

cu CH (în special, la administrarea PSS și CMJ-33), dar funcția enzimei nu s-a restabilit, menținându-se la valori sub nivelul lotului-martor ($p < 0,05$).

Cele relatate confirmă inducerea proceselor catabolice în ficat, realizată prin CBA autohtoni testați, însă acest efect este exprimat în mod specific, în funcție de gradul de angajare a enzimelor în procesele de degradare a țesutului conjunctiv.

Concluzii

1. Utilizarea CBA are un efect stimulator pronunțat asupra proceselor de hidroliză enzimatică a matricei extracelulare hepatice, contribuind la catabolizarea mai eficientă a țesutului fibros, fapt dovedit prin reducerea nivelului de acizi uronici.

2. Efectul de stimulare a proceselor litice din ficatul cirozat, realizat de CBA luați în studiu, este exprimat în mod specific și este dependent de gradul de angajare a enzimelor lizozomice implicate în procesele de degradare a țesutului conjunctiv.

Bibliografie

1. Barbă O. (red.), *Sănătatea publică în Moldova. Anul 2009*. Anuar statistic al MS RM. 332 p.
2. Benyon R.C., Iredale J.P., *Is liver fibrosis reversible?* Gut, 2000; 46:443-446.
3. Cesaretti M., Luppi E., Maccari F., Volpi N., *A 96-well assay for uronic acid carbazole reaction*. Carbohydr. Polym., 2003; 54(1):59-61.
4. Gudumac V., Tagadiuc O., Râvneac V. et al., *Investigații biochimice. Elaborare metodică. Micrometode*. Vol. II, Chișinău: Elena V.I. SRL, 2010. 104 p.
5. Gulea A., Poirier D., Pahonțu E., Țapcov V., Bejenari N., Roy J., *Inhibitori ai leucemiei mieloidă umane în baza compușilor coordinați ai cuprului(II) cu saliciliden-tiosemicarbazide*. Brevet de invenție MD 3890, 2009. BOPI, 2009; 4: 35.
6. Heidelberg J.J., Bruderly M., *Cirrhosis and Chronic Liver Failure: Part I. Diagnosis and Evaluation*. Am. Fam. Physician., 2006; 74(5):756-762.
7. Kim M.Y., Baik S.K., Jang Y.O. et al., *Serum hyaluronic acid level: correlation with quantitative measurement of hepatic fibrosis in a cirrhotic rat model*. Korean J. Hepatol., 2008; 14(2):159-167.
8. Paumgartner G., *Medical treatment of cholestatic liver diseases: From pathobiology to pharmacological targets*. World J. Gastroenterol., 2006; 12(28):4445-4451.
9. Povero D., Busletta C., Novo E., di Bonzo L.V., Cannito S., Paternostro C., Parola M., *Liver fibrosis: a dynamic and potentially reversible process*. Histol. Histopathol., 2010; 25(8):1075-1091.
10. Takashima M., Rippe R.A., *Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis*. J. Gastroenterol. Hepatol., 2007; 22(Suppl. 1):S79-84.
11. Tangkijvanich P., Yee H.F. Jr., *Cirrhosis – can we reverse hepatic fibrosis?* Eur. J. Surg. Suppl., 2002; 587:100-112.

Rezumat

Compușii biologici activi (CBA) cercetați exercită efect stimulator pronunțat asupra proceselor de hidroliză enzimatică a matricei extracelulare hepatice în ciroza hepatică (CH), contribuind la catabolizarea mai eficientă a țesutului fibros, fenomen probat de reducerea nivelului de acizi uronici. Stimularea proceselor litice în ficatul cirozat, realizată de CBA luați în studiu, este specifică și dependentă de gradul de angajare a enzimelor lizozomale implicate în procesele de degradare a țesutului conjunctiv.

Summary

The investigated biologically active compounds (BAC) exert a strong stimulating influence on the processes of enzymatic hydrolysis of the liver extracellular matrix in cirrhosis, which contributes to a more efficient catabolism of the connective tissue, confirmed by the decrease in the uronic acids level. The stimulation of the degradative processes in liver cirrhosis induced by the studied BAC is specific and depends on the degree of involvement of individual lysosomal enzymes in the degradation of the connective tissue.

Резюме

Исследованные биологически активные вещества (БАВ) оказывают сильное стимулирующее влияние на процессы ферментативного гидролиза внеклеточного матрикса печени при циррозе, что способствует более эффективному катаболизму соединительной ткани, подтвержденному снижением уровня уронических кислот. Стимуляция деградативных процессов в печени при циррозе печени, индуцированная изученными БАВ, является специфической и зависит от степени вовлечения индивидуальных лизосомальных ферментов, участвующих в распаде соединительной ткани.

