

Catedra de anatomie umană (cond.: prof. T. Maros, doctor-docent), Catedra de biochimie (cond.: prof. A. Kovács, doctor în medicină) ale I.M.F. Tg.-Mureș, Clinica medicală nr. I din Tg.-Mureș (cond.: prof. P. Dóczy, doctor-docent, medic emerit al Republicii Socialiste România)

CERCETĂRI PRIVIND COMPORTAMENTUL CATEPSINEI D HEPATICE ÎN UNELE CONDIȚII EXPERIMENTALE

I. B. Lőrincz, Ilona N. Csiki, T. Maros, O. Lakatos, E. Bálint, Eszter Csegezi

Studiul catabolismului protidic în patologia hepatică prezintă un interes din ce în ce mai mare, de când a început să fie tot mai mult acceptat rolul metabolic al proteazelor intracelulare atât în condiții fiziologice cât și patologice (13, 16, 21, 22, 23, 24, 28, 40, 44)

Proteazele tisulare sînt cuprinse într-un „complex catepsinic” care a fost sistematizat de Fruton (28). În ultimii ani au fost puse în evidență și alte enzime proteolitice (37, 45).

În 1960 Press (45) descrie proprietățile catepsinei D izolată din splina de bou. Această enzimă al cărei pH optim este acid nu scindează substraturile sintetice ale altor catepsine, nu este activată de cisteină, poate să apară sub mai multe forme. Prezența enzimei a fost demonstrată în mai multe organe (25, 31, 36, 37, 39, 58). În ficatul de șobolan reprezintă practic întreaga activitate proteolitică determinabilă la pH-ul 3 (35), dacă se folosește drept substrat hemoglobina.

Împreună cu celelalte hidrolaze acide, catepsina D se localizează în lizozomii hepatocitului (12, 13, 20, 21, 26, 40, 44). Membrana lizozomială împiedică, în mod normal, eliberarea enzimelor în cantități semnificative din aceste organisme subcelulare. Alterarea acestei bariere duce la creșterea permeabilității ei, permițînd astfel răspîndirea enzimelor în citoplasmă (8, 17, 21, 22, 23, 24, 40, 50). În asemenea condiții aceste enzime participă la procesele de autodigestie, contribuind, în cazul ficatului, la apariția sindromului de citoliză hepatică (5, 16). Capacitatea lizozomilor de a digera unele structuri subcelulare este cunoscută (4, 51).

Catepsina D prezintă cea mai mare afinitate față de proteinele de origină microzomială ale hepatocitului.

După Sawant (51) eliberarea maximă a peptidelor și a aminoacizilor în urma proteolizei se observă la un pH net acid, fapt care subliniază importanța catepsinei D în acest proces.

În lucrarea de față ne-am propus să urmărim comportarea catepsinei D în intoxicația acută și cronică cu tetraclorură de carbon (CCl_4) și după hepatectomia parțială (h.p.) la șobolani.

Material și metodă

S-a lucrat pe 128 de șobolani albi (nefiind incluse animalele care au decedat în cursul diferitelor tratamente) cu greutate de 130—180 g. de ambele sexe, ținute la un regim alimentar standard, în condiții constante de temperatură.

Intoxicația acută cu CCl_4 a fost realizată prin administrarea zilnică de CCl_4 pur, în doze de 0.1 ml/100 g greutate corp pe cale subcutană, animalele fiind sacrificate la 2, 11, 20, 36 și 72 de ore după începerea intoxicației.

Intoxicația cronică prin inhalatie cu CCl_4 a fost realizată cu ajutorul unei camere închise din fontă de formă cilindrică, cu un diametru de 50 cm și lungime de 80 cm, putând cuprinde 10 șobolani.

Animalele au fost ținute în această cameră cite 10 minute, din două în două zile, timp în care a fost evaporată o cantitate de 15 ml tetraclorură de carbon; sacrificarea animalelor efectuându-se la 4, 8 și 12 săptămâni de la începerea intoxicației.

Hepatectomia parțială a fost efectuată după metoda *Higgins și Anderson* (31).

Prepararea omogenatelor: imediat după sacrificarea animalelor ficatul a fost prelevat și omogenizat într-un omogenizator de tip *Waring-Blendor*, la 20.000 r.p.m., timp de 3 minute, în ser fiziologic (diluția 1:5), la temperatură între 0 și +4°C. După omogenizare suspensiile au fost aduse printr-o diluare de 5/1 cu soluție de NaCl 0.9% la o concentrație 40 mg țesut/ml omogenat.

