

Zbigniew WÓJTOWICZ, Stanisław ZAŁUSKA,
Elżbieta Anna JĘDRZEJEWSKA, Bogumił GORAL

L'activité des enzymes lysosomaux de la paroi de l'artère basilaire chez le porc

Aktywność enzymów lizosomalnych ściany tętnicy podstawnej u świni

La paroi de l'artère basilaire est construite d'éléments cellulaires et de tissu connectif, dont les composants sont: le collagène, l'élastine et les glycosaminoglycans. Plusieurs auteurs décrivent les modifications quantitatives et qualitatives de ces éléments de substance intercellulaire au cours du „vieillessement” des vaisseaux et pendant les processus morbides tels que: le diabète, l'athérome, l'hypertension. Ce sont les enzymes lysosomaux — les hydrolases acides qui participent à la dégradation des éléments du tissu connectif de la paroi vasculaire. De nombreux auteurs s'intéressent à ces enzymes qui, depuis quelques années, sont devenus l'objet d'études de plusieurs chercheurs (4, 5, 7, 8, 10, 13—15, 18). On déterminait l'activité de ces enzymes à l'aide de méthodes histochimiques et quantitatives en utilisant des substrats spécifiques. Le plus souvent, les recherches concernaient la tunique interne et moyenne de l'aorte ou bien les myocytes séparés de cette aorte chez les animaux sains et ceux avec des lésions morbides (5, 7, 8, 13—15, 17, 18). Il y a peu d'informations concernant l'activité des enzymes lysosomaux des artères cérébrales chez les animaux soumis à l'expérience (16, 17).

Nous avons donc décidé de réaliser les déterminations quantitatives d'activité des enzymes lysosomaux de la tunique interne et moyenne de la paroi de l'artère basilaire chez le porc.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

On a examiné 55 porcs de la race blanche polonaise des deux sexes (31 femelles et 24 mâles). Les animaux étaient divisés en 2 groupes. Les 28 porcs étaient privés de nourriture et transportés pendant 6 h. (groupe I). Les 27 animaux ont été tués immédiatement d'une manière traditionnelle (groupe II).

On congelait l'artère basilaire jusqu'à la température de -20°C , après l'avoir irriguée dans le sel physiologique. Après avoir séparé l'adventice, on irriguait les artères examinées dans le sel physiologique jusqu'à la perte des traces du sang. Ensuite, elles étaient pesées. Les artères basilaires étaient homogénéisées dans 2 ml 0,1 M du tampon phosphatique ($pH=6,0$) comportant 0,1% du Triton X-100 qui fonctionnait comme agent arrachant les tuniques lysosomales. Les vaisseaux étaient homogénéisés dans la température de la fonte de glace 3 fois pendant 20 sec., avec 15 sec. d'intervalles. L'homogénat obtenu était viré pendant 20 min. avec la vitesse de 12 000 tours par 1 min. dans la température de $+4^{\circ}\text{C}$ (le centrifugeur K24 Janetzki). Le supernatant obtenu était utilisé dans les recherches suivantes.

Le principe de détermination de l'activité des enzymes lysosomiaux consiste à décomposer par eux-mêmes des substrats correspondant et à libérer le 4-méthyl-umbelliférolé libre (2). On utilisait, comme substrats, des préparations offertes par la firme SERVA:

a) pour la phosphatase acide — 45 mg de sel de phosphatase bisodieux de 4-méthyl-umbelliférolé dissous dans 100 ml de tampon acétatique 0,1 M, $pH=5,0$;

b) pour la β -galactosidase — 51 mg de 4-méthyl-umbelliférylo- β -D-galacto-piranosyde, dissous dans 100 ml de tampon citratique 0,1 M, $pH=3,0$;

c) pour la N-acétylo- β -D-glucosaminidase — 57,2 mg de 4-méthyl-umbelliférylo-N-acétylo- β -D-glucosaminidylène, dissous dans 100 ml de tampon citratique 0,1 M, $pH=4,3$, avec 0,3 M NaCl;

d) pour la lipase — 62,94 mg de palmitine 4-méthyl-umbelliférolé, dissous dans 10 ml d'acétone et dilué, avant la détermination de 10-fois, du tampon acétatique 0,1 M, $pH=5,0$, avec 0,1% du Triton X-100;

e) pour la sulfatase — 44,1 mg de sel sulfate de potassium 4-méthyl-umbelliférolé, dissous dans 100 ml de tampon citratique 0,1 M, $pH=5,0$.

On incubait 100 ml d'homogénat de l'artère basilaire avec 500 μl de chaque substrat pendant 18 h. dans la température de $37,0^{\circ}\text{C}$. Ensuite, on ajoutait 600 μl de tampon alcalin pour rompre la réaction. Dans la 5^e min., on lisait l'extinction sur le spectrophotomètre de la firme Opton. L'onde avait la longueur de 360 nm. étant donné l'essai de contrôle, pendant lequel l'homogénat a été ajouté avant de mesurer l'extinction. La détermination quantitative de l'albumine a été réalisée d'après la méthode Lowry (6).