PARTICIPAREA CATEPSINEI B LA BIODEGRADAREA COLAGENULUI ÎN PROCESUL DE REGRESIE A CIROZEI HEPATICE EXPERIMENTALE

Victor Râvneac, dr. hab. în medicină, prof. univ.;
Valentin Gudumac, dr. hab. în medicină,
 prof. univ.; **Elena Râvneac**, dr. în biologie,
 conf. univ.
 USMF „Nicolae Testemițanu”

Majoritatea afecțiunilor hepatice survenite în urma unor agresiuni cronice ale diversilor agenți patogeni (virali devine ireversibilă. Totuși, numeroase investigații histologice, histochimice, electron-microscopice și biochimice au reușit să demonstreze că modifică-

rile fibroase ale ţesutului hepatic, însoţite de o remodelare severă a structurii organului, pot fi supuse unei regresii cu revenirea la structura aparent normală a ficatului, care în anumite condiţii experimentale este impresionantă, fiind observată dispariţia totală a excesului de ţesut conjunctiv [1]. În urma acestor investigaţii, subiectul principal al cercetărilor în problema reversibilităţii cirozei hepatice a devenit mecanismul resorbţiei ţesutului fibros excesiv din ficat.

În prezent este general acceptat conceptul conform căruia etapa iniţială în degradarea matricei extracelulare este un proces proteolitic extracelular, care se poate solda cu scindarea colagenului, precum şi a glicoproteinelor şi proteoglicanilor asociaţi. Acest proces este declanşat prin acţiunea metaloproteinelor matriceale, sintetizate de celulele ţesutului conjunctiv şi eliberate în spaţiul extracelular, care pot degrada în mod sinergic toate macromoleculele majore ale matricei ţesutului conjunctiv [2, 3, 4]. Fragmentele generate prin aceste atacuri proteolitice pot fi degradate în continuare extracelular [5] sau fagocitate de către celulele locale şi supuse ulterior prelucrării intralizozomale [6].

Enzimelor proteolitice lizozomice li se atribuie o importanţă deosebită în resorbţia ţesutului fibros [2, 7], mediul de acţiune al său fiind atât cel extracelular, cât şi cel intracelular.

Se consideră că circa 90% din proteoliza intralizozomală se realizează datorită activităţii coerente a endopeptidazelor cisteinice – catepsinelor B, H şi L [8]. Aceste proteinaze manifestă *in vitro* o specificitate excepţională faţă de substraturile proteice, în general, şi faţă de colagen, în special. A fost demonstrată capacitatea catepsinelor B şi L de a degrada colagenul tip IV, implicându-se astfel în liza membranelor bazale [9]. Aceste proteinaze supun unei scindări hidrolitice şi așa componente ale matricei extracelulare cum sunt laminina şi fibronectina [9]. Interesul faţă de proteinazele cisteinice a crescut enorm după ce s-a demonstrat că catepsina B exercită funcţii reglatoare, se implică în activizarea postsintetică a precursorilor de hormoni peptidici şi enzime (în special, a colagenazei) [10].

Catepsina B manifestă activitate dipeptidilcarboxipeptidazică, endopeptidazică, carboxipeptidazică şi este aptă să destructureze componentele principale ale matricei intercelulare: colagenul, inclusiv cel insolubil, şi proteoglicanii, clivajul fiind realizat la valorile pH-ului de 4,0-6,0 [11, 12]. Ea atacă, de asemenea şi segmentul spiralat al moleculei de colagen, element prin care diferă de mecanismul de acţiune a colagenazei [13]. În ficat catepsina B este localizată în celulele Kupffer, celulele endoteliale şi în hepatocite [14, 15].

Totuşi, indiferent de faptul că pe mostre *in vitro* s-a evidenţiat proprietatea unor proteaze lizozomice de a solubiliza colagenul şi alte componente ale matricei intercelulare, includerea lor în procesele de catabolizare a ţesuturilor conjunctive *in vivo* nu s-a demonstrat şi, prin urmare, nu se poate cunoaşte cu siguranţă care ar fi catepsinele ce participă la degradarea colagenului în ficat *in vivo*.

Puţin numeroase s-au dovedit a fi şi investigaţiile privind participarea diferenţiată şi rolul catepsinelor lizozomice în degradarea colagenului în ficat, fapt ce ne-a determinat să realizăm un studiu al particularităţilor de implicare a catepsinei B în resorbţia ţesutului fibros în ficat în procesul de regresie a cirozei hepatice experimentale.

Scopul prezentului studiu l-a constituit determinarea activităţii proteinazei cisteinice – catepsinei B în ţesutul hepatic cirozat şi în procesul de regresie a cirozei hepatice experimentale; corelaţia activităţii enzimei menţionate cu nivelul hidroxiprolinei – aminoacidului specific în exclusivitate moleculei de colagen; relevarea surselor celulare ale catepsinei B în ficat şi studierea implicării catepsinei B în degradarea intra- şi/sau extracelulară a colagenului din ficat în procesul de regresie a cirozei experimentale.