Substratul de hemoglobină s-a preparat după metodele descrise de *Anson* (1), respectiv *Nagel* (40). La 2 g de hemoglobină (*Merck*) s-a adăugat 60 ml acid clorhidric N/10, agitându-se de mai multe ori, după 24 de ore s-a adăugat 2.5 ml fenilmercuriborat (*Fenosept*) și 4.3 ml hidroxid de sodiu N. Volumul soluției s-a completat cu apă distilată pînă la 100 ml. S-a agitat din timp în timp, iar în ziua următoare s-a diluat cu un volum egal de soluție tampon de citrat-acid clorhidric 0.4 M, pH = 3.5 și s-a filtrat.

Determinarea activității cateptice s-a efectuat după metoda *Anson* (1) modificată de *Nagel* (40). La 2 ml soluție de hemoglobină 1% s-a adăugat 1 ml omogenat de ficat, după care s-a incubat timp de 30 de minute la 40°C. Imediat după incubatie s-a adăugat 1.5 ml de acid tricloracetic 20%, filtrându-se după 10 minute. La 1.25 ml filtrat s-a adăugat 2.5 ml soluție de carbonat de sodiu, 2.8 M și 0.75 ml reactiv *Folin-Ciocalteu* (diluat în proporție de 1:2 cu apă distilată). După 5 minute, extincțiile s-au citit la fotometrul *Pulfrich* cu filtrul S72, în cuva de 1 cm comparativ cu martorii cu care s-a lucrat în mod identic dar fără incubatie. Activitatea enzimatică am exprimat-o în micrograme de tirozină U.T. eliberată din substrat în condițiile descrise.

Rezultate

La animalele sănătoase activitatea cateptică determinată în omogenatul de țesut hepatic a arătat valori medii de 18.8 ± 0.83 U.T.

În cursul intoxicației acute cu CCl_4 , în prima etapă se observă scăderea activității, care se accentuează la 11 ore după administrarea toxicului. În continuare însă activitatea enzimatică crește, la 36 de ore depășește semnificativ nivelul normal, ajungînd la valori foarte ridicate la 72 de ore (fig. 1).

În cazul intoxicației cronice cu CCl_4 , activitatea catepsinei D arată aproape constant aceleași valori ridicate la 4, 8 și 12 săptămâni după începerea experimentului (fig. 2).

La lotul animalelor hepatectomizate parțial inițial se observă scăderea activității cateptice (la 24 ore), apoi urmează o creștere progresivă a acestuia. La 72 de ore după intervenție activitatea enzimatică se ridică peste nivelul normal, nu însă într-un mod semnificativ.

În zilele următoare se înregistrează valori asemănătoare (fig. 3).

Rezultă deci, că atît în faza inițială a intoxicației acute, cit și imediat după h. p. activitatea cateptică scade semnificativ (fig. 4).