Après avoir déterminé les courbes d'extinction pour le 4-méthyl-umbelliférolé et pour l'albumine, on calculait l'activité des enzymes en $\mu\text{m}/\text{mg}$ de l'albumine par 1 h. d'incubation.

On a analysé statistiquement les résultats obtenus à l'aide de caractéristiques suivantes: la moyenne arithmétique (\bar{x}) et la déviation standard (SD). On a vérifié l'essentiel des différences entre l'activité des enzymes dans deux groupes d'animaux à l'aide de test *t*-Student.

RÉSULTATS

Les résultats obtenus de l'activité des enzymes lysosomiaux particuliers de la tunique interne et moyenne de la paroi de l'artère basilaire des animaux soumis au stress et des animaux qui n'étaient pas soumis aux agents stressants sont présentés dans le tabl. 1.

D'après ce tableau, on conclut que, chez les animaux tués traditionnellement, c'est la N-acétylo- β -D-glucosaminidase qui a été la plus active. La phosphatase acide et la β -galactosidase ont prouvé l'activité moyenne, et la lipase et la sulfatase — minimale. L'activité de la N-acétylo- β -D-glucosaminidase, de la lipase et de la sulfatase a été plus élevée chez les femelles que chez les mâles. Dans

Tabl. 1. L'activité des enzymes lysosomaux de la tunique interne et moyenne de la paroi de l'artère basilaire du porc (en micromoles sur 1 mg d'albumine sur 1 h. d'incubation)

Groupe	Sexe	N	Phosphatase acide	β -galactosydase	N-acétylo- β -D-glucosaminidase	Lipase	Sulfatase
I	♂	11	1,766 \pm 1,555	1,010 \pm 0,916	1,956 \pm 0,954	0,220 \pm 0,239	0,054 \pm 0,031
	♀	17	1,761 \pm 0,970	0,943 \pm 0,590	2,977 \pm 1,206	0,319 \pm 0,177	0,095 \pm 0,054
	♂+♀	28	1,762 \pm 1,227	0,969 \pm 0,734	2,606 \pm 1,221	0,248 \pm 0,173	0,076 \pm 0,049
II	♂	14	1,681 \pm 1,501	1,680 \pm 1,437	3,027 \pm 1,773	0,159 \pm 0,134	0,102 \pm 0,103
	♀	13	1,966 \pm 1,180	1,072 \pm 0,542	3,184 \pm 1,624	0,157 \pm 0,103	0,074 \pm 0,051
	♂+♀	27	1,846 \pm 1,332	1,351 \pm 1,094	3,127 \pm 1,681	0,158 \pm 0,119	0,087 \pm 0,082

le cas de la phosphatase acide elle a été presque identique, mais, pour la β -galactosydase, les relations observées ont été inverses.

Le fait de soumettre les animaux aux agents stressseurs tels que la privation de nourriture et le transport, a causé les modifications de l'activité des enzymes lysosomaux de la tunique interne et moyenne de la paroi de l'artère basilaire. C'est la β -galactosydase où l'augmentation de l'activité a été la plus élevée (39%); dans le cas de la N-acétylo- β -D-glucosaminidase et de la sulfatase elle a été moins élevée (20 et 14%), et dans le cas de la phosphatase acide — minimale (5%). Ces modifications n'étaient pas identiques, elles différaient suivant les sexes. Chez les mâles, on observait la croissance remarquable de l'activité de la sulfatase (89%), de la β -galactosydase (66%), et de la N-acétylo- β -D-glucosaminidase (55%), tandis que, dans le cas de la phosphatase acide, on observait la baisse de l'activité (5%). Chez les femelles, la croissance de l'activité des enzymes examinés était moins visible et elle concernait: la β -galactosydase (14%), la phosphatase acide (12%) et la N-acétylo- β -D-glucosaminidase (7%). Par contre, dans ce groupe d'animaux on observait la baisse de l'activité de la sulfatase (28%).

L'activité de la lipase lysosomale chez les animaux soumis à un agent stressseur a baissé remarquablement (57%). Cette baisse a été plus visible chez les femelles (103%) que chez les mâles (38%).

L'analyse statistique réalisée à l'aide de test *t*-Student n'a pas démontré de différences essentielles concernant l'activité des enzymes lysosomaux examinés dans les groupes particuliers d'animaux.

DISCUSSION DES RÉSULTATS DE RECHERCHES

Les estimations quantitatives de l'activité des enzymes lysosomaux de la tunique interne et moyenne de la paroi de l'artère basilaire du porc constituent un

des rapports peu nombreux concernant ce problème. Les résultats obtenus se caractérisent par une grande variabilité (la déviation standard élevée), malgré la conservation des conditions d'estimation stables.

L'activité des enzymes lysosomaux examinés de la paroi de l'artère basilaire des porcs tués d'une manière traditionnelle est beaucoup plus grande que l'activité des mêmes enzymes de la paroi de l'artère basilaire chez le lapin (16). Comme chez les lapins, on a observé que l'activité de la N-acétylo- β -D-glicosaminidase, de la lipase et de la sulfatase est plus élevée chez les femelles que chez les mâles (16).

