

## Collagenase participation in the collagen biodegradation in the liver during the regression of experimental hepatic cirrhosis

R. Pretula

Laboratory of Morphology, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy  
Chisinau, the Republic of Moldova

Corresponding author: ruslanpretula@yahoo.com. Manuscript received May 03, 2013; accepted October 15, 2013

### Abstract

The role of the collagenase in the collagen degradation in rat liver during the regression of experimental cirrhosis has been investigated. The activity of collagenase has been determined biochemically and electronically and histochemically in the normal condition of liver and in CCl<sub>4</sub>-induced fibrotic rat liver and during 2 months after the end of the treatment by CCl<sub>4</sub>. In the condition of liver cirrhosis a decrease of collagenase activity has been revealed. After the cessation of CCl<sub>4</sub>-treatment two maximums (on the 7<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> days) of a significant increase in collagenolytic activity have been determined. A strong correlation between the dynamics of collagenase activity and the change of hydroxyproline level in the liver tissue has been identified. Electronically and histochemically it has been determined that in a normal rat liver the active collagenase is located in lysosomes of Kupffer cells and endotheliocytes. In the fibrotic rat liver the reaction product was revealed mainly extracellularly on hepatocytes, macrophages and fibroblasts cytolemma and on the adjacent collagen fibrils on the 7<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> days after CCl<sub>4</sub> abolition. The results show that during the recovery from hepatic fibrosis the active collagenase is located mainly extracellularly. There are two periods of collagenolytic activity augmentation in liver – on the 7<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> days after the discontinuation of CCl<sub>4</sub>-treatment. It means that the initiation of collagen degradation in liver takes place at least twice, probably, depending on the quantity and activity of different types of liver cells.

**Key words:** collagenase, metalloproteinases, collagen biodegradation, regression of hepatic cirrhosis.

### Participarea colagenazei la biodegradarea colagenului în ficat în procesul de regresie a cirozei hepatice experimentale

**Actualitatea și importanța problemei abordate.** Menținerea homeostaziei, atât în condiții normale, cât și în stările patologice, este imposibilă fără biosinteza și biodegradarea continuă a matricei extracelulare. La toate etapele de ontogeneză, aceste fenomene biologice se pot urmări în țesutul conjunctiv, care constituie peste 50% din masa corporală și, în particular, se referă la componentul principal al matricei extracelulare – colagenul, care constituie peste 30% din cantitatea totală de proteine ale organismului. A fost demonstrat faptul, că colagenul majorității țesuturilor conjunctive prezintă subiectul unei remodelări și unui circuit metabolic continuu – fenomen, ce are loc atât în condiții fiziologice, cât și patologice [1, 2, 3], iar organismul în normă dispune de toate posibilitățile necesare pentru reglarea cantității și distribuției structurilor conjunctive proprii.

În condiții patologice, echilibrul între procesele de biosinteză și degradare a colagenului este dereglat și, în rezultatul proceselor inflamatorii și distrofice, manifestări ale celor mai diverse patologii, în majoritatea organelor și țesuturilor are loc dezvoltarea excesivă a țesutului conjunctiv (fibroză și scleroză).

În prezent, medicina nu dispune de mijloace radicale, care ar permite înlăturarea cauzelor, care provoacă maladii cronice, însoțite de sclerozarea țesuturilor. De aceea, un rol important în aprecierea eficacității metodelor contemporane de tratament îl are cunoașterea precisă a gradului de reversibilitate a modificărilor structurale, funcționale și biochimice din organe care, în mod obligatoriu, însoțesc maladiile cronice.

Cercetările în această direcție sunt deosebit de importante pentru soluționarea unor probleme imperative din domeniul maladiilor țesutului conjunctiv: afecțiuni reumatice, osteo- și artropatii, regresia modificărilor inflamatorii cronice și a celor sclerotice, cicatrizarea plăgilor, formarea cheloizilor, aderențelor ș.a.

