

5. Iurgens G., Chen Q., Esterbauer H. et al. Immunostaining of human autopsy aortas with antibodies to modified apolipoprotein B and apolipoprotein (a) // *Arterioscler. Thromb.* -1993.-Vol.13.- P. 1689-1699.
6. Steinberg D. Lipoprotein modification and atherogenesis // *Atheroscler. Rev.* -1991.-Vol. 23.- P. 115-121.
7. Stemme S., Hansson G. K. Immune mechanisms in atherogenesis // *Ann. Med.*- 1994.- Vol.26. – P. 141-146.
8. Wick G., Xu Q. Atherosclerosis - an autoimmune disease // *Exp. Gerontology* -1999.-Vol. 34. – P. 559 – 566.
9. Зота Е. Г. Некоторые аспекты патогенеза атеросклероза // *Вестник АНМ* 2(2)-2005. С. 37-43.
10. Зота Е. Г. Pathology of arterial wall, immunoinflammation and atherosclerosis. // *The journal of coronary artery disease prevention.* Istanbul, Turkey. October 29 - November 1, 2005, С. 28
11. Нагорнев В. А., Анестиади В. Х., Зота Е. Г. Атерогенез. Кишинев-С.-Петербург, 2001. С. 330.
12. Nagornev V., Zota I. Aterogeneza (cu aspecte celulo-moleculare). Editoria Lumina. Chisinau, 1994. P. 191.
13. Нагорнев В. А., Анестиади В. Х., Зота Е. Г. Атерогенез и иммунное воспаление. Firma Editorial-Poligrafica “ Tipografia centrală”, 1997. С. 224
14. Melnic E. Particularitățile inflamației acute în aterogeneză. Teza de doctor în științe. 2003

**LOCALIZAREA ELECTRON-HISTOCHEMICĂ A COLAGENAZEI ÎN FICAT**  
**Victor Rîvneac, Valentin Gudumac, Elena Rîvneac, Ruslan Pretula, Ecaterina Grecikina**  
 Laboratorul Morfologie USMF “N. Testemițanu”

**Summary**

**Electron-histochemical localization of the collagenase in liver**

The localization of collagenase in the normal rat liver was investigated electron-histochemically. The results suggest that the active collagenase is localized in the lysosomes of Kupffer cells and endotheliocytes, as well as extra cellular on the hepatocytes microvillus.

**Rezumat**

Electron-histochimic a fost determinată localizarea colagenazei în ficatul de șobolan în normă. Datele obținute denotă, că colagenaza în formă activă se localizează în lizozomii celulelor Kupffer și endotelocitelor, precum și extracelular pe microvilozitățile hepatocitelor.

Colagenaza este considerată enzimă-cheie în metabolismul colagenului. Colagenazele tisulare sunt enzime Zn-dependente, care scindează diferite tipuri de colagen interstițial [1,5]. Studiarea metaloproteinazelor este însoțită de un șir de dificultăți. În special, un impediment important în determinarea activității acestor enzime este faptul, că colagenazele nu se acumulează în celule, ci se sintetizează pe măsura necesității. Astfel, de regulă în celule și țesuturi se detectează o cantitate infimă de enzimă. Din această cauză majoritatea lucrărilor dedicate studierii colagenazei sunt executate *in vitro*. Este foarte complicată și detectarea morfologică a localizării enzimei.

În ficat colagenaza poate să se afle în două stări: activă și latentă (în formă de proenzimă) [1,6,12]. Proenzima poate fi activată de către tripsină, plasmină și calicreină [2], precum și de catepsinele G și B [3]. Deoarece în normă colagenaza se află, de regulă, în stare latentă, vizualizarea ei este posibilă doar prin aplicarea metodelor imunomorfologice. În ficat activitatea colagenazei pentru prima dată a fost determinată biochimic de către Okazaki și Maruyama în

anul 1974 [10], iar apoi și de alți cercetători [9,11,13]. Se consideră, că în ficat colagenaza este sintetizată în celulele Kupffer [4]. În aceste celule enzima a fost depistată în formă activă. De asemenea, a fost demonstrat, că în ficat există două tipuri de colagenază, sursa uneia fiind hepatocitele, iar alteia celulele sinusoide [8]. Însă, toate aceste cercetări biochimice nu ne ajută să stabilim localizarea intracelulară a enzimei în ficat. În unica lucrare morfologică consacrată studierii colagenazei și executată la nivel de microscopie fonică, imunohistochimic a fost arătat, că în ficat enzima se localizează extracelular și este atașată de fibrilele de colagen și membranele bazale [7].