Materiale şi metode

Fibroza hepatică a fost indusă animalelor de laborator (şobolani albi masculi) prin metoda clasică de injecţii subcutanante bisăptămânale ale soluţiei de 50% de tetraclorură de carbon (CCl_4) în ulei de măsline, în doză de 3,0 ml la kilocorp în decurs de 13 săptămâni. Materialului pentru investigaţii a fost prelevat la etapa dezvoltării maxime a cirozei hepatice şi pe parcursul primei luni a perioadei de regresie a cirozei (la 7, 14, 21, 30 de zile după ultima injecţie a noxei hepatotrope) şi după 2 luni de regresie.

Pentru investigaţii s-au utilizat metode histologice, electron-histochimice şi biochimice de explorare. Pentru cercetările histologice, mostrele de ţesut hepatic din lobulul drept al ficatului se fixau în formalină neutrală de 10% şi se colorau cu hematoxilină-eozină şi cu picrofuxină după Van-Ghizon. Investigaţiile biochimice s-au produs în omogenat de ţesut hepatic.

Procedeul de determinare a activităţii catepsinei B este bazat pe proprietatea enzimei de a hidroliza N, α -benzoil-D-L-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) la pH 6,0 cu formarea p-nitroanilinei, care are o coloraţie galbenă, intensitatea căreia se determină fotometric [11]. Activitatea enzimei se exprimă în nmol pe secundă la 1 gram de ţesut (nmol/s·g).

Procedeul de determinare a hidroxiprolinei (HYP) este bazat pe proprietatea cloraminei B de a oxida HYP şi pe condensarea ulterioară a produselor oxidării cu p-dimetilaminobenzaldehidă.

Detectarea electron-histochimică a activității catepsinei B a fost realizată în conformitate cu procedura descrisă de Smith și van Frank (1975). În calitate de substrat s-a utilizat Z-Ala-Arg-Arg-4MβNA (BACHEM). Prin metoda electron-histochimică s-au examinat prelevatele din ficatul a 25 de animale.

Rezultate și discuții

La examinarea histologică a probelor de țesut hepatic, 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 colagen, fibrocite și fibroblaste. Prelevatele din ficatul animalelor experimentale, sacrificate în decursul primelor patru săptămâni după sistarea injectărilor de CCl₄, demonstrează o subțiere marcantă a straturilor de colagen, ceea ce denotă derularea în acest interval de timp a unui proces de catabolizare colagenică de o intensitate fascinantă. Procesul se finaliza, în principal, după două luni de la încetarea acțiunii factorului cirogen.

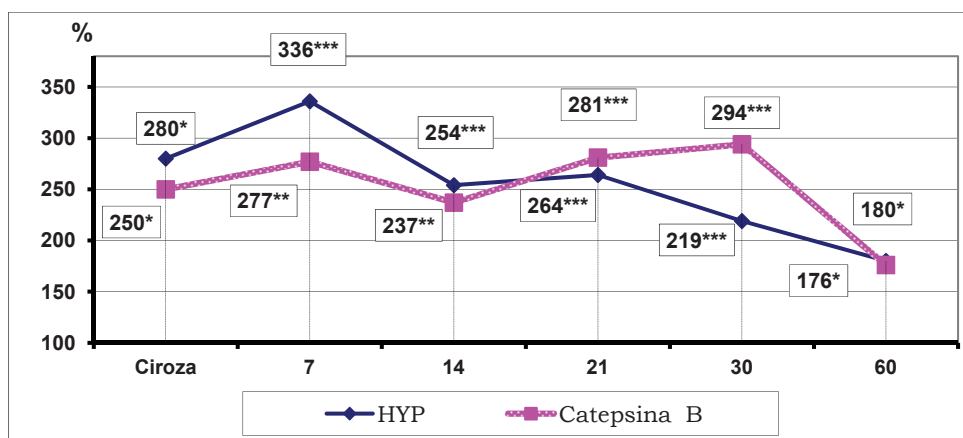
Observațiile efectuate în baza examenului histologic sunt confirmate și precizate de rezultatele determinării biochimice a conținutului de hidroxiprolină (HYP) în țesutul hepatic. Din figura 1 desprindem că intoxicația cronică cu CCl₄ s-a soldat cu sporirea cantității de hidroxiprolină în ficat și la etapa dezvoltării maxime a cirozei conținutul aminoacidului a constituit 280% (P<0,001), în comparație cu valorile specificate pentru ficatul neafectat. Astfel, gradul de avansare a procesului patologic din ficat, atins în experiențele noastre, a fost caracterizat de acumularea unei cantități de colagen care a depășit de aproape trei ori conținutul macromoleculi în normă. Conco-

mitent relevăm sporirea esențială a activității tisulare a proteinazei cisteinice studiate. Îndicii enzimooactivității catepsinei B în ficat la dezvoltarea maximă a cirozei depășesc valorile înregistrate în lotul-martor cu 150% (P<0,05) (figura 1).