Pentru studierea proceselor de degradare a colagenului în condiții patologice pot fi folosite cu succes modelele experimentale ale cirozei hepatice, în care procesele par a fi reversibile, așa cum este intoxicația cronică cu CCl<sub>4</sub>, hidrazină, aminoazocompuși și cu alte noxe hepatotrope, precum și ligaturarea ducturilor biliare, dieta cu 4 741 001 deficiență de colină ș.a. În fiecare din aceste modele, discontinuitatea agentului cirozogen este urmată de o perioadă de reparație a

ficatului, inclusiv de dispariția completă, sau aproape completă a țesutului fibros format excesiv [4, 5, 6]. Revenirea la structura aparent normală a ficatului este, în anumite condiții experimentale, impresionantă, cu dispariția totală a excesului de țesut conjunctiv. Posibilitatea reversibilității leziunilor de fibroză hepatică prezintă un interes deosebit pentru clinică prin implicațiile sale prognostice și terapeutice.

Reversibilitatea modificărilor sclerotice este determinată preponderent de posibilitățile degradării țesutului conjunctiv și, în special, a collagenului. Numeroase investigații histologice, histochemice, electron-microscopice și biochimice au reușit să demonstreze că fibroza ficatului poate fi supusă unei regresii, care în anumite condiții experimentale este impresionantă, fiind observată dispariția aproape completă a excesului de collagen [1]. Însă, majoritatea detaliilor mecanismelor resorbției collagenului *in vivo* nu sunt cunoscute.

Datele experimentale sugerează, că reducerea excesului de collagen se realizează printr-un proces de resorbție activă și nu apare doar ca rezultat al sistării neoformației fibrilare. Afectarea mecanismelor de degradare a țesutului conjunctiv este considerată de cercetători una din cauzele principale ale ireversibilității cirozei hepatice.

O importanță primordială în resorbția țesutului fibros este atribuită enzimelor lizozomale. Enzime-cheie în biodegradarea matricei extracelulare și, în special, a collagenului sunt considerate a fi metaloproteinaze ale matricei (MMPs; numite de asemenea, collagenaze sau matrixine) [7, 8, 9, 10], membri ai unei familii mai mari, în componența căreia în prezent sunt incluse cel puțin 26 de enzime [8, 11, 12]. Proprietatea comună a tuturor collagenazelor se rezumă la activizarea lor pregnantă în mediile cu pH-ul de 7,0-9,0 și, deseori, în lipsa acumulării sale în celula sintetizantă. Collagenazele sunt metaloenzime Zn-dependente, care scindează în mod unic collagenii interstițiali prin atacul la un singur situs din cadrul structurii helicale native, situat la 3/4 distanță de capătul -NH<sub>2</sub> terminal al lanțului 1 între Gly775/Ile776 [13, 14, 15], rezultând 2 fragmente helicale, ce reprezintă 3/4 și, respectiv, 1/4 din lungimea fibrei inițiale. Producții de clivare se denaturează spontan la 37°C, devenind susceptibile la proteinazele nespecifice cu activitate gelatinolitică din țesutul conjunctiv [16]. S-a demonstrat că collagenaza posedă afinitate față de suprafața fibrelor de collagen [17].

Studiile recente au reușit să deceleze în ficatul în normă expresia collagenazei interstițiale, a stromelizinei-1 și -3, a 72 kDa- și 95 kDa-collagenazei tip IV. Producții principali ai metaloproteinazelor în ficat sunt considerate celulele Kupffer, unde collagenaza a fost depistată în formă activă în lizozomi [18]. Lipocitele (celulele Ito) sintetizează 72 kDa-collagenaza și, conform datelor preliminare, stromelizina [19]. Collagenaza activă a fost depistată, de asemenea, extracelular pe microvilozitățile hepatocitelor [18]. În fibroză, sursa collagenazei hepatice, pe lângă celulele Kupffer, o constituie fibroblastele, celulele Ito activate spre un fenotip miofibroblastic [20, 21, 22], hepatocitele [23].

În experiențele *in vitro* a fost găsită o activitate minimală a collagenazei în ficatul normal al șobolanilor, majorarea ei

evidentă în fibroza experimentală indusă de CCl<sub>4</sub> și scăderea ei în caz de ciroză avansată sau ireversibilă [5]. Aceste date biochimice corelează cu cercetările imunohistochemice ale collagenazei în ficatul cirozat [24], unde collagenaza a fost legată cu collagenul septal nou format în stadiul precoce sau reversibil al cirozei și era absentă în stadiul tardiv sau ireversibil al maladiei.