**Scopul** prezentului studiu constituie determinarea surselor celulare și localizării ultrastructurale a colagenazei în stare activă în ficatul de șobolan în normă.

#### **Metoda de cercetare**

În calitate de material investigațional a servit ficatul de șobolani albi masculi cu masa de 180 - 200 g.

Materialul a fost supus prelucrării histochemice pentru determinarea activității colagenazei la nivel ultrastructural în conformitate cu procedura descrisă de Smith și van Frank [14] cu folosirea în calitate de substrat Z-Pro-Ala-Gly-Pro-4MβNA ("BACHEM"). Probele tisulare cu dimensiuni 0,5×0,5×1 mm se fixau timp de 3 ore în soluție-tampon cacodilat 0,05M, pH 7,2 cu 1,5% glutaraldehidă. Apoi probele se spălau în soluție-tampon cacodilat 0,05M, pH 7,2, ce conținea 7% zaharoză. După incubare cu substrat materialul se fixa cu tetraoxid de osmiu de 1,5% în tampon cacodilat (pH 7,2) în decurs de 90 min. În calitate de reacții de control s-a efectuat incubarea în mediu cu conținut de inhibitor al colagenazei –EDTA, precum și în mediu fără substrat. În manieră usuală pentru examenul de microscopie electronică materialul explorativ de dehidrata în alcool etilic de concentrații crescânde (30°, 70°, 96°, 100°), apoi curs de 20 min se întreținea în acetonă absolută. Probele se includeau în epon și se lăseau la 60° în termostat pentru 24 ore. Din blocurile obținute se preparau secțiuni ultrafine la ultramicrotomul U-7000. Secțiunile ultrafine nu au fost contrastate. Preparatele se studiau la microscopul electronic GEM-100S.

#### **Rezultatele cercetării**

Produsul reacției la colagenază se detecta sub formă de granule mărunte. O reacție extrem de intensă s-a remarcat în lizozomii celulelor Kupffer. Produsul reacției se depista și în lizozomii endoteliocitelor, însă gradul de activitate a enzimei în aceste celule era mai scăzut. În hepatocite, însă, produsul reacției nu a fost detectat. Totodată am remarcat și o activitate extracelulară neînsemnată a colagenazei. Produsul de reacție în formă de granule se detecta pe microviliile unor hepatocite în spațiile Disse. Mostrele de referință nu conțineau produsul reacției la colagenază nici intra-, nici extracelular.

Datele obținute denotă, că colagenaza în formă activă în ficat se localizează în lizozomii celulelor Kupffer și endoteliocitelor, precum și extracelular pe microvilozitățile hepatocitelor.

Nu este exclus, că activitatea înaltă a colagenazei, detectată în celulele Kupffer este determinată de funcția de bază a acestor celule – fagocitoza. Lipsa produsului reacției în hepatocite însoțită de prezența sa pe microvili denotă, probabil, că în aceste celule colagenaza se află în formă latentă și că hepatocitele o secretă în spațiul extracelular, unde ea este activată.

#### **Concluzii**

1. Intracelular colagenaza în formă activă în ficat se localizează în lizozomii celulelor Kupffer și endoteliocitelor.
2. Extracelular activitatea colagenazei se depistează pe microvilozitățile hepatocitelor.

#### **Bibliografie**

1. **Arthur M.** Collagenases and liver fibrosis. // J of Hepatology. - 1995. - Vol. 22. - P.43-48.
2. **Brinckerhoff C.** Autoregulation of collagenase production by a protein synthesized and secreted by synovial fibroblasts // Proc.Natl.Acad.Sci.USA. – 1985. – Vol.82. – P.1916-20.
3. **Eeckhout Y., Vaes G.** Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagen // Biochem. J. – 1977. – Vol. 166. – P. 21-31.

