

# Оригінальні праці

УДК: 611-019-018.4:547.96

## СІАЛО- ТА ГАЛАКТОЗОСПЕЦИФІЧНІ ЛЕКТИНИ ЯК ГІСТОХІМІЧНІ МАРКЕРИ СТРУКТУРНИХ КОМПОНЕНТІВ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ У ПОРІВНЯЛЬНОМУ АСПЕКТІ

**О.Р. Джура**

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького  
Кафедра гістології, цитології та ембріології (зав. - проф. О.Д. Луцик)

### Реферат

**Мета.** Вивчити особливості зв'язування сіало- та галактозоспецифічних лектинів з вуглеводними детермінантами кісткової тканини на різних етапах постнатального онтогенезу у тварин та людини.

**Матеріал і методи.** У дослідженні використано стегнові кістки 30 морських свинок (guinea pigs), яких поділили на три вікові групи: I група - 3 місяці, II група - 1 рік, III група - 3 роки; у кожній групі було 5 самців та 5 самок, а також кісткова тканина (із ділянки верхньої передньої клубової ості) чоловіків та жінок чотирьох вікових груп: I група, (30-44 pp.), II група, (45-59 pp.), III група, (60-74 pp.), IV група, (75-90 pp.), окремо чоловіки (n=20) та жінки (n=20). Забарвлення гістологічних препаратів проводили гематоксилином та еозином, а також сіало- (WGA і SNA) та галактозо- (PNA і RCA) специфічними лектинами.

**Результати й обговорення.** Осемуюкід кісткової тканини як морських свинок, так й людини виявляв слабо позитивну реакцію із лектинами WGA, PNA та SNA. Залежно від віку та статі ми відмітили різний ступінь експонування лектинів SNA і RCA у складі остеогенних клітин людини, що обумовлено різним гормональним фоном. Показано різницю експресії рецепторів лектинів PNA, SNA між суглобовим хрящем та метаепіфізною пластинкою залежно від віку та статевий приналежності тварин. У лакунарно-каналцевій системі переважала експресія рецепторів лектинів RCA та SNA. Остеокласти виявляли спорідненість до сіало- і галактозоспецифічних лектинів SNA та PNA у всіх досліджуваних групах.

**Висновки.** У онтогенезі встановлено не лише вікову та статеву відмінність у експресії рецепторів досліджуваних лектинів, а також зниження їх нагромадження у структурних компонентах кісткової тканини тварин та людини.

**Ключові слова:** кісткова і хрящова тканина, рецептори лектинів, постнатальний остеогенез

### Abstract

SIALO- AND GALACTOSE-SPECIFIC LECTINS AS HISTOCHEMICAL MARKERS OF BONE TISSUE STRUCTURAL COMPONENTS

O.R. DZHURA

The Danylo Halytsky National Medical University in Lviv

**Aim.** To study the binding characteristics of sialo- and galactose-specific lectins to carbohydrate determinants of bone tissue at different stages of postnatal ontogenesis in animals and humans.

**Methods.** Bone tissues of guinea pigs and humans were examined. The animals were divided into three age groups

(three months old, one year old, and three years old), with five males and five females in each group. The men and women were divided into four groups: 30-44 years old, 45-59 years old, 60-74 years old, and 75-90 years old, with 20 men and 20 women. The histological preparations were stained with haematoxylin and eosin as well as by sialo- (WGA and SNA) and galactose- (PNA and RCA) specific lectins.

**Results.** Bone tissue osseomucoid of both guinea pigs and humans showed a slightly positive reaction with the lectins WGA, PNA, and SNA. Depending on age and sex, different degrees of staining with the lectins SNA and RCA in human osteogenic cells were noted, as expected with different hormonal backgrounds. There were also differences in the expressions of lectin receptors for PNA and SNA between articular cartilage and metaphyseal plate depending on age and sex. In the lacunary-calcium system, the expression of lectin receptors RCA ( $\beta$ DGal) and SNA (Neu5Ac/2 $\rightarrow$ 6Gal) was dominant. Osteoclasts showed affinity to the sialo- and galactose-specific lectins SNA and PNA in all groups studied.

**Conclusion.** The results showed that, in ontogenesis, there were sex difference in the expressions of the receptors of the lectins under study, as well as their decreased accumulation in the structural components of bone tissue of both animals and humans.