În caz de ciroză experimentală reversibilă, sporirea activității collagenazice se observă mai timpuriu decât majorarea activității enzimelor lizozomale. Aceasta le-a permis autorilor să presupună că collagenaza inițiază disocierea collagenului intact în spațiul extracelular, după ce produsele reacției se denaturează la temperatura corpului, iar enzimele lizozomice sunt responsabile de degradarea ulterioară [25].

Astfel, ireversibilitatea cirozei poate fi asociată cu dereglarea mecanismelor de degradare a collagenului, care poate consta în insuficiența activității collagenazei, schimbarea sensibilității sale față de substrat, sau în combinația ambilor factori.

Examinând starea de ansamblu a acestei probleme, se poate remarca, că aspectele structurale și biochimice ale proceselor de catabolizare a collagenului, în cadru normal și pe fond de patologie, au fost cercetate insuficient. Este puțin cunoscut rolul diferitor elemente celulare în resorbția collagenului, la proporționarea collagenolizei intra- și extracelulare, la aspectele ultrastructurale ale resorbției collagenului. Rămân incerte sau contrariate și alte aspecte principiale ale acestei probleme.

**Scopul investigațiilor** constă în studierea unor particularități de implicare a collagenazei în biodegradarea collagenului în ficat în procesul de regresie a cirozei hepatice experimentale.

### Material și metode

Experiențele s-au efectuat pe șobolani albi, masculi cu masa de 160-250 g. Ciroza hepatică a fost provocată la animalele de laborator prin metoda clasică de injecții subcutanate bisăptămânale a soluției de 50% de tetraclorură de carbon (CCl<sub>4</sub>) în ulei de măsline, în doză de 0,3 ml la 100 g a masei corporale, în decurs de 13 săptămâni [26].

Prelevarea materialului investigațional se efectua la etapa dezvoltării maxime a cirozei hepatice și pe parcursul a două luni de regresie a cirozei (7, 14, 21, 30, 45 și 60 de zile după ultima injecție a noxei hepatotrope) după sacrificarea animalelor prin decapitare. Lotul martor a inclus 10 animale sănătoase. În calitate de material investigațional se preleva o porțiune din centrul lobului drept al ficatului animalelor experimentale.

Pentru investigații s-au utilizat metode histologice, electron-histochemică și biochimice de explorare.

Prin *metodele histologice* s-au examinat prelevatele din ficatul a 60 de animale. Materialul se fixa în formalină neutrală de 10%, cu includerea ulterioară în parafină. Secțiunile histologice au fost colorate cu hematoxilina-eozină și cu picrofulxină după Van Gieson.

Investigațiile biochimice s-au produs în omogenat de țesut hepatic.

Pentru determinarea cantitativă a collagenului în uter s-a

utilizat procedeul de determinare a hidroxiprolinei (HYP) – aminoacidului specific, în exclusivitate, a moleculei de collagen, bazat pe proprietatea hidroxiprolinei de a se oxida în pirol sub acțiunea cloraminei B, produsele oxidării condensându-se în mediul acid cu p-dimetilaminobenzaldehidă cu formarea unui compus colorat. Intensitatea colorației este direct proporțională cu cantitatea de hidroxiprolină și se estimează fotometric [27].

Activitatea collagenazei a fost determinată *biochimic* în omogenat de țesut, metoda având la bază principiul descris de Smith și van Frank [28] cu folosirea în calitate de substrat Z-Pro-Ala-Gly-Pro-4MbNA (“BACHEM”) și agentului de azocoplare Fast Blue B (FBB).

Prin *metoda electron-histochimică* s-au examinat prelevatele din ficatul a 18 animale, la termenul de 7 și 30 de zile de regresie a cirozei și a 3 masculi sănătoși. Materialul a fost supus prelucrării histochimice pentru determinarea activității collagenazei la nivel ultrastructural în conformitate cu procedura descrisă de Smith și van Frank [28] cu folosirea în calitate de substrat Z-Pro-Ala-Gly-Pro-4MbNA (“BACHEM”).