În perioada ce urmează imediat după încetarea injectărilor de CCl₄ efectul nociv al toxinei, totuși, se menține, sinteza colagenică prevalând asupra scindării sale. Acest fapt se confirmă prin determinarea unei cantități și mai impresionante de hidroxiprolină, ce depășește nivelul înregistrat în ciroză și către termenul de 7 zile de regresie înregistrează maximumul concentrației sale în țesutul hepatic – 336% (P<0,001).

Simultan remarcăm și sporirea activității catepsinei investigate. Astfel, la 7 zile de regresie nivelul funcțional al catepsinei B ajunge să depășească cu 177% (P<0,01) nivelul de referință. Acestei amplificări pregnante a proprietăților hidrolitice ale țesutului hepatic și se datorează, probabil, micșorarea semnificativă a cantității de colagen hepatic, depistată la următorul termen de investigație. Astfel, la 14 zile de regresie conținutul de HYP în ficat își pierde 25% (P<0,01) din valorile specificate la termenul precedent. Amploarea proceselor hidrolitice, detectată în ficat la această etapă, este asigurată, probabil, de enzimele provenite din lizozomii celulelor mezenchimale, care există din abundență în tesutul conjunctiv dezvoltat excesiv.

Catabolizarea intensă a structurilor conjunctive se soldează, pe de o parte, cu reducerea importantă a cantității de țesut fibros în ficat, iar pe de altă parte, se micșorează numărul celulelor mezenchimale implicate în furnizarea enzimelor fibrolitice. Totuși, micșorarea numărului de macrofagi, fibroblaste și a altor



Figură 1. Dinamica modificării conținutului de hidroxiprolină (HYP) și activității catepsinei B în ficat în procesul de regresie a cirozei hepatice experimentale.

Notă: axa absciselor – termenele regresiei (zile); axa ordonatelor – conținutul de HYP și activitatea enzimei (în %); 100% – nivelul lotului-martor;

* – diferență statistic semnificativă cu lotul-martor, P<0,05;

** – P<0,01; *** – P<0,001.

celule ale ţesutului conjunctiv, care are loc în această perioadă, nu influenţează esenţial activitatea tisulară a catepsinei B şi enzima reuşeşte să-şi menţină funcţionalitatea la un nivel destul de înalt, fapt ce presupune implicaţii importante ale catepsinei studiate în procesele derulate în ficat în perioada dată.

În intervalul dintre 14 şi 21 de zile de regresie, are loc o stagnare relativă a procesului de resorbţie a matricei extracelulare, deduse pe baza determinărilor cantitative ale hidroxiprolinei hepatice. Astfel, la termenul de 21 de zile de regresie fixăm o cantitate a aminoacidului care nu se deosebeşte concludent de indicii termenului anterior. Probabil, celulele neafectate existente la această etapă în ţesutul hepatic nu asigură o sinteză enzimatică suficientă şi, respectiv, nu menţin intensitatea proceselor degradatoare la nivelul necesar pentru solubilizarea vizibilă a ţesutului conjunctiv.

Finisarea formării sistemului lizozomal în hepatocitele noi, apărute în rezultatul proceselor proliferative din ţesutul hepatic, are loc numai după circa 3 săptămâni de regresie a cirozei ficatului, ceea ce şi se manifestă prin sporirea continuă a activităţii catepsinei B, care la termenul de 30 de zile după ultima injecţie a noxei hepatotrope îşi atinge maximumul de activitate – 294% ($P < 0,001$). Astfel, în ţesutul hepatic se produce o nouă amplificare a potenţialului hidrolitic, fapt ce se manifestă printr-o micşorare semnificativă a cantităţii de hidroxiprolină în ficat la 30 zile de la abolirea intoxicaţiilor, iar investigaţia efectuată la 60 de zile de regresie denotă reducerea de două ori a conţinutului de hidroxiprolină hepatică, comparativ cu indicii maximali înregistraţi la 7 zile postcrotice.

Dinamica de activitate a enzimei cercetate manifestă un caracter fazic, determinat de implicarea în procesele fibrolitice atât a sistemelor enzimatiche lizozomice ale elementelor celulare ale ţesutului conjunctiv (mai ales la etapele iniţiale), cât şi ale hepatocitelor (cu precădere la etapele mai avansate ale procesului de regresie a cirozei).

Pentru a verifica matematic relaţiile funcţionale ale enzimei cu resorbţia colagenului în ficat, s-a realizat analiza corelaţională, care a relevat un grad înalt de corelaţie pozitivă între dinamica de activitate a enzimei investigate – catepsinei B – cu modificările nivelului de hidroxiprolină tisulară. Aceste date atestă faptul implicării directe a enzimei date în degradarea ţesutului conjunctiv din ficat.

Detectarea electron-histochimică a activităţii catepsinei B în ficat în procesul de regresie a cirozei.