**Keywords:** bone, cartilaginous tissue, lectin receptor, postnatal osteogenesis

### Вступ

Вивчення метаболізму кісткової тканини має прикладне значення, зумовлене поширенням у світі остеопорозу, поставленого експертами ВООЗ на третє місце після серцево-судинних захворювань і цукрового діабету [4, 9, 13, 14, 18]. Вміст у міжклітинній речовині кісткової і хрящової тканин протеогліканів, глікопротеїнів та глікозаміногліканів спонукав дослідників до детального вивчення змін складу органічних сполук у процесі розвитку кісткової тканини шляхом інтрамембранного та енхондрального окостеніння в ембріогенезі та ранньому постнатальному періоді мишей, щурів та людини [7, 11, 21, 22]. Актуальними у цих дослідженнях залишаються методи вивчення глікокон'югатів із використанням лектинів різної вуглеводної специфічності [1, 3, 5, 15, 16, 17, 19]. У проведених раніше дослідженнях спектр використаних лектинів дозволив оці-

нити зміни експресії олігосахаридних глікокон'югатів при розвитку кісткової тканини на ранніх етапах онтогенезу [7, 21, 22]. Проте, спроби простежити за процесами остеогенезу та хондрогенезу у більш пізні періоди індивідуального розвитку у порівняльному аспекті залежно від статі у доступній нам науковій літературі знаходимо рідко.

Метою роботи було вивчення особливостей зв'язування сіало- та галактозоспецифічних лектинів з вуглеводними детермінантами кісткової тканини на різних етапах постнатального онтогенезу у порівняльному аспекті.

### Матеріал і методи

Для дослідження ми використали стегнові кістки 30 морських свинок (*guinea pigs*), яких поділили на три вікові групи: I група - 3 місяці, II група - 1 рік, III група - 3 роки; у кожній групі було 5 самців та 5 самок. Для одержання матеріалу тварин піддавали ефірному наркозу згідно "Правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин" та Наказу МОЗ України № 281 від 01.11.2000 р. "Про міри по подальшому вдосконаленню організаційних норм роботи з використанням експериментальних тварин". Автопсійний матеріал кісткової тканини (із ділянки верхньої передньої клубової ості) чоловіків та жінок різних вікових груп отримували у Львівському патолого-анатомічному бюро у процесі проведення поточних розтинів при відсутності в анамнезі та патоморфологічному заключенні хвороб, що могли вплинути на результати проведених досліджень. Весь матеріал було поділено на 4 вікові групи: I група, люди зрілого віку (30-44 pp.), II група, середній вік (45-59 pp.), III група, похилий вік (60-74 pp.), IV група, старечий вік (75-90 pp.), окремо чоловіки (n=20) та жінки (n=20). Матеріал фіксували у 4% нейтральному розчині формальдегіду впродовж доби, декальцинували у 7% розчині азотної кислоти, змінюючи його через кожні 48 год. та одночасно контролювали ступінь декальцинації препарувальною голкою. Із метою запобігання набуханню тканин і часткової нейтралізації матеріал переносили у 5% розчин алюмо-калієвих галунів на 48 год., промивали у водопровідній воді впродовж доби та заливали у парапласт, виготовляли серійні зрізи товщиною 7 мкм. Для загальногістологічних досліджень зафарбовували гематоксилином та еозином [6]. Для

проведення лектиногістохімічних реакцій використовували препарати лектинів, очищених із сировини Карпатського регіону, мічені пероксидазою хрому, отриманих у лабораторії "Лектино-тест" Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Серед них: лектин зародків пшениці, WGA (специфічний до NAcDGlc→NAc Neu), лектин бузини чорної, SNA (специфічний до Neu5Ac/2→6Gal), лектин арахісу, PNA (специфічний до  $\beta$ DGal→3DGalNAcDGal), лектин рицини, RCA (специфічний до  $\beta$ DGal), із наступною візуалізацією їх рецепторів у системі 3,3-діамінобензидин тетрагідрохлорид -  $H_2O_2$  [1, 10]. Контроль проводили за відсутності лектину в інкубаційному розчині. Аналіз здійснювали за інтенсивністю коричневого осаду у місцях локалізації пероксидази із використанням ліцензійної відеосистеми зображення AVerMedia.

### Результати й обговорення

Загальногістологічні дослідження кісткової тканини (КТ) морських свинок у ділянках діафізів та епіфізів кульшового та колінного суглобів виявили статеві відмінності, які виявлялися у різного ступеню осифікації у ділянках метаепіфізних пластинок (МЕП). Так, у самців МЕП зберігається ще на 1 році життя, тоді як у самок цього віку - зникає, що зумовлено високим катаболічним впливом андрогенів на процеси активного росту кісток у ділянках МЕП у самців та навпаки інгібіторною дією естрогенів у самок, що відповідає джерелам літератури [20]

Лектиногістохімічна оцінка КТ морських свинок та людини виявила низку спільних та відмінних рис вияву вуглеводних детермінант глікокон'югатів як у кістковому матриксі, так й у клітинному складі в онтогенезі та залежно від статі.