### Rezultate și discuții

La *examinarea histologică* a probelor de ficat, colectate la etapa de dezvoltare maximă a cirozei, se desemna o modificare pronunțată a structurii lobulare a ficatului. Lobulii erau penetrați de septuri de țesut conjunctiv, constituite cu precădere din fascicule mature de collagen, fibrocite și fibroblaste. Se depistau nodulii regenerativi de mărimi diferite. Țesutul conjunctiv forma preponderent septuri perilobulare. În hepatocitele pseudolobulilor se observau diverse modificări – de la distrofie granulară până la distrofie hidropică (vacuolară) și necroză de colicvație (umedă).

Analiza microscopică a structurii ficatului după 14 zile demonstrează clar nu numai stoparea procesului de fibrozare, dar și diminuarea lui cu manifestări proliferative din partea parenchimului. Septurile perilobulare de țesut conjunctiv apar mai subțiri și cu infiltrație limfo-histiocitară moderată. După 30 de zile în mostrele de ficat se relevă septuri și mai subțiri, constituite din fascicule de fibre collagenice, izolat însoțite de celule mononucleare și histiocite. La această etapă, a regresiei cirozei se restabilește structura obișnuită a lobulului hepatic, proprie ficatului neafectat. Hepatocitele sunt hipertrofiat, manifestă un polimorfism exprimat, demonstrând regenerarea parenchimului, ceea ce se confirmă prin prezența celulelor aflate în proces de diviziune.

La termenul de 2 luni de regresie a cirozei, se observă normalizarea structurii ficatului. Izolat se mențin fascicule subțiri de collagen. Se observă formarea structurii trabeculare a ficatului și lipsa infiltratului inflamator.

Astfel, în perioada de regresie a cirozei hepatice experimentale în ficat derulează un proces intens de regenerare a hepatocitelor și subțiere marcantă a straturilor de collagen, maximal exprimat în decursul primei luni după sistarea intoxicației cirozogene, ceea ce denotă derularea, în acest interval de timp, a unui proces de catabolizare collagenică de o intensitate fascinantă. Structura ficatului revine la normal după circa 2 luni de regresie a cirozei hepatice experimentale.

Rezultatele *determinării conținutului de hidroxiprolină* în ficat confirmă și precizează rezultatele examenului histologic. Gradul de avansare a procesului patologic în ficat a fost caracterizat de acumularea unei cantități de collagen, care aproape de trei ori a depășit conținutul macromoleculei în normă (fig. 1).

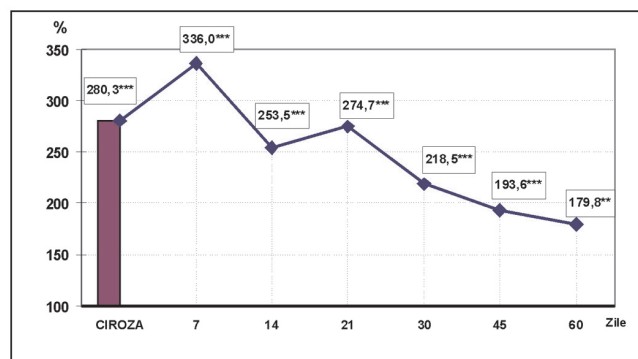


Fig. 1. Modificările conținutului de hidroxiprolină în ficat în procesul de regresie a cirozei hepatice experimentale.

**Notă:** axa absciselor – termenii regresiei (zile); axa ordonatelor – conținutul hidroxiprolinei (în %); 100% – nivelul lotului martor.

