de la VHD și în această stare mediatorul este ligand foarte puternic pentru VEGFR-3 și puternic pentru VEGFR-2[55]. Prin urmare factorii de creștere ai endoteliului vascular -C și -D posedă un efect mitogenic puternic (primar) asupra endoteliului limfatic, dar au și un efect moderat (secundar) asupra proliferării endoteliului sangvin, efect mediat de VEGFR-2. În ultima perioadă apar tot mai multe date referitor la expresia de către endoteliul limfatic a VEGFR-2 (receptorul de bază al factorilor de creștere al endoteliului vascular de tip sangvin), intensitatea căreia corelează în mod direct cu gradul de dezvoltare al rețelei capilare limfovaskulare[14,49,58,63]. Prin urmare, gradul de procesare proteolitică a precursorilor VEGF-C și VEGF-D determină potențialul lor limfangiogenic sau angiogenic.

VEGFR-3 se poate heterodimeriza cu VEGFR-2 (receptorul heterodimerizat constă din 2 jumătăți ca și cel homodimeric, numai că o jumătate e de la VEGFR-3 iar altă jumătate de la VEGFR-2), ceea ce va duce la o fosforilare diferită a capătului carboxiterminal, și posibil, o transducție diferită a semnalului indus de către ligand în comparație cu semnalul generat de VEGFR-3 homodimeric[11]. Datele recente sugerează că cooperarea dintre VEGFR-2 și VEGFR-3 este necesară pentru migrarea și proliferarea LEC, iar organizarea cordoanelor de celule endoteliale limfatice în capilare funcționale este asigurată de VEGFR-2[14].

Neuropilina-2 (Nrp2) face parte din grupul receptorilor neuropilini, pentru care liganzi cu afinitate foarte înaltă sunt semaforinele (SemaE și SemaIV) implicate în creșterea axonală embrionară[29,8]. Spre deosebire de celelalte neuropiline Nrp2 este expresată și în vasele limfatice[66]. Nrp2 este un receptor transmembranar localizat alături de VEGFR-3. La unirea VEGF-C sau VEGF-D cu receptorul, Nrp2 este internalizat de către VEGFR-3, fapt care sugerează că Nrp2 modulează transducerea semnalului de către VEGFR-3[31]. Șoarecii cu gena pentru Nrp2 mutantă se nasc fără capilarele și vasele limfatice mici (ele încep să se formeze în perioada postnatală), pe când vasele limfatice de calibru mare sunt dezvoltate normal[66].

Aceasta arată importanța selectivă și temporară a Nrp2 pentru dezvoltarea vaselor limfatice mici, efectul producându-se doar în perioada embrionară.

A fost demonstrat și rolul integrinelor în dezvoltarea limfatică. Integrina β_1 , când este unită cu colagenul sau fibronectina, poate interacționa direct și induce fosforilarea VEGFR-3. De asemenea activează migrarea celulelor endoteliale[18]. Integrina $\alpha_5\beta_1$ potențează activarea VEGFR-3 de către VEGF-C156S, interacțiune esențială pentru supraviețuirea și proliferarea fibronectin-mediată a endoteliocitelor limfatice[67]. Șoarecii cu integrina α_9 deficientă mor în perioada post-natală precoce, având chilotorax masiv[18]. Integrina $\alpha_9\beta_1$ are afinitate pentru VEGF-C și VEGF-D[59]. Mecanismele celulare și moleculare de acțiune a integrinelor încă nu sunt cunoscute exact, dar în baza celor menționate mai sus, rolul lor în limfangiogenează devine foarte sugestiv.

Podoplanina umană (T1 α -2) este o glicoproteină transmembranară cu greutatea moleculară 38kDa constituită din 162 aminoacizi, nouă dintre care formează domeniul intracelular. Domeniul extracelular este înalt O-glicozilat cu acid sialic α -2,3 atașat la galactoză, formând partea principală a podoplaninei. În țesuturile umane normale, podoplanina este expresată de către podocitele glomerulilor renali[7], țesutul muscular scheletal, placentă, pulmon, cord[38], în miofibroblastele glandei mamare și glandelor salivare, în osteoblaste și celulele mezoteliale[43]. De asemenea este expresat și în porțiunea apicală a alveolocitelor de tip I la șobolani[47]. Ocazional, poate fi întâlnită expresarea podoplaninei, sub formă de arii circumscrise, și în stratul bazal al epidermului uman[52], dar care este expresată predominant de către endoteliul vaselor limfatice. Expresia sa debutează în jurul E11 și rămâne la cote înalte atât în endoteliul vaselor limfatice colectoare, cât și al limfocapilarelor adulților[7,53]. Șoarecii cu podoplanina deficientă mor la naștere din cauza insuficienței respiratorii, prezentând și dereglări de dezvoltare ale vaselor limfatice (nu și a celor sangvine), fapt de diminuaie drenarea limfei și provoacă limfedem congenital[53]. În cultură, podoplanina determină adeziunea intercelulară, migrarea și formarea cordoanelor endoteliale[53]. Podoplanina este supraexpresată la frontul de invazie a multor carcinoame umane, ea făcându-se vinovată de invazia tumoro-celulară[60].