Până în prezent, localizarea activităţii catepsinei B în ficat nu a fost determinată. În lucrarea dată, cu scopul de a elucida participarea catepsinei B în procesele de resorbţie a ţesutului conjunctiv în ficat, am realizat

investigarea histochimică la nivel ultrastructural a distribuţiei catepsinei B în ficatul normal şi la anumite etape de regresie a cirozei. Am studiat distribuirea enzimei în ficat în normă, precum şi la a 7-a şi a 21-a zi după încetarea intoxicaţiilor cirogene. Termenele indicate au fost stabilite în baza investigaţiilor biochimice ale activităţii enzimei.

În funcţie de gradul de activitate a enzimei, produsul reacţiei la catepsina B în ficatul normal a fost prezent fie sub aspectul granulelor mărunte solitare, fie sub aspectul unor conglomerate, mai mult sau mai puţin omogene, de densitate diferită. O reacţie extrem de intensă s-a remarcat în lizozomii celulelor Kupffer. În hepatocite produsul reacţiei a fost detectat în unii lizozomi şi în diverşi corpusculi membranoşi (myelin-like). S-a remarcat, de asemenea, o activitate extracelulară neînsemnată a catepsinei B. Granule solitare ale produsului de reacţie se detectau pe microviliile hepatocitelor în spaţiile Disse. Am revelat activitatea catepsinei B şi în lizozomii celulelor endoteliale.

Conform datelor obţinute, catepsina B în ficatul normal se localizează în lizozomii hepatocitelor, celulelor Kupffer şi entodeliocitelor, precum şi extracelular pe microvilozităţile hepatocitelor [5].

Particularitatea pregnantă pe care am urmărit-o în timpul examenelor electron-histochimice asupra ficatului în procesul de regresie a cirozei este secreţia catepsinei B din hepatocite şi elementele celulare ale ţesutului conjunctiv spre spaţiul extracelular. Despre aceasta mărturisesc cumulaţiile de produs al reacţiei în spaţiile intercelulare – pe citolemă şi pe fibrilele de colagen adiacente. Reacţia intensă la catepsina B în spaţiul extracelular s-a putut urmări la ambele termene de cercetare.

De remarcat faptul că termenele de investigaţie (7 şi 21 de zile de regresie) se deosebeau esenţial prin ponderea elementelor celulare ce secretau enzima spre spaţiul extracelular. Astfel, la termenul de 7 zile de regresie, practic toată catepsina B extracelulară era secretată de celulele septurilor fibroase (macrofage şi fibroblaste), prezente în număr mare datorită cantităţii excesive de ţesut conjunctiv în ficatul afectat de ciroză. Secreţia enzimei de către hepatocite era infimă.

La termenul de 21 de zile de regresie, produsul de reacţie la catepsina B, din contra, se evidenţiază preponderent în preajma hepatocitelor. Cantităţi considerabile de produs al reacţiei sub formă de granule solitare sau de conglomerate granulare, mai mult sau mai puţin omogene, se detectau dispuse pe citolema hepatocitelor, pe fibrilele de colagen adiacente sau în profunzimea stratului fibros (*figurile 2, 3*). Elementele celulare conjunctive, numărul cărora s-a redus considerabil odată cu subţierea straturilor de ţesut

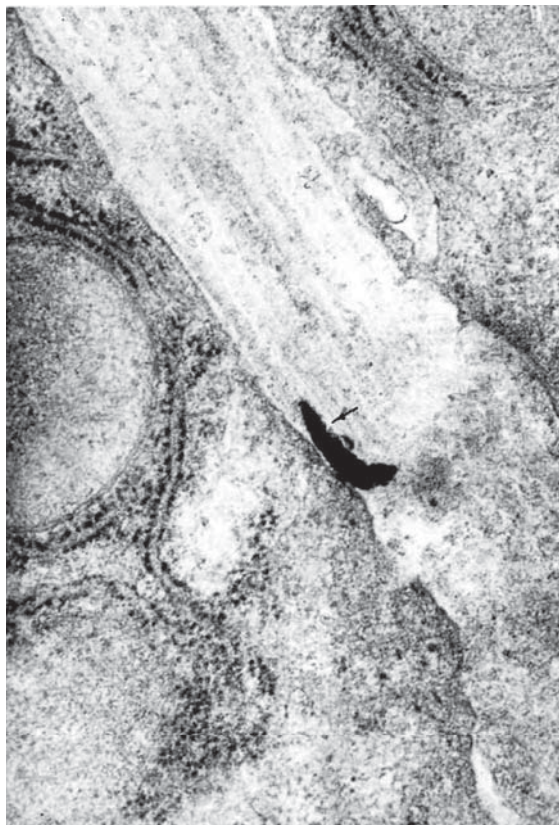


Figura 2. 21 de zile de regresie a cirozei. Produs al reacției la catepsina B extracelulară pe fibrile de collagen adiacente hepatocitului. x30000