Характеризуючи вуглеводний спектр гіалінового хряща суглобових поверхонь (СП) помітили інтенсивне нагромадження глікополімерів у вигляді NAcDGlc→NAcNeu,  $\beta$ DGal→3DGalNAcDGal у найбільш периферійних його ділянках, поряд із помірним вмістом Neu5Ac/2→6Gal та  $\beta$ DGal у I групі тварин обох статей. Із віком у всіх III вікових групах, незалежно від статі, спостерігалось зниження ступеню експресії усіх перелічених лектинів. У процесі морфогенезу КТ в обох статей можна було побачити відмінності у нагромадженні глікополімерів у складі хондромукоїду суглобо-

вого хряща та МЕР. Так, незначним нагромадженням рецепторів лектинів WGA, PNA, RCA та SNA характеризувались хрящі СП самців та самок II групи, поряд із помірною їх експресією у хондромукоїді МЕР зон стовпчастого та пухирчастого хряща самців. Слід відмітити статеві відмінності в експресії рецепторів згаданих лектинів. Так, у самців I групи ступінь зв'язування рецепторів лектинів PNA, SNA у хондромукоїді МЕР був вищим ніж у самок; у II віковій групі МЕР зберігалася лише у самців, і ступінь експресії рецепторів лектинів дещо знижувався, що може свідчити про активність синтетичних процесів у хондробластах проліфераційних ділянок цього хряща порівняно із хрящем СП. Рецептори лектину WGA інтенсивно нагромаджувалися у перичелюлярному просторі хондроцитів.

Ми виявили помірно позитивну експресію рецепторів лектину PNA у першій віковій групі обох статей як у хондромукоїді усіх зон МЕР, так й у СП. Із віком ступінь нагромадження досліджуваних глікополімерів у міжклітинній речовині гіалінового хряща знижувався, зберігаючи при цьому якісну відмінність залежно від їх локалізації.

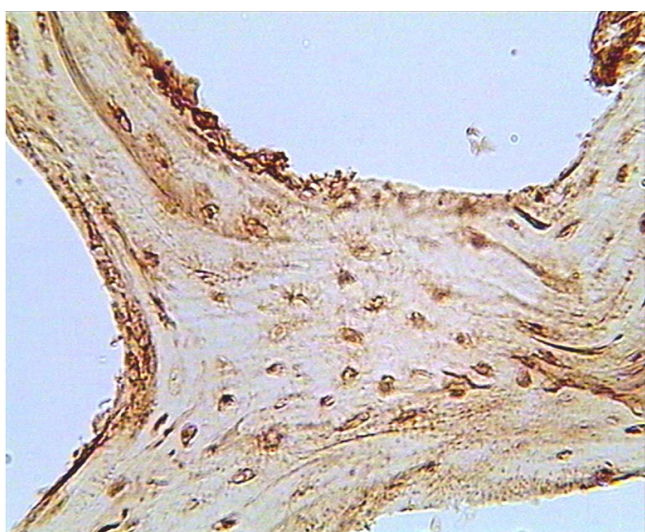
Із літературних джерел [7, 21, 22] відомо про високу концентрацію протеогліканів у капсулах ізогенних груп. Використані лектини вказали на значний вміст у них вуглеводних детермінант NAcDGlc→NAc Neu у ділянці СП, а також рецепторів лектину SNA (Neu5Ac/2→6Gal) усіх зон СП та МЕР. Слід відмітити високий ступінь

експресії рецепторів лектину SNA, та меншою мірою RCA у хондроцитах гіалінового хряща різних місць локалізації, що уможливило спостерігати мітотичні процеси у проліфераційних зонах росту (рис. 1).