Diferențierea și maturarea vaselor limfatice reprezintă stadiul final în constituirea vaselor limfatice și reprezintă rezultatul proceselor de inducție, promovate de către structurile adiacente[13]. Acest stadiu nu este limitat doar la perioada embrionară de dezvoltare, ci continuă și după naștere. În jurul E14,5 vasele limfatice sunt prezente deja de-a lungul întregului embrion în curs de dezvoltare, iar LEC sunt la finalul diferențierii. Odată cu progresarea LAG, noi markeri încep să fie expresați de către vasele și capilarele limfatice.

Cele patru stadii de dezvoltare graduală a patului vascular limfatic ocupă la embrionul de șoarece aproximativ șapte zile[42]. Prin urmare, detecția și nivelul de expresie a unor markeri depinde de stadiul dezvoltării embrionului și de tipul țesutului studiat. Doar în preajma nașterii vasele limfatice expresează întregul profil de markeri, care sunt decelabile în limfaticele adulte.

Tie2 este un receptor tirozin-kinazik, esențial în remodelarea, maturarea și stabilizarea vaselor sangvine. Ligandul specific al receptorului Tie2 este angiopoietina2 (Ang-2). A fost demonstrat că Tie2 este expresat și de către LEC[13]. La șoarecii cu Ang-2 deficientă suferă remodelarea vasculară sangvină postnatală[13]. La acești șoareci mai apare și o disfuncție limfatică generalizată, cauzată de subdezvoltarea vaselor limfatice colectorii (ele au în peretele său o cantitate mult mai mică de miocite în comparație cu vasele colectoare limfatice normale) și hipoplazia rețelei capilare limfatice[13]. Prezintă interes faptul că activarea Tie2 de către Ang-1, la șoarecii sus-menționați, va determina o dezvoltare normală a vaselor limfatice, dar nu va evita apariția disfuncțiilor vasculare sangvine. Acest lucru sugerează că Ang-2 acționează cu Tie2 ca agonist în cazul dezvoltării limfaticelor și ca antagonist în cazul dezvoltării vaselor sangvine. Pe lângă importanța Ang-1 în LAG embrionară, s-a demonstrat efectul inductor al ei asupra formării vaselor limfatice și în țesuturile adulte[39,56].

EphrinB2 este expresat în vasele limfatice colectoare. Este ligandul receptorului EphB4. Este crucial pentru remodelarea postnatală a vaselor limfatice și organizarea lor într-o rețea vasculară ierarhizată[36]. Șoarecii cu EphrinB2 inactivată prezintă hiperplazia vaselor limfatice

colectoare, valve intraluminale defectuoase și formarea de cordoane limfoendoteliale discontinui ce vor duce la apariția capilarelor limfatice cu un lumen foarte larg, cu multiple protruziuni pe traiectul său. Prin urmare, aceasta indică implicarea EphrinB2 în elongarea și migrarea direcționată a LEC.

FOXC2 (forkhead transcription factor) este expresat în vasele limfatice la stadiile tardive ale dezvoltării embrionare și în valvele limfaticelor de la adulți[9,46]. La embrionii *FOXC2*^{-/-} dezvoltarea precoce a limfaticelor decurge normal. La stadiile mai avansate patternul structural limfovacular devine atipic prin creșterea numărului de pericite, miocite și componente ale membranei bazale (colagen tip IV)[46]. Prezența pericitelor și miocitelor în jurul capilarelor limfatice e probabil cauzată de creșterea expresiei de PdgfB (factorul de creștere B derivat din trombocite) și endoglinei, care sunt responsabili de recrutarea celulelor murale (care fac parte structura peretelui) în vasele sangvine. În afara de aceasta, vasele colectoare limfatice, la embrionii *FOXC2*^{-/-}, sunt lipsite de valve. În baza acestor date este evident rolul FOXC2 în dezvoltarea limfatică embrionară tardivă prin reglarea morfogenezei valvelor și în controlul interacțiunii LEC cu celulele murale prin supresia expresării PdgfB, endoglinei, limitarea depunerii de colagen IV, menținând astfel fenotipul limfatic al vaselor formate[46].