I. B. LÖRINCZ ŞI COLAB.: CERCETĂRI PRIVIND COMPORTAMENTUL CATEPSINEI
D HEPATICE ÎN UNELE CONDITII EXPERIMENTALE

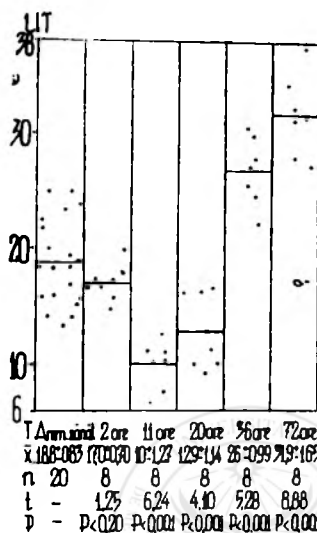


Fig. nr 1

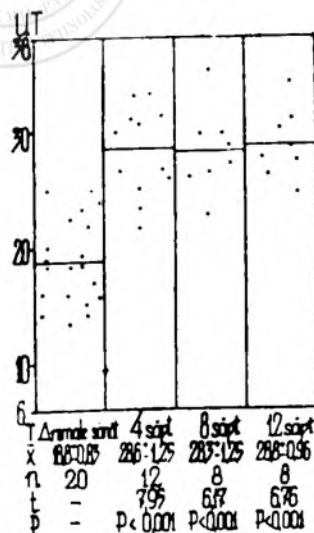


Fig. nr. 2

İ. B. LÖRINCZ ŞI COLAB.: CERCETĂRI PRIVIND COMPORTAMENTUL CATEPSINEI
D HEPATICE İN UNELE CONDIȚII EXPERIMENTALE

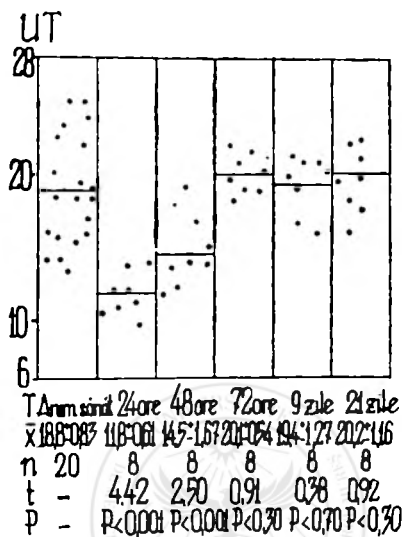


Fig. nr. 3

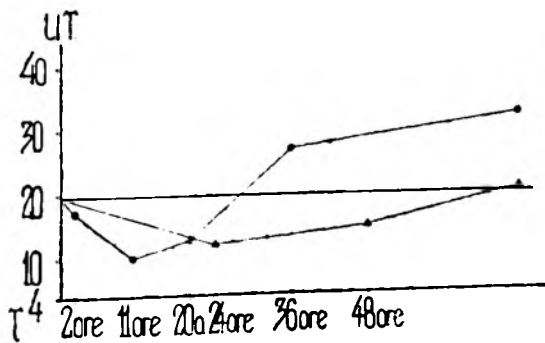


Fig nr. 4

În cursul intoxicației acute cu CCl_4 , sinteza proteică în ficat este alterată, fapt demonstrat prin cercetările ultrastructurale (6, 43, 54) și biochimice (48, 52, 54, 55, 56, 57, 59). Literatura de specialitate furnizează mai puține date în ceea ce privește proteoliza.

Tetraclorura de carbon provoacă alterarea lizozomilor hepatici și — ca o consecință — creșterea activității catepsinei D „libere”, așa cum demonstrează cercetările „in vitro” ale lui Artizzu (3) precum și cele efectuate „in vivo” de Beaufay (9) și de Ugazio (60).

Alterarea lizozomială are loc însă într-un stadiu mai avansat al intoxicației cu CCl_4 (2, 19, 60), fiind precedată nu numai de alterarea reticulului endoplasmic (46, 47), ci și de cea a mitocondriilor (2).

În cercetările noastre, noi am găsit creșterea semnificativă a activității proteolitice numai la 36 de ore după intoxicație. În această privință trebuie luat în considerare faptul că noi am administrat doze mici (0,1 ml/100 g corp) alegând calea cea mai bine tolerată de animale (s. c.). Dianzani și colab. (2, 19) susțin că acțiunea toxicului asupra acestor particule subcelulare este indirectă. De asemenea nu trebuie neglijat rolul anoxiei și scăderea consecutivă a pH-ului (21).

În intoxicația cronică cu tetraclorură de carbon (model experimental folosit pretutindeni pentru realizarea cirozei hepatice) valorile crescute înregistrate de noi reflectă pe de o parte distrugerea continuă a hepatocitelor iar pe de altă parte „turnoverul” protidic mai rapid, caracteristic zonelor de regenerare (29, 30, 42).

Oarecum neobișnuită, este observația noastră privind scăderea activității proteolitice în prima etapă a intoxicației acute cu CCl_4 și după h.p. Constatări asemănătoare referindu-se la comportarea unor enzime hepatice în cursul intoxicației acute cu CCl_4 , au fost semnalate de Smuckler (54) și de Recknagel (46), iar după h.p. de Sanchez (49), Bartók (7) și Carulli (15). Aceste enzime sint însă caracteristice altor structuri subcelulare, modificările lor realizându-se probabil pe alte căi.

Cu privire la enzimele lizozomiale, Walkinshaw (61) publică observații similare cu ale noastre în urma h.p. referindu-se la comportarea fosfatazei acide și a β -glucuronidazei: iar Smith (53) se referă la catepsina D, fără a încerca însă să explice fenomenul.