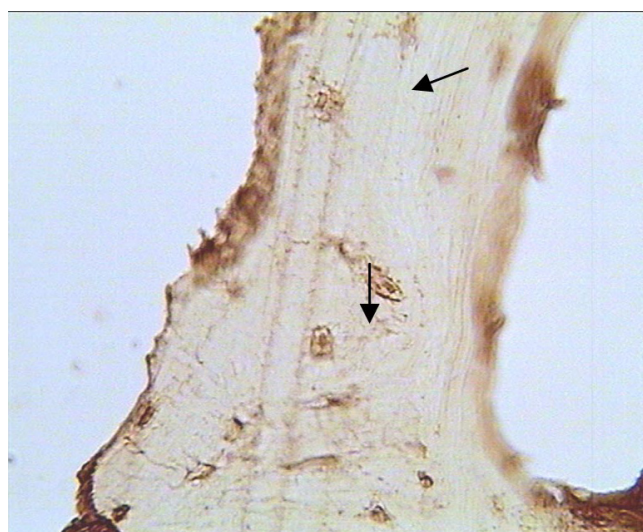
Осеомукоїд КТ морських свинок виявляв слабо позитивну реакцію із лектинами WGA, PNA, SNA. Подібну ареаактивність зв'язування цих лектинів виявляв осеомукоїд КТ чоловіків та жінок.

Внутрішня структура людських кісток утворена в основному кристалами гідроксиапатиту, склад якого містить 5-10%  $\text{CO}_3^{2-}$  і  $\text{HPO}_4^{2-}$  іони. Із віком спостерігається зменшення кількості фосфат-іонів, що зумовлено їх заміщенням карбонат-іонами [2]. Можливо це зумовлено зміною органічної складової КТ, оскільки відомо що кістковий сіалопротейн та остеопонтин кальцифікуються у блоки одразу після виходу у позаклітинне середовище при наявності невеликої к-ті у ньому колагену I типу. Остеокальцин з'являється пізніше, коли вступає у контакт із уже присутніми островами мінералізації та білками. Після замурування остеобластів у кістковий матрикс остеоцити продовжують синтезувати меншою мірою біглікан, тромбоспондин і остеокальцин, останній специфічний не колагеновий білок, що трапляється у великій кількості у КТ старих тварин. Вважається, що саме він у старшому віці є одним із чинників зростання кількості остеокластів та їх активації [14].

Слід відмітити, що островці хряща у про-



а



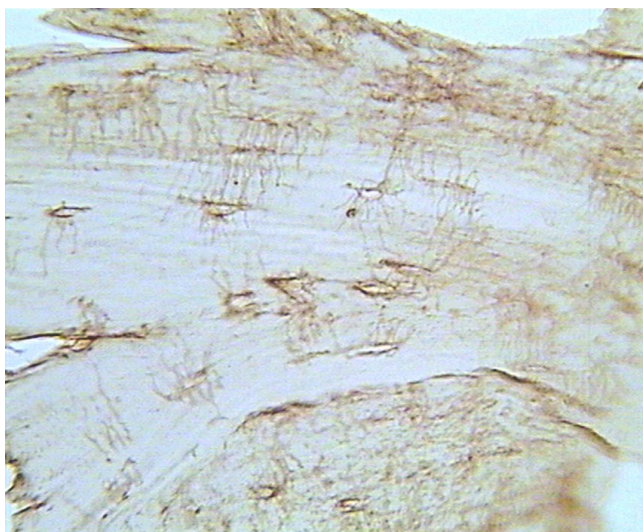
б

Рис. 1

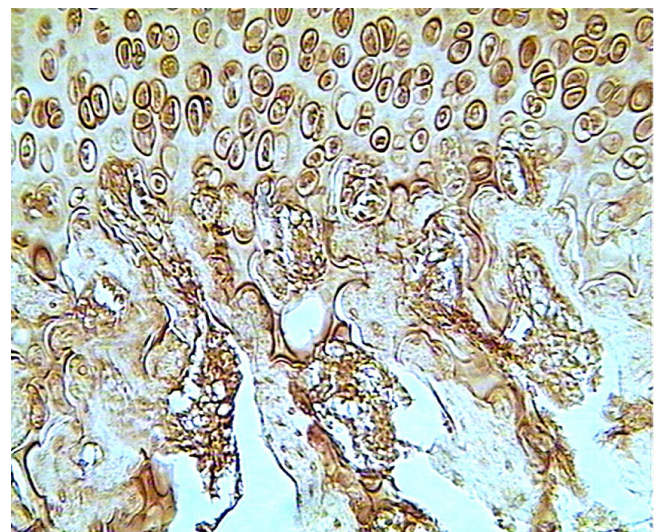
а - нагромадження рецепторів лектину RCA в остеоїді лакун та остеоцитах самців морських свинок III групи (зб.  $\times 600$ ); б - рецептори лектину WGA у складі остеоцитів КТ чоловіків IV вікової групи (зб.  $\times 600$ )

цесі кальцинації в окремих ділянках трабекулярної кістки активно виявлялися лектином SNA, у меншій мірі PNA та RCA, у II та III вікових групах кількість таких місць зв'язування помітно зменшувалася. Nakamura M. et al., 1989 [12] показали, що у процесі енхондрального окостеніння нижньо-щелепових відростків високий ступінь зв'язування галактозоспецифічного лектину маклюри яблуконосної (MPA) спостерігався у ділянках кальцинованого хряща та після деструктивних змін у лакунах хондроцитів, тоді як кістковий екстрацелюлярний матрикс залишався ареаактивним.