În pofida încetării injectărilor noxei hepatotrope cantitatea de hidroxiprolină tisulară continuă, totuși, să sporească și către termenul de 7 zile de regresie înregistrează maximumul concentrației sale în ficat – 336%,  $p < 0,001$ . În continuare, urmărim reducerea conținutului HYP în ficat, care la 14 zile de regresie se reduce cu aproape 30%, comparativ cu cantitatea existentă la termenul precedent. Însă, această reducere nu continuă și pe parcursul săptămânii următoare a perioadei supravegheate și la termenul de 21 de zile de regresie fixăm o cantitate a aminoacidului, care constituie 274,7% ( $p < 0,001$ ) din nivelul referențial și nu se deosebește concludent de indicii termenului anterior. Micșorarea semnificativă a cantității de hidroxiprolină în ficat se observă la 30 de zile și 45 de zile de la abolirea intoxicațiilor, iar investigația efectuată la 60 de zile de regresie denotă reducerea mai mult de două ori a conținutului de hidroxiprolină hepatică, comparativ cu indicii maximali, înregistrați la 7 zile post-cirozice.

Astfel, determinările biochimice denotă micșorarea treptată a conținutului de hidroxiprolină tisulară în ficat în decursul primelor patru săptămâni după sistarea injectărilor de  $\text{CCl}_4$ , iar investigațiile histologice ale ficatului animalelor experimentale relevă o subțiere marcantă a septurilor fibroase (aproximativ de două ori), ceea ce denotă derularea în acest interval de timp a unui proces intens de catabolizare collagenică. Procesul se finalizează, în principal, după două luni de la încetarea acțiunii factorului cirozogen.

*Dinamica activității collagenazei în ficat în procesul de regresie a cirozei hepatice experimentale.* În experiențele noastre, activitatea collagenazei în ficat la dezvoltarea maximă a cirozei s-a dovedit a fi scăzută esențial, comparativ cu valorile înregistrate în lotul martor – cu 21% ( $p < 0,001$ ) (fig. 2). Activitatea enzimei în perioada de regresie a cirozei se modifică în dependență de timpul trecut după încetarea intoxicației cirozogene, înregistrând maximele sale după 7 și 30

de zile, când se dovedește a fi mai activă decât în lotul martor cu 15% ( $p < 0,01$ ) și 17% ( $p < 0,01$ ), respectiv. La 14 și 21 de zile, activitatea collagenazei suferă o diminuare temporară cu 13% ( $p < 0,01$ ) și 11% ( $p < 0,01$ ), în comparație cu lotul martor. Activitatea collagenazei se apropie de valorile normale după 45-60 de zile de regresie a cirozei.

În studiul nostru, asupra procesului de regresie a cirozei hepatice am remarcat o interdependență strânsă între modificările conținutului de collagen și activității collagenazei în ficat. Astfel, în ciroza hepatică, când cantitatea de collagen în ficat atinge cote maxime, observăm și o diminuare esențială a activității collagenazei.

În perioada care urmează imediat după încetarea injecțiilor de  $\text{CCl}_4$  (după 7 zile de la sistarea intoxicației), efectul nociv al toxinei se menține, sinteza collagenică prevalând asupra scindării sale. Acest fapt se confirmă prin determinarea unei cantități și mai importante de hidroxiprolină, care depășește nivelul înregistrat la etapa precedentă. Dar simultan remarcăm și sporirea activității collagenazei, care își atinge primul maxim de activitate.

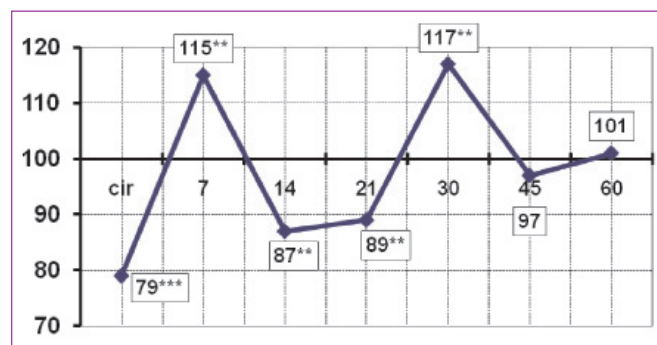


Fig. 2. Modificarea activității collagenazei (%) în ficat, în procesul de regresie a cirozei hepatice experimentale.

Notă: axa absciselor – termenii regresiei (zile); axa ordonatelor – activitatea collagenazei (în %); 100% - nivelul lotului martor.