L'augmentation de l'activité des enzymes lysosomaux de la tunique interne et moyenne de la paroi de l'artère basilaire chez les porcs soumis, avant l'abattage, aux agents stresseurs tels que la privation de nourriture et le transport, est conforme aux rapports d'Arstila et Trump (1), de Bowers et de Duve (3), de Pfeifer (9), de Schmidt et de ses coauteurs (11), et d'Umanna (12). Les auteurs cités ont prouvé que les lysosomes jouent un rôle important dans la régulation des procédés d'adaptation dans la cellule; et, pendant le jeûne, l'activation remarquable de l'appareil lysosomal mène à la décomposition des structures de plusieurs organes intracellulaires, ce que nos recherches confirment.

RÉFÉRENCES

1. Arstila A. J., Trump B. F.: Studies on Cellular Autophagocytosis: the Formation of Autographic Vacuoles in the Liver After Glucagon Administration. *Am. J. Pathol.* **53**, 687, 1968.
2. Barret A. J.: Lysosomal Enzymes. [in:] Dingle J. T.: Lysosomes. A Laboratory Handbook. North-Holland Publishing Co., Amsterdam—London 1972.
3. Bowers W. E., de Duve C.: Lysosomes in Lymphoid Tissues. II. Intracellular Distribution of Acid Hydrolases. *J. Cell. Biol.* **32**, 339, 1967.
4. Davidoff M. S.: Structure and Function of Lysosomes. *Medicina i Fiskultura*, Sofia 1981.
5. Hermelin B., Picard J.: Lysosomal N-acetyl- β -hexosaminidase and β -glucuronidase Activities from Arterial Wall. *Gerontology* **24**, 405, 1978.
6. Lowry O. H. et coll.: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Cell. Biol.* **75**, 166, 1977.
7. Peters T. J. et coll.: Lysosomes of the Arterial-Wall. I. Isolation and Subcellular Fractionation of Cells from Normal Rabbit Aorta. *J. Exp. Med.* **136**, 1117, 1972.
8. Peters T. J., de Duve C.: Lysosomes of the Arterial Wall. II. Subcellular Fractionation of Aortic Cells from Rabbits with Experimental Atheroma. *Exp. Mol. Pathol.* **20**, 228, 1974.
9. Pfeifer U.: Inhibition by Insulin of the Formation of the Autophagic Vacuoles in Rat Liver: a Morphometric Approach to the Kinetics of Intracellular Degeneration by Autophagy. *J. Cell. Biol.* **78**, 152, 1978.
10. Platt D.: Hyaluronidase, β -glucuronidase und β -acetylglucosaminidase Aktivität in normalen und arteriosklerotisch veränderten menschlichen Aorten. *Klin. Wochenschr.* **45**, 92, 1967.
11. Schmidt M. et coll.: Das Verhalten einiger lysosomaler Enzyme in der Leber nichtselektionierter und selektionierter Mäuse nach verschiedener Belastungen. *Internat. Congress Animal Hyg. Physiol.* (Hannover) **16**, 1984.

12. Umana C. R.: Stress and the State of Activation of the Neutral Proteinases of Rat Liver. *Roc. Soc. Exp. Bio. Med.* **157**, 385, 1971.
13. Wolinsky H. et coll.: Modification on the Effects of Hypertension on Lysosomes and Connective Tissue in the Rat Aorta. *Circ. Res.* **36**, 255, 1974.
14. Wolinsky H. et coll.: Arterial Lysosomes and Connective Tissue in Primate Atherosclerosis and Hypertension. *Circ. Res.* **36**, 553, 1975.
15. Wolinsky H. et coll.: Hydrolase Activities in the Rat Aorta. *Circ. Res.* **42**, 821, 1978.
16. Wójtowicz Z.: Budowa histologiczna, ultrastrukturalna i biochemiczna ściany tętnicy podstawnej u królika. AM. Lublin 1989.
17. Yamada E. et coll.: Cytochemical Investigation on Acid Phosphatase Activity in Cerebral Arteries in Spontaneously Hypertensive rats. *Jap. Circul. J.* **44**, 467, 1980.
18. Zemlenyi T.: Metabolic Intermediates, Enzymes and Lysosomal Activity in Aortas of Spontaneously Hypertensive Rats. *Atherosclerosis* **28**, 233, 1977.

Otrzymano 1992.01.25.

STRESZCZENIE

Badania przeprowadzono na 55 świniach rasy białej polskiej, spośród których 28 zwierząt przed ubojem głodzono i transportowano w ciągu 6 godz. (grupa I), natomiast 27 zwierząt zabito w sposób tradycyjny (grupa II). Oznaczono ilościowo aktywność enzymów lizosomalnych błony wewnętrznej i środkowej ściany tętnicy podstawnej. U świń zabijanych tradycyjnie największą aktywność wykazywała N-acetylo- β -D-glukozaminidaza, mniejszą — fosfataza kwaśna i β -galaktozydaza, a minimalną — lipaza i sulfataza. U zwierząt poddanych przed ubojem stresowi głodzenia i transportu stwierdzono wzrost aktywności badanych enzymów lizosomalnych.