Ми виявили, що розташовані у лакунах остеокоти виявляли лектин-позитивну реакцію із SNA і RCA у морських свинок та SNA, RCA у жінок, а також WGA у чоловіків, причому переважно у людей старших вікових груп (рис. 1 а, б). Маскування NAcDGlс та зниження ступеню сіалізації поверхні остеокотів вказує на зниження функціональної активності їх із віком. Експресія рецепторів лектинів RCA, SNA та WGA у складі остеокоту дозволила також простежити розгалуження лакунарно-каналцевої системи КТ як тварин, так й людини (рис. 2 а). Наші дослідження щодо експресії N-ацетилнейрамінових та N-ацетилгалактозамінових глікоконюгатів в остеокоті лакун кісткової тканини при формуванні стегнових кісток морських свинок та людини різних вікових груп були подібні із дослідженнями [21], проведеними на коротких трубчастих кістках фаланг пальців пренатального періоду розвитку людини.



а



б

Рис. 2

а -рецептори лектину WGA у складі остеокоту та осеомукоїду КТ I групи жінок (зб.  $\times 600$ ); б - рецептори лектину SNA в лінії цементної КТ самців I групи (зб.  $\times 300$ )

яв редукції ступеню експресії олігосахаридних структур у складі позаклітинного матриксу як хрящової, так і кісткової тканини у динаміці онтогенезу, що співпадає із джерелами літератури [8, 12, 21, 22].

### Висновки

1. У онтогенезі встановлено зниження експресії рецепторів усіх використаних лектинів у структурних компонентах кісткової тканини як морських свинок, так і людини.
2. У процесі остеогенезу спостерігали статеву відмінність у експресії рецепторів досліджуваних лектинів.
3. Лектини SNA та PNA можна рекомендувати у якості маркерів остеокластів, а RCA та SNA - клітинних диферонів кісткової та хрящової тканини морських свинок, а RCA, SNA та WGA у людини із урахуванням віку та статі.

### Література

1. Antonjuk VA Lectins and their resources. Lviv: Quart. 2005. Ukrainian: (Антонюк В.О. Лектини та їх сировинні джерела. Львів: Кварт. 2005.)
2. Avrunyn AS, Tyhylov RM, Abolyn AB et al Levels mineral matrix organization kostnoy fabric and mechanisms, opredelyayuschie Options's formation. Morfolohyya. 2005; 127(2): 78-82. Russian: (Аврунин А.С., Тихилов Р.М., Аболин А.Б. и др. Уровни организации минерального матрикса костной ткани и механизмы, определяющие параметры их формирования. Морфология. 2005; 127(2): 78-82.)
3. Bilyu R, Nemesh L, Antonyuk V, et al. Apoptosis-related changes in plasma membrane glycoconjugates of peripheral blood lymphocytes in rheumatoid arthritis. Autoimmunity. 2009; 42(4): 334-336.
4. Carlos F, Clark P, Galindo-Suarez RM, Chico-Barba LG. Health care costs of osteopenia, osteoporosis, and fragility fractures in Mexico. Arch Osteoporos 2013; 8(1-2):125.
5. Gabius Y.J. The sugar code: fundamentals of glycosciences. Weinheim; John Wiley & Sons: 2009.
6. Goralsky LP, Khomich VT Kononsky OI Fundamentals of histological techniques and morphological methods in normal and pathological conditions. Zhytomyr: Polissya. 2005. Ukrainian: (Горальський Л.П., Хомич В.Т., Кононський О.І. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи дослідження у нормі та при патології. Житомир: Полісся. 2005.)
7. Grigorieva, EA Methodological Features izuchenii Structure articular cartilage in rat early postnatal ontogenesis peryodne. Problems, achievements and prospects of development of medical and biological sciences and virtually of Health. 2006, 142 (1): 13-15. Russian: (Григорьева Е.А. Методические особенности