Acestei amplificări a proprietăților collagenolitice ale ficatului și se datorează, probabil, micșorarea semnificativă a cantității de collagen hepatic, depistată la următorul termen investigațional (la 14 zile post-toxice). Amploarea proceselor collagenolitice, detectată în ficat la această etapă, este asigurată, probabil, de enzimele provenite din lizozomii celulelor mezenchimale, care există din abundență în țesutul conjunctiv dezvoltat excesiv.

Catabolizarea intensă a structurilor conjunctive se soldează, pe de o parte, cu reducerea importantă a cantității de collagen în ficat, iar pe de altă parte, se micșorează și numărul celulelor mezenchimale implicate în furnizarea collagenazei. Scăderea temporară a activității enzimei în perioada de 14-21 de zile de regresie se datorează, probabil, micșorării numărului de macrofage și fibroblaste, care are loc în această perioadă, precum și sintezei enzimatice insuficiente în puținele celule parenchimale neafectate, existente la această etapă în țesutul hepatic.

Cele menționate explică stagnarea relativă a procesului de resorbție a matricei extracelulare, între 14 și 21 de zile de regresie, deduse pe baza determinărilor cantitative ale hidroxiprolinei hepatice.

Finalizarea formării sistemului lizozomal în hepatocitele noi, apărute în rezultatul proceselor proliferative din ficat, are loc numai după circa 20 de zile de regresie a cirozei ficatului [23], ceea ce se și manifestă prin sporirea activității collagenazei la 30 de zile după ultima injecție a noxei hepatotrope. Astfel, în ficat, după circa 30 de zile de regresie se produce o nouă amplificare a potențialului collagenolitic fapt, care se manifestă printr-o sporire a activității collagenazei și o micșorare semnificativă a cantității de hidroxiprolină în ficat la 30 de zile de la abolirea intoxicațiilor.

Este important faptul că în studiul nostru, asupra procesului de regresie a cirozei hepatice am remarcat două maxime în activitatea collagenazei. Prezența a două maxime pe curba dinamicii de activitate a collagenazei în ficat – la 7 și la 30 de zile de la sistarea intoxicației este, incontestabil, o manifestare a caracterului fazic al procesului studiat, precum și a implicării în procesele collagenolitice a sistemelor enzimatice lizozomice atât 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).

Detectarea electron-histochimică a activității collagenazei în ficat în normă și în procesul de regresie a cirozei hepatice experimentale. Produsul reacției la collagenază în ficatul normal a fost prezent, fie sub aspectul granulelor mărunte solitare, fie sub aspectul unor conglomerate mai mult sau mai puțin omogene de densitate diferită. O reacție intensă s-a remarcat în lizozomii celulelor Kupffer și în lizozomii celulelor endoteliale. Activitatea extracelulară a collagenazei a fost neînsemnată. Granule solitare ale produsului de reacție se detectau pe microviliile hepatocitelor în spațiile Disse și pe unele din puținele fibrile de collagen. Datele obținute denotă, că collagenaza în ficatul normal se localizează în lizozomii celulelor Kupffer și entodeliocitelor, precum și extracelular pe microvilozitățile hepatocitelor.

În ficatul afectat de ciroză, distingem activitate a collagenazei în vacuole și lizozomi ai macrofagelor și fibroblastelor.

Particularitatea pregnantă, pe care am urmărit-o în timpul examenelor electron-histochimice asupra ficatului în procesul de regresie a cirozei, este secreția collagenazei din hepatocite și elementele celulare ale țesutului conjunctiv spre spațiul intercelular. Despre aceasta mărturisesc cumulațiile de produs al reacției în spațiile intercelulare – pe citolemă și pe fibrilele de collagen adiacente. O reacție intensă la collagenază, în spațiile intercelulare, s-a putut urmări în ambele termene de cercetare.