4. **Harris E., Cartright E.** Mammalian collagenases // Proteinases in Mammalian Cells and Tissues. - Amsterdam; New York; Oxford, 1977. - P.249-283.
5. **Harris E., Krane S.** Collagenases // New Engl.J.Med. - 1974. - Vol.291, N 1-2. - P.557-563.
6. **Maruyama K., Okazaki I., Kashiwazaki K. et al.** Different appearance of hepatic collagenase and lysosomal enzymes in recovery of experimental hepatic fibrosis // Bioch. Exp. Biol. - 1978. - Vol.14, N 3. - P.191-201.
7. **Montfort I., Perez-Tamayo R.** The distribution of collagenase in normal rat tissues // J.Histochem.Cytochem. - 1975.- Vol.23, N 12. - P.910-920.
8. **Montfort I., Perez-Tamayo R.** Collagenase of hepatocytes and sinusoidal liver cells in the reversibility of experimental cirrhosis of the liver. // Virchows Archiv.-1990. -N5-P.281-289.
9. **Murawaki Y., Yamada S., Koda M., Hirayama C.** Collagenase and collagenolytic cathepsin in normal and fibrotic rat liver. // J Biochem. - 1990. - Vol.108, N 2. - P.241-244.
10. **Okazaki I., Maruyama K.** Collagenase activity in experimental hepatic fibrosis // Nature. - 1974. - Vol.252, N 202. - P.49-50.
11. **Perez-Tamayo R., Montfort I., Gonzalez E.** Collagenolytic activity in experimental cirrhosis of the liver. // Exp Mol Pathol. - 1987. - Vol.47. - P.300-308.
12. **Reynolds J.J.** Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation // Oral Disease. - 1996. - Vol.2, N1. P.70-76.
13. **Shingleton W., Hodges D., Brick P., Cawston T.** Collagenase: a key enzyme in collagen turnover. // Biochemistry & Cell Biology. - 1996. - Vol.74, N 6. - P. 759-775.
14. **Smith R., van Frank R.** The use of amino acid derivatives of 4-methoxy- $\beta$ -naphthylamine for the assay and subcellular localization of tissue proteinases // Lysosomes in Biology and Pathology. - New York, 1975. - P. 123-249.

## **ROLUL COLAGENAZEI ÎN BIODEGRADAREA COLAGENULUI ÎN FICATUL NORMAL ȘI CIROZAT**

**Ruslan Pretula, Elena Rîvneac, Victor Rîvneac**  
Laboratorul Morfologie USMF "N. Testemițanu"

### **Summary**

#### **The role of the collagenase in collagen biodegradation in normal and cirrhotic liver**

The biodegradation of collagen is a process of a vital importance both in norm and in pathological conditions. The initial stage in the collagen degradation is an extracellular proteolytical process, started up by the collagenases – Zn-dependent metalloenzymes, that break up the collagen specifically. In normal liver the collagenase activity was determined in Kupffer cells. In experimental fibrosis an evident increase of its activity was observed in fibroblasts, Ito cells and hepatocytes. In advanced or irreversible liver cirrhosis the activity of the collagenase decreased. During the recovery from hepatic fibrosis an increase of collagenolytical activity and a decrease of collagen quantity were determined.

### **Rezumat**

Biodegradarea colagenului reprezintă un proces de importanță vitală atât în normă, cât și în diverse stări patologice. Etapa inițială în degradarea colagenului este un proces proteolitic extracelular, declanșat sub acțiunea colagenazelor – metaloenzimelor Zn-dependente, care clivează în mod specific molecula de colagen. În ficatul normal activitatea colagenazei a fost depistată în celulele Kupffer, s-a determinat majorarea ei evidentă în fibroza experimentală (sursele celulare fiind fibroblastele, celulele Ito, hepatocitele) și scăderea ei în caz de ciroză