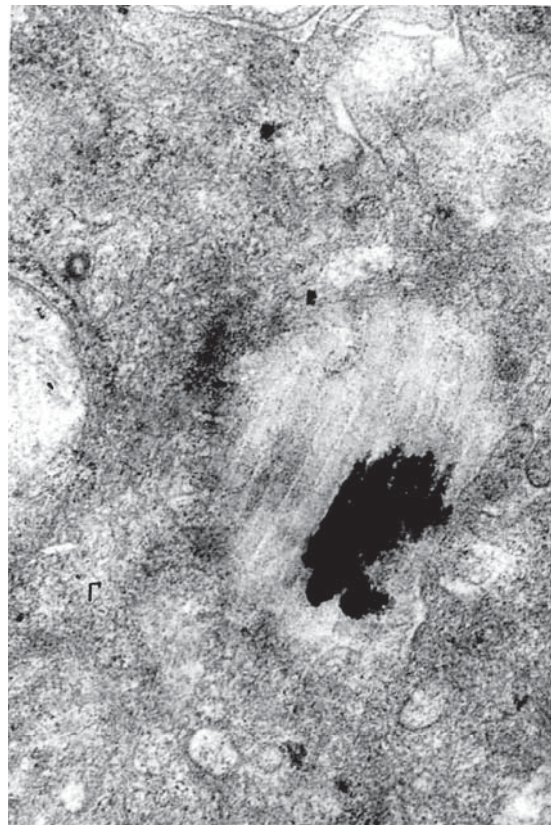


Figura 3. 21 de zile de regresie a cirozei. Reacție intensă la catepsina B extracelulară pe fibrile de collagen adiacente hepatocitului și în profunzimea septului fibros. x25000

conjunctiv, secretau enzimă activă în cantități mult mai mici.

De remarcă faptul că pe citolema celulelor Kupffer și pe fibrilele de collagen adiacente lor produsul de reacție la catepsina B se detecta atât la a 7-a, cât și la a 21-a zi de regresie. La ambele termene de cercetare, pe lângă secreția catepsinei B în spațiul extracelular, are loc fagocitarea și liza intracelulară a collagenului de către macrofage și fibroblaste.

În citoplasma majorității macrofagelor se disting vacuole conținând fibrile fragmentate de collagen. În unele dintre aceste vacuole se detecta produsul reacției la catepsina B, ceea ce indică originea lor fagocitară.

Ca și în macrofage, la ambele termene de cercetare, în citoplasma multor fibroblaste se observă diferite cantități de vacuole și fagolizozomi ce conțin fragmente fagocitate de fibrile de collagen la diferite etape de degradare. În unele dintre aceste vacuole se detecta produsul reacției la catepsina B, ceea ce arată originea fagocitară a acestor vacuole.

Trebuie de subliniat faptul că atât macrofagele, cât și fibroblastele antrenate în procesul de fagocitoză și liză intracelulară a collagenului manifestau și o oarecare activitate collagenolitică extracelulară, ceea

ce este demonstrat de prezența produsului de reacție la catepsina L sub formă de granule solitare pe citolema celulelor și pe fibrilele de collagen adiacente. Mostrele de referință nu conțineau produsul reacției la catepsina B.

Un aspect, credem, important este distribuția produsului reacției nu doar pe citolema hepatocitelor, a macrofagelor, fibroblastelor și fibrilele de collagen adiacente, dar și în profunzimea septurilor fibroase. Activitatea enzimei se depista atât la nivelul fibrilelor collagenice destrămate, cât și pe cele aparent intacte vizual. S-ar putea presupune că la acțiunea catepsinei B se expune, practic, tot collagenul, indiferent de situația sa, și că nu doar collagenaza, ci și alte proteinaze pot iniția dezintegrarea extracelulară a collagenului.

Nouă ne-a reușit să demonstrăm in vivo antrenarea catepsinei B în procesele de degradare extracelulară a collagenului din ficat în procesul de regresie a cirozei. Putem presupune că degradarea extracelulară a collagenului din ficat în procesul de regresie a cirozei este mai importantă decât cea intracelulară (sau, cel puțin, nu este mai puțin semnificativă decât ultima) și că rolul esențial în acest proces ar reveni enzimelor lizozomale ale hepatocitelor.

Este absolut clar că secreția de hidrolaze lizozomale deține un rol important în catabolizarea țesuturilor conjunctive, precum și în relațiile celulei cu matricea extracelulară, astfel constituind un mecanism de asigurare a homeostaziei structurale.

Ar fi foarte dificil de apreciat aportul diferitelor elemente celulare la degradarea matricei extracelulare hepatice. În ficatul cirozat celulele țesutului conjunctiv prevalează esențial asupra hepatocitelor. În acest caz, contribuția elementelor celulare mezenchimale în resorbția țesutului conjunctiv pare a fi destul de considerabilă, în special pe parcursul primelor săptămâni ale perioadei de regresie. Probabil, la etapele ulterioare, când numărul celulelor mezenchimale se reduce esențial (iar cel al hepatocitelor se majorează), se atenuază și rolul lor în procesul dat, iar degradarea țesutului conjunctiv are loc în continuare cu implicarea preponderent a hepatocitelor.