Comportarea asemănătoare din prima etapă a activității proteolitice în ambele cazuri ridică suspiciunea intervenției unui mecanism de control comun. Considerăm că în această privință nu trebuie omis rolul cortexului suprarenal.

Astfel, Beaufay (9) a demonstrat descreșterea activității enzimelor lizozomiale în țesutul hepatic de șobolan după tratamentul cu hidrocortizon, iar Weissman (62) a relevat scăderea eliberării catepsinei D din lizozomii hepatici în diferite condiții experimentale sub influența hidrocortizonului. Posedăm de asemenea informații că adrenalina (32) și glucagonul (18) măresc activitatea catepsinei D.

Scăderea conținutului în catecolamine a medulosuprarenalei nu poate fi pusă în evidență decît la 20 de ore în urma administrării tetraclorurii de carbon (14), fapt care ar pleda de asemenea pentru ipoteza predominării efectului cortizonic în această primă etapă a intoxicației.

Observația noastră potrivit căreia activitatea catepsinei D manifestă o creștere în etapele următoare ale h.p., concordă cu rezultatele cercetărilor care au evidențiat o augmentare a concentrației enzimei în țesuturile aflate în fază de creștere (40,33) sau în unele tumori (11).

Acest fapt ne sugerează ideea că și în cazul nostru ar putea fi vorba de un „turnover“ protidic mai intens.

Sosit la redacție: 13 februarie 1968.