Acordul final în dezvoltarea vaselor limfatice îl constituie separarea lor de sistemul vascular sangvin. În pofida faptului că returnarea în sistemul venos al limfei, cu toate componentele sale, se face la nivelul unghiului venos cervical, în organism există joncțiuni limfovenoase la nivelul glandei suprarenale, ficatului, rinichilor. În normă ele se consideră a fi non-funcționale, cu excepția cazurilor de creștere a presiunii intralimfatice. Anastomozele limfovenoase pot fi observate în limfedem congenital, limfedem secundar, ascita chiloasă, chilotorax[1].

Moleculele de semnalizare intracelulară SYK și Slp76, care se expresează aproape exclusiv în celulele hematopietice și nu în cele endoteliale, sunt implicate în această separare. Se consideră că trecerea acestor molecule din celulele hematopietice circulante, care sunt, probabil, celule endoteliale progenitoare, în celulele endoteliale se face printr-un mecanism de transfer intercelular integrin-mediat[54]. Mecanismele moleculare prin care se realizează această separare la moment nu sunt cunoscute, dar este cert demonstrat că la embrionii de șoarecii cu SYK și Slp76 deficiente apar multiple șunturi arteriovenoase și conexiuni limfovenoase anormale, ce determină prezența vaselor limfatice umplute cu sânge[2].

Concluzii

Morfogeneza embrionară a vaselor limfatice este un proces complex multistadial. Limfangiogeneza începe în termeni precoce ai dezvoltării embrionare, continuând pe tot parcursul vieții în funcție de necesitățile reparatorii și de drenare ale organismului la un moment anumit. Numeroasele modele experimentale puse pe animale de laborator vin să susțină teoria centrifugală de formare a vaselor limfatice, propusă de Florence Sabin. În ultima perioadă de timp tot multe lucrări apar în literatura de specialitate despre rolul limfangioblastelor în limfangiogeneza. Cu toate că fenotipic limfaticele normale se deosebesc puternic de cele tumoral-produse, procesele de formare a lor în ambele cazuri practic nu se deosebesc. De aici reiese și importanța majoră a cunoașterii detaliate a limfangiogenezei embrionare, pentru a face posibilă implementarea cunoștințelor obținute în terapia țintită antilimfovaculară din patologii ce se caracterizează printr-un patern limfangiogen marcat (limfedem primar congenital, limfedem secundar, tumori maligne).

Bibliografie

1. Aalami O.O., Allen D.B., Organ C.H.Jr. Chylous ascites: a collective review. *Surgery* 128, 761–78, (2000).
2. Abtahian F., Guerriero A., Sebzda E., Lu M.M., Zhou R. Regulation of blood and lymphatic vascular separation by signaling proteins SLP-76 and Syk. *Science* 299, 247–51, (2003).