Așadar, posibilitatea reversiunii modificărilor cirotice din ficat se află în strictă dependență de activitatea lizozomală a hepatocitelor și a celulelor mezenchimale și, în primul rând, de gradul de persistență a parenchimului, de capacitatea sa de regenerare, precum și de posibilitatea restabilirii sistemului său lizozomal.

Concluzii:

1. În perioada de regresie a cirozei hepatice experimentale, se produce sporirea pregnantă a activității proteinazei cisteinice – catepsinei B în ficat, dinamica activității enzimei manifestând un caracter fazic și un grad înalt de corelație cu modificările nivelului de hidroxiprolină tisulară, ceea ce atestă implicarea directă a acestei enzime în degradarea colagenului din ficat.

2. Catepsina B în ficat se localizează în lizozomii hepatocitelor, celulelor Kupffer și endoteliocitelor.

3. În procesul de regresie a cirozei, catepsina B este secretată de către hepatocite, macrofage și fibroblaste spre spațiul extracelular, pentru a se angaja nemijlocit în procesul de degradare extracelulară a colagenului.

4. Catabolizarea extracelulară intensă a colagenului din ficat în procesul de regresie a cirozei prin intermediul catepsinei B are loc cu concursul major al hepatocitelor, pe când liza intracelulară a colagenului este realizată de macrofage și fibroblaste cu participarea activă a catepsinei B.

Bibliografie

1. Benyon R.C., Iredale J.P., *Is liver fibrosis reversible?* Gut., 2000; 46:443-446.
2. Murphy G., Reynolds J.J., *Current views of collagen degradation.* BioEssays, 1985; 2(2):55-60.

3. Reynolds J.J., *Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation.* Oral Disease, 1996; 2(1):70-76.

4. Shingleton W., Hodges D., Brick P., Cawston T., *Collagenase: a key enzyme in collagen turnover.* Biochemistry & Cell. Biology, 1996; 74 (6): 759-775.

5. Râvneac V. *Mecanismele de regresie a cirozei hepatice experimentale.* Autoref. ... doct. hab. șt. med. Moscova, 1990.

6. Woessner J., *Biological mechanisms of collagen degradation.* Treatise on Collagen. New York, 1968; V. 2, Part B: 253-330.

7. Barrett A.J., *Introduction: the classification of proteinases.* Protein Degradation in Health and Disease. Amsterdam-Oxford-New-York, 1980: 1-13.

8. Bohley P., Kirschke H., Langner J., Wiederanders B., *Acta Biol. Med. Germ.*, 1976; 35: 301-307.

9. Guinec N., Dalet-Fumeron V., Pagano M., «*In vitro*» study of basement membrane degradation by the cysteine proteinases, cathepsins B, B-like and L. *Digestion of collagen type IV, laminin, fibronectin.* Biological Chemistry Hoppe-Seyler, 1993; 374 (12): 1135-1146.

10. Kirschke H., Barret A.J., Rawlinds N.D., *Proteinases I: lysosomal cysteine proteinases.* Protein Profile, 1995; 2 (14): 1581-1643.

11. Barrett A.J., Kirschke H., *Cathepsin B, cathepsin H, cathepsin L.* Methods in Enzymology, 1981; 80: 535-561.

12. Cardozo C., Kurtz C., Lesser M., *Degradation of rat lung collagens by cathepsin B.* Journal of Laboratory & Clinical Medicine, 1992; 199 (2): 169-175.

13. Burleigh M., Barrett A., Lazarus G., *Cathepsin B1: A lysosomal enzyme that degrades native collagen.* Biochem. J., 1974; 137 (2): 387-398.

14. Ii K., Hizawa K., Kominami E. et al., *Different immunolocalizations of cathepsins B, H and L in the liver.* J. Histochem. Cytochem., 1985; 33 (11): 1173-1175.

15. Yokota S., Kato K., *Immunocytochemical localization of cathepsin B and H in rat liver.* Histochemistry, 1987; 88 (1): 97-103.

Rezumat

Aplicând metode biochimice și electron-histochimice, a fost studiată activitatea proteinazei cisteinice – catepsinei B – în ficatul afectat de ciroză și în perioada de regresie a cirozei la șobolani. S-a determinat o activitate sporită a catepsinei B în ciroza hepatică, fiind în scădere pe parcursul perioadei de regresie, precum și un grad înalt de corelație între activitatea enzimei și nivelul hidroxiprolinei din ficat, ceea ce atestă implicarea directă a acestei enzime în degradarea colagenului din ficat.