Bibliografie

1. ANSON M. L.: *J. Gen. Physiol.* (1938) 22, 79; 2. ARTIZZU M., DIANZANI M. U.: *Biochem. Biophys. Acta* (1962), 63, 453; 3. ARTIZZU M., PANI P., SATTA G., DIANZANI M. U.: *Biochem. Biophys. Acta* (1964) 82, 454; 4. ASHFORD T. P., PORTER K. R.: *J. Cell. Biol.* (1962), 12, 198; 5. AUZEPY P., BOIVIN P., FAUVERT R.: *Rev. int. d'Hépat.* (1960), 10, 483; 6. BASSI M.: *Exp. Cell. Res.* (1960), 20, 313; 7. BARTÓK I., HORVÁTH E., POCSAI J., KORPASSY B.: *Kisérlet. Orvostud.* (1963), 15, 119; 8. BEAUFAY H., de DUVE C.: *Biochem. J.* (1959), 73, 604; 9. BEAUFAY H., van CAMPENHOUT E., de DUVE C.: *Biochem. J.* (1959), 73, 617; 10. BECKEN W. L., IMRÉDY K.: *Gastroenterol.* (1963), 44, 63; 11. BENZ G.: *Oncologia* (Basel), (1959), 12, 128; 12. BOUMA J. M. W., GRUBER M.: *Biochem. Biophys. Acta* (1964), 89, 545; 13. BOUMA J. M. W., GRUBER M.: *Biochem. Biophys. Acta* (1966), 113, 350; 14. BRODY T. M., CALVERT D. N.: *Am. J. Physiol.* (1960), 198, 682; 15. CARULLI N., de BATTISTE C., CALLO M.: *Conf. Int. Montecatini-Terme* (Italia), 1966 oct. 29—30; 16. CERNIKOV M. P., EVTHINA Z. F.: *Uspehi sovrem. biol.* (1964), 57, 50; 17. DATTA D. V., JONES W. A., ISSELBACHER K. J.: *Gastroenterology* (1967), 52, 828; 18. DETER L. R., de DUVE C.: *J. Cell. Biol.* (1967), 33, 437; 19. DIANZANI M. U., BACCINO F. M., COMPOTRI M.: *Lab Invest.* (1966), 15, 149; 20. DE DUVE C., PRESSMAN B. C., GIANETTO R., APPELMANS F.: *Biochem. J.* (1955), 60, 604; 21. DE DUVE C.: in volumul Hayashi T.: *Subcellular particles*, Ronald Press, Comp. New-York, 1959, 128; 22. DE DUVE C.: *Exp. Cell. Res.* (1959), 7, suppl. 169; 23. DE DUVE C., BEAUFAY H.: *Biochem. J.* (1959), 73, 610; 24. DE DUVE C.: *Ann. Physiol. Rev.* (1966), 28, 435; 25. ELLIS S.: *J. biol. Chem.* (1960), 235, 1694; 26. FINKENSTAEDT J. T.: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* (1957), 95, 302; 27. FURTON J. S.: in volumul Boyer P. D., Lardy H., Myrback K.: *The Enzymes*, Academic Press, New York, 1960, 233; 28. FOLIN O., CIOCALTEU V.: *J. Biol. Chem.* (1927), 73, 627; 29. GABRIELESCU E., BORDEIANU A.: *Rev. Sci. Med.* (1963), 8, 117; 30. GABRIELESCU E., BORDEIANU A.: *Șt. cerc. fiziol.* (1964), 9, 97; 31. GOETZE T., GÖTZE S.: *Acta biol. med. germ.* (1965), 7, 580; 32. GORDON P., ZAK R.: *Science* (1963), 140, 294; 33. von HANN H. P.: *Oncologia* (Basel), (1959), 12, 120; 34. HIGGINS G. M., ANDERSON R. M.: *Arch. Pathol.* (1931), 12, 186; 35. KUSOWLEVA O. B., TSUN-IAN WAN: *Biochimia* (1959), 24, 550; 36. LAPRESLE C., WEBB T.: *Biochem. J.* (1960), 76, 538; 37. LAPRESLE C., WEBB T.: *Biochem. J.* (1962), 84, 455; 38. MAJMUDAR C., TSUKADA K., LIEBERMANN I.: *J. Biol. Chem.* (1967), 242, 700; 39. MASTER P. B., WEBB T.: *Ann. de l'Inst. Pasteur* (1963), 104, 90; 40. NAGEL W., WILLIG F.: *Z. ges. exp. Med.* (1962), 136, 183; 41. NAGEL W., WILLIG F.: *Naturwissenschaft.* (1964), 51, 115; 42. NICOLAESCU T., GABRIELESCU E., BORDEIANU A., STOICULESCU P., NECULA V.: *Șt. cerc. fiziol.* (1963), 8, 291; 43. OBERLING C., ROUILLER C.: *Ann. Path.* (1956), 1, 401; 44. PARK C. D., PENNINGTON R. J.: *Enzym. biol. clin.* (1967), 8, 149; 45. PRESS E. M., PORTER R. R., CEBRA J.: *Biochem. J.* (1960), 74, 501; 46. RECKNAGEL R. O., LOMBARDI B.: *J. biol. Chem.* (1961), 236, 564; 47. RECKNAGEL R. O., GHOSHEL A. K.: *Lab. Invest.* (1966), 15, 132; 48. RICHTER G.: *Biochem. Biophys. Acta* (1962), 61, 144; 49. SANCHEZ E., SOBERON G., PALACIOS O., LEE E., KURI M.: *J. biol. Chem.* (1961), 236, 1607; 50. SAWANT P. L., SHIBKO S., KUMTA U. S., TAPPEL A. L.: *Biochem. Biophys. Acta* (1964), 85, 82; 51. SAWANT P. L., DESAI I. D., TAPPEL A. L.: *Biochim. Biophys. Acta* (1964), 85, 93; 52. SEAKINS A., ROBINSON S. D.: *Biochem. J.* (1963), 86, 401; 53. SMITH H. M.: *Proc. Soc. exp. Bull. Med.* (1962), 109, 182; 54. SMUCKLER E. A., ISERI O. A., BENDITT E. P.: *J. Exp. Med.* (1962),

116. 55; 55. SMUCKLER E. A., BENDITT E. P.: Science (1963), 140, 308; 56. SMUCKLER E. A., ISERI O. A., BENDITT E. P.: Lab. Invest. (1964), 13, 532; 57. SMUCKLER E. A.: Lab. Invest. (1966), 15, 157; 58. STEFANOVIC J., WEBB T., LAPRESLE C.: Ann. de l'Inst. Pasteur (1962), 103, 276; 59. THIELMANN K.: Conf. Int. Montecatini-Terme (Italia), 29—30 octombrie, 1966; 60. UGAZIO G., ARTIZZU M., DIANZANI M. U.: Biochem. J. (1964), 90, 109; 61. WALKINSHAW C. H., van LANCKER J. L.: Lab. Invest. (1964), 13, 513; 62. WEISSMANN G., DINGLE J.: Exp. Cell. Res. (1961), 25, 207.