3. Aprelikova O, Pajusola K, Partanen J, Armstrong E, Alitalo R, Bailey SK, McMahon J, Wasmuth J, Huebner K, Alitalo K. FLT4, a novel class III receptor tyrosine kinase in chromosome 5q33-qter. *Cancer Res* 52, 746–748, (1992).
4. Baldwin M.E., Halford M.M., Roufail S., Williams R.A., Hibbs M.L. Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol. Cell. Biol.* 25, 2441–49, (2005).
5. Banerji S., Ni J., Wang S.X., Clasper S. LYVE-1, a new homologue of CD44 glycoprotein, is a lymph specific receptor for the hyaluronan. *J. Cell. Biol.* 144, 789-801, (1999).
6. Bradley K. McColl, Megan E. Baldwin, Sally Roufail, Craig Freeman, Robert L. Moritz, Richard J. Simpson, Kari Alitalo, Steven A. Stacker, and Marc G. Achen. Plasmin Activates the lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D. *the Journal of Experimental Medicine*. 0022-1007. Temporary pagination 1-6, (2003).
7. Breiteneder-Gellef S., Soleiman A., Kowalski H., Horvat R., Amman G., Kriehuber E., Diem K., Weninger W., Tschachler E., Alitalo K., Kerjaschki D. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am. J. Pathol.* 154, 385-394, (1999).
8. Chen H., Chedotal A., He Z., Goodman C.S., Tessier-Lavigne M. Neuropilin2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV, but not Sema III. *Neuron* 19, 547-559, (1997).
9. Dagenais S.L., Hartsough R.L., Erickson R.P., Witte M.H., Butler M.G. Foxc2 is expressed in developing lymphatic vessels and other tissues associated with lymphedemadistichiasis syndrome. *Gene Expr. Patterns* 4, 611–19, (2004).
10. Davis H. A statistical study of the thoracic duct in man. *Am J Anat* 1915;17:211–244.
11. Dixelius J., Makinen T., Wirzenius M., Karkkainen M.J., Wernstedt C. Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* 278, 40973–79, (2003).
12. Dumont D.J., Jussila L., Taipale J., Lymboussaki A., Mustonen T. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* 282, 946-949, (1998).
13. Gale N.W., Thurston G., Hackett S.F., Renard R., Wang Q. Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev. Cell* 3, 411–23, (2002).
14. Goldman J., Rutkowski J.M., Shields J.D., Pasquier M.C., Cui Y. Cooperative and redundant roles of VEGFR-2 and VEGFR-3 signaling in adult lymphangiogenesis. *FASEB J.* 21, 1003–12, (2007).
15. Grainger R.M. Embryonic lens induction: shedding light on vertebrate tissue determination. *Trends Genet.* 8, 349–355 (1992).
16. Guillermo Oliver. Lymphatic vasculature development. *Nature reviews/Immunology* 2004: volume 4: 35-45.
17. Hong Y.K. Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev. Dyn.* 225, 351–357 (2002).
18. Huang X.Z., Wu J.F., Ferrando R., Lee J.H., Wang Y.L. Fatal bilateral chylothorax in mice lacking the integrin $\alpha 9\beta 1$. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5208–15, (2000).
19. Huntington G.S. The genetic relations of lymphatic and hemal vascular channels in the embryos of amniotes. *Am J Anat* 1914;16:259–316.
20. Huntington, G. S., McClure, C.F.W. The anatomy and development of the jugular lymph sac in the domestic cat (*Felis domestica*). *Am. J. Anat.* 10, 177–311 (1910).
21. Irrthum A., Karkkainen M.J., Devriendt K., Alitalo K., Vikkula M. Congenital hereditary lymphedema caused by a mutation that inactivates VEGFR3 tyrosine kinase. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 295-301, (2000).

22. Jackson D.G. Biology of the lymphatic marker LYVE-1 and applications in research into lymphatic trafficking and lymphangiogenesis. *APMIS* 112, 526-538 (2004).
23. Jackson D.G., Prevo R., Clasper S., Banerji S. LYVE-1, the lymphatic system and tumor lymphangiogenesis. *Trends Immunol.* 22, 317-321 (2001).
24. Jeltsch M., Kaipainen A., Joukov V., Meng X., Lakso M. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science*, 276, 1423-25, (1997).
25. Joukov V., Sorsa T., Kumar V., Jeltsch M., Claesson-Welsh L., Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J.* 16, 3898-911, (1997).
26. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VWM, Fang G-H. Expression of the fms-like tyrosine kinase FLT4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92:3566-70, (1995).
27. Karkkainen M.J., Ferrell R.E., Lawrence E.C., Kimak M.A., Levinson K.L. Missense mutations interfere with VEGFR-3 signalling in primary lymphoedema. *Nat. Genet.* 25:153-59, (2000).
28. Karkkainen M.J., Haiko P., Sainio K., Partanen J., Taipale J. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat. Immunol.* 5, 74-80, (2004).
29. Karkkainen M.J., Saaristo A., Jussila L., Karila K.A., Lawrence E.C. A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 12677-82, (2001).
30. Karpanen T., Alitalo K. Molecular biology and pathology of lymphangiogenesis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 3, 367-397, (2008).
31. Karpanen T., Heckman C.A., Keskitalo S., Jeltsch M., Ollila H. Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors. *FASEB J.* 20, 1462-72, (2006).
32. Karpanen T., Wirzenius M., Makinen T., Veikola T., Haisma H. Lymphangiogenic growth factor responsiveness is modulated by postnatal lymphatic maturation. *Am. J. Pathol.* 169, 708-718, (2006).
33. Kinnaert P. Anatomical variations of the cervical portion of the thoracic duct in man. *J Anat* 1973;115:45-52.
34. Knudson C.B., Knudson W. Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease. *FASEB J.* 7, 1233-1241 (1993).
35. Makinen T, Jussila L., Veikkola T., Karpanen T., Kettunen M.I. Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat. Med.* 7, 199-205, (2001).
36. Makinen T., Adams R.H., Bailey J., Lu Q., Ziemecki A. PDZ interaction site in ephrinB2 is required for the remodeling of lymphatic vasculature. *Genes Dev.* 19, 397-410, (2005).
37. Makinen T., Veikkola T., Mustjoki S., Karpanen T., Catimel B. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGFC/D receptor VEGFR-3. *EMBO J.* 20, 4762-73, (2001).
38. Martin-Villar E., Scholl F.G., Gamallo C., Yuritta M.M., Munoz-Guerra M., Cruces J., Quintanilla M. Characterization of human PA2.26 antigen (T1 alpha-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas. *Int. J. Cancer*, 113, 899-910, (2005).
39. Morisada T.M., Oike Y., Yamada Y., Urano T., Akao M. Angiopoietin-1 promotes LYVE-1-positive lymphatic vessel formation. *Blood*, 105, 4649-56, (2005).
40. Mouta-Carreira, C. LYVE-1 is not restricted to the lymph vessels: expression in normal liver blood sinusoids and downregulation in human liver cancer and cirrhosis. *Cancer Res.* 61, 8079-8084 (2001).
41. Oliver D., Detmar M. The rediscovery of the lymphatic system: old and new insights into the development and biological function of the lymphatic vasculature. *Genes Dev.* 16, 773-783 (2002).