Activitatea catepsinei B a fost detectată electron-histochimic în fagolizozomii celulelor Kupffer și fibroblastelor ce conțineau fibrile fragmentate de colagen. De asemenea,

activitatea enzimei a fost detectată pe plasmalema hepatocitelor, celulelor Kupffer și fibroblastelor precum și pe fibrilele de collagen adiacente. Activitatea extracelulară a cathepsinei B demonstrează că, în afară de proteoliza intracelulară, enzima participă și la degradarea extracelulară a collagenului, fiind secretată în spațiul extracelular de către hepatocite, macrofage și fibroblaste.

Summary

The activity of cysteine proteinase cathepsin B was investigated biochemically and electron-histochemically in cirrhotic rat liver and during the recovery from hepatic cirrhosis. It was determined an increase of cathepsin B activity in cirrhosis and a decrease during the recovery period, and a high correlation between the enzyme activity and hydroxyproline level in liver. The related results suggests that the investigated cystein proteinase (cathepsin B) is direct implicated in collagen degradation in liver during the recovery from hepatic cirrhosis.

Electron-histochemically the activity of cathepsin B was revealed in the Kupffer cells and fibroblast phagolysosomes containing fragments of collagen fibrils. We also found the enzyme activity on the hepatocyte, Kupffer cell and fibroblast plasmalemma and on adjacent collagen fibrils. The detected extracellular activity of cathepsin B suggests that in addition to the intracellular proteolysis, cathepsin B is secreted by hepatocytes, macrophages and fibroblasts in the intercellular space and can take part in the extracellular collagen degradation.

Резюме

Биохимическими и электронно-гистохимическим методами изучали активность цистеиновой протеиназы катепсина В в цирротически измененной печени, и при регрессии цирроза у крыс. Было выявлено увеличение активности катепсина В при циррозе печени, уменьшение при регрессии, а также высокая степень корреляции между ферментативной активностью катепсина В и количественным содержанием оксипролина в печени, что свидетельствует о непосредственном участии этого фермента в деградации коллагена в печени.

Электронно-гистохимическая активность катепсина В была обнаружена в фаголизосомах клеток Купффера и фибробластов, содержащих фрагментированные фибриллы коллагена. Кроме того, активность фермента была обнаружена на плазмалемме гепатоцитов, клеток Купффера и фибробластов, а также на близлежащих коллагеновых фибриллах. Внеклеточная активность катепсина В указывает на то, что помимо внутриклеточного протеолиза, фермент участвует во внеклеточной деградации коллагена, будучи секретиремым в межклеточное пространство гепатоцитами, макрофагами и фибробластами.

ROLUL PEPTIDELOR CU MASĂ MOLECULARĂ MEDIE ÎN AGREGAREA CELULELOR SANGVINE ÎN ARSURILE TERMICE LA COPII

Eva Gudumac, academician, prof. univ.,
Olesea Prisăcaru, doctorandă
USMF „Nicolae Testemițanu”

Actualitatea temei

Arsura termică este însoțită de dezvoltarea imunodeficienței pronunțate, care influențează negativ rezistența organismului în special la acțiunea factorilor patogeni [7, 10].

Rolul primar al sistemului imun este de a proteja organismul împotriva invaziei microbiene. Atât apărarea locală, cât și cea sistemică sunt independente, dar afectarea termică și distrugerea barierei de suprafață pot cauza perturbări în ambele sisteme de apărare imunitară. Complementul C₃ și produsele scindării lui au fost decelate atât în plasmă, cât și în lichidul din flictenele de arsură. Acești produși infiltrază funcția neutrofilului, limfocitului și mai apoi imunitatea locală, contribuind la incidența crescută a complicațiilor septice la pacienții arși.

Depresia circulatorie din șoc și dezvoltarea MODS-ului (disfuncției multiorganice) sunt complicații asociate cu sepsisul. În aceste perturbări fiziopatologice sunt implicate antitrombina III, fibrinogenul, imunoglobulinele, produșii de scindare a complementului. Cascada coagulării poate fi activată atât pe cale intrinsecă, cât și pe cale extrinsecă. Toxinele, acționând direct asupra factorului XII, activează sistemele de contact și calea factorului XI activ, precum și calea coagulării intrinseci. Paralel endotoxinele activează cascada coagulării extrinseci.

Studiile denotă că în etiopatogenia tuturor etapelor clinico-evolutive ale arsurilor termice se face vinovată tulburarea microcirculației, ca urmare a agregării celulelor sangvine [8, 11]. Modificarea agregării celulelor sangvine are loc atât sub acțiunea factorilor plasmatici, cât și a celor celulari [2, 5, 6, 9, 12, 16]. A fost demonstrat că creșterea agregării eritrocitelor și trombocitelor în arsura termică este condiționată de modificările proprietăților fizico-chimice ale plasmei sangvine.

Toate studiile au demonstrat că în plasma sangvină a bolnavilor arși se află o cantitate mare de diferiți agenți, care pot deține calități proagregante. Pentru a stabili tactica terapeutică, orientată spre corecția tulburărilor de microcirculație în arsura termică, este necesar de a cunoaște rolul și mecanismul agregant al fiecăruia dintre acești factori.