Este important de remarcat, că termenele investigaționale (7 și 30 de zile de regresie) se deosebeau esențial prin ponderea elementelor celulare, care secretau enzima spre spațiul extracelular. Astfel, la termenul de 7 zile de regresie, practic, toată collagenaza extracelulară era secretată de celulele septurilor fibroase (macrofage și fibroblaste), prezente în număr mare datorită cantității excesive de țesut conjunctiv în ficatul afectat de ciroză. Secreția enzimei de către hepatocite era neînsemnată.

La termenul de 30 de zile de regresie, produsul de reacție la collagenază, din contra, se evidențiază preponderent în preajma hepatocitelor. Cantități considerabile de produs al reacției sub formă de granule solitare sau de conglomerate

granulare, mai mult sau mai puțin omogene, se detectau dispuse pe citolema hepatocitelor, pe fibrilele de collagen adiacente sau în profunzimea straturilor fibrotic. Elementele celulare conjunctive, numărul cărora s-a redus considerabil odată cu subțierea straturilor de țesut conjunctiv, secretau enzimă activă în cantități mult mai mici.

La ambele termene de cercetare, pe lângă secreția collagenazei în spațiul extracelular, are loc fagocitarea și liza intracelulară a collagenului de către macrofage și fibroblaste.

Un fapt de importanță majoră, devenit posibil grație investigațiilor noastre electron-histochemice, este revelarea activității extracelulare a collagenazei, depistată la ambele etape de regresie cercetate. Despre aceasta mărturisesc aglomerațiile de produs al reacției în spațiile intercelulare, dispuse imediat pe citolemă și pe fibrilele collagenice adiacente. Am urmărit același tablou în ambele termene de explorare. Collagenaza este secretată spre spațiile extracelulare de macrofage și fibroblaste (preponderent la etapa inițială a regresiei cirozei), precum și de hepatocite (la etapa mai avansată a regresiei).

Rezultatele sugerează că în perioada de regresie a cirozei hepatice experimentale, collagenaza activă se află mai ales extracelular. Există două perioade de augmentare a activității collagenolitice în ficat – la 7 și 30 de zile după întreruperea intoxicației cu  $CCl_4$ . Aceasta înseamnă că inițierea degradării collagenului în ficat are loc cel puțin de două ori, în dependență, probabil, de cantitatea și activitatea diferitor tipuri de celule hepatice.

### Concluzii

În perioada de regresie a cirozei hepatice experimentale în ficat derulează un proces intens de regenerare a hepatocitelor și subțiere marcantă a straturilor de collagen, are loc micșorarea treptată și fazică a conținutului de hidroxiprolină, maximal exprimată în decursul primei luni după sistarea intoxicației cirozogene, ceea ce denotă derularea în acest interval de timp a unui proces de catabolizare collagenică de o intensitate fascinantă. Structura ficatului revine la normal după circa 2 luni de regresie a cirozei hepatice experimentale.

În ciroza hepatică are loc diminuarea activității collagenazei în ficat, iar în perioada de regresie a cirozei se evidențiază două faze de majorare semnificativă a activității collagenolitice – la 7 și 30 de zile după sistarea intoxicației cirozogene. Se observă o corelație strânsă între dinamica de activitate a collagenazei și modificările nivelului de hidroxiprolină tisulară. Aceste date atestă faptul implicării directe a enzimei în degradarea collagenului în ficat.

În procesul de regresie a cirozei, collagenaza este secretată de către hepatocite, macrofage și fibroblaste spre spațiul extracelular pentru a participa nemijlocit în degradarea extracelulară a collagenului. La termenul de 7 zile de regresie aproape toată collagenaza extracelulară este secretată de către macrofage și fibroblaste, iar la termenul de 30 de zile de regresie collagenaza este secretată preponderent de către hepatocite. La ambele termene de cercetare, pe lângă degradarea extracelulară, are loc fagocitarea și liza intracelulară a collagenului de către macrofage și fibroblaste.