42. Oliver, G., Harvey N. A stepwise model of the development of lymphatic vasculature. *Ann. NY Acad. Sci.* 979, 159–165 (2002).
43. Ordonez N.G. Podoplanin: a novel diagnostic immunohistochemical marker. *Adv. Anat. Pathol.* 13, 83-88, (2006).
44. Partanen J., Paavonen K. Lymphatic versus blood endothelial growth factors and receptors in humans. *Microscopy research and technique.* 55, 108-121, (2001).
45. Petrova T.V. Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor. *EMBO J.* 21, 4593–4599 (2002).
46. Petrova T.V., Karpanen T., Norrmen C., Mellor R., Tamakoshi T. Defective valves and abnormal mural cell recruitment underlie lymphatic vascular failure in lymphedema distichiasis. *Nat. Med.* 10, 974–981, (2004).
47. Rishi A., Floros J., Vanderspek J., Brody J.S., Williams M.C. Cloning, characterization and development expression of a rat lung alveolar type I gene in embryonic endodermal and neural derivatives. *Dev. Biol.* 167, 294-306, (1995).
48. Rissanen T., Markkanen J.E., Gruchala M., Heikura T. VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. *Circ. Res.* 92, 1098-106, (2003).
49. Saaristo A., Veikkola T., Tammela T., Enholm B., Karkkainen M.J. Lymphangiogenic gene therapy with minimal blood vascular side effects. *J. Exp. Med.* 196, 719-730, (2002).
50. Sabin F.R. On the development of the superficial lymphatics in the skin of the pig. *Am. J. Anat.* 3, 183-195 (1904).
51. Sabin, F.R. On the origin of the lymphatic system from the veins, and the development of the lymph hearts and thoracic duct in the pig. *Am. J. Anat.* 1, 367–389 (1902).
52. Schacht V., Dadras S.S., Johnson L.A., Jackson D.G., Hong Y.K., Detmar M. (2005) Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol* 166, 913–921, (2005).
53. Schacht V., Ramirez M.I., Hong Y.K., Hirakawa S., Feng D. T1 α /podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J.* 22, 3546-56, (2003).
54. Sebzda E., Hibbard C., Sweeney S., Abtahian F., Bezman N. Syk and Slp-76 mutant mice reveal a cell-autonomous hematopoietic cell contribution to vascular development. *Dev. Cell* 11, 349–361, (2006).
55. Stacker S.A., Stenvers K., Caesar C., Vitali A., Domagala T. Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers. *J. Biol. Chem.* 274, 32127–36, (1999).
56. Tammela T., Saaristo A., Lohela M., Morisada T., Tornberg J. Angiopoietin-1 promotes lymphatic sprouting and hyperplasia. *Blood* 105, 4642–48, (2005).
57. van der Putte S.C. The early development of the lymphatic system in mouse embryos. *Acta Morphol. Neeri. Scand.* 13, 245-286 (1975).
58. Veikkola T., Jussila L., Makinen T., Karpainen T., Jeltsch M. Signaling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J.* 20, 1223-31, (2001).
59. Vlahakis N.E., Young B.A., Atakilit A., Sheppard D. The lymphangiogenic vascular endothelial growth factors VEGF-C and -D are ligands for the integrin α 9 β 1. *J. Biol. Chem.* 280, 4544–52, (2005).
60. Wicki A., Lehembre F., Wick N., Hantusch B., Kerjaschki D., Christofori G. Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell* 9, 261–272, (2006).
61. Wigle J.T., Oliver G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 98, 769–778 (1999).

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 remediei 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