### References

1. Benyon RC, Iredale JP. Is liver fibrosis reversible? *Gut*. 2000;46:443-446.
2. Everts V. Phagocytosis and intracellular digestion of collagen, its role in turnover and remodeling. *Histochemical Journal*. 1996;28(4):229-245.
3. Fallowfield J, Hayes P. Pathogenesis and treatment of hepatic fibrosis: is cirrhosis reversible? *Clin Med*. 2011;11(2):179-83.
4. Cameron G, Karunaratne W. Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration. *J. Pat. Bact.* 1936;42(1):1-21.
5. Okazaki I, Maruyama K. Collagenase activity in experimental hepatic fibrosis. *Nature*. 1974;252(202):49-50.
6. Perez-Tamayo R. Cirrhosis of the liver: a reversible disease? *Pathol. Ann.* 1979;14:183-213.
7. Borkakoti N. Matrix metalloproteinases: variation on a theme. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*. 1998;70(1):73-94.
8. Amalinei C, Caruntu ID, Balan RA. Biology of metalloproteinases. *Rom J Morphol Embryol*. 2007;48(4):323-334.
9. Alwayn I. A critical role for matrix metalloproteinases in liver regeneration. *J Surg Res*. 2008;145(2):192-8.
10. Chakraborti S. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem*. 2003;253(1-2):269-85.
11. Cîmpean A, Caloianu M. Metalloproteinaze cu rol în biodegradarea collagenilor. *Progrese în științe biologice*. 1996;1(1):96-105.
12. Reynolds JJ. Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. *Oral Disease*. 1996;2(1):70-76.
13. Aimes R, Quigley J. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(11):5872-5876.
14. Fields G. A model for interstitial collagen catabolism by mammalian collagenases. *Journal of Theoretical Biology*. 1991;153(4):585-602.
15. Krane S. Is collagenase (matrix metalloproteinase -1) necessary for bone and other connective tissue remodeling? *Clinical Orthopedics Related Research*. 1995;313:47-53.
16. Sires U. Complete degradation of type X collagen requires the combined action of interstitial collagenase and osteoclast-derived cathepsin B. *Journal of Clinical Investigation*. 1995;95(5):2089-2095.
17. Shingleton W. Collagenase: a key enzyme in collagen turnover. *Biochemistry & Cell Biology*. 1996;74(6):759-775.
18. Ryvnyak VV, Gudumak VS, Onya ES. Elektronno-gistokhimicheskaya lokalizatsiya kollagenazy v pecheni [Electronical and histochemical localization of collagenase in liver] *Biulleten experimentalnoy biologii i meditsiny [Bulletin of experimental biology and medicine]*. 1995;1:22-26.
19. Arthur M. Matrix degradation in the liver. Fat Storing Cells and Liver Fibrosis (Falk Symposium nr. 71). 1993;18.
20. Arthur M. Collagenases and liver fibrosis. *Journal of Hepatology*. 1995;22(2 Suppl):43-48.
21. Arthur M. Role of the cells in the degradation of matrix in liver. *Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 1995;10(Suppl 1):57-62.
22. Iredale J. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1997;29(1):43-54.
23. Montfort I. Collagenase of hepatocytes and sinusoidal liver cells in the reversibility of experimental cirrhosis of the liver. *Virchows Archiv B Cell Pathology*. 1990;59(5):281-289.
24. Fukuda Y, Imoto M, Koyama Y, et al. Immunohistochemical study on tissue inhibitors of metalloproteinases in normal and pathological human livers. *Gastroenterologia Japonica*. 1991;26(1):37-41.
25. Madala S. Matrix metalloproteinase 12-deficiency augments extracellular matrix degrading metalloproteinases and attenuates IL-13-dependent fibrosis. *J Immunol*. 2010;184(7):3955-63.
26. Paquet KJ, Kamphausen U. The carbon tetrachloride hepatotoxicity as a model of liver damage. First report. Long-time biochemical changes. *Acta hepato-gastro-enter*. 1975;22(2):84-88.
27. Sharaev PN. Metod opredeleniya svobodnogo i svyazannogo oksiprolina v syvortke krovi [The method of determination of free and conjugated hydroxyproline in the blood serum] *Lab. Delo*. 1981;5:283-285.
28. Smith RE, Van Frank RM. The use of amino acid derivatives of 4-methoxy-B-naphthylamine for the assay and subcellular localization of tissue proteinases. In: *Lysosomes in Biology and Pathology*. New York, 1975;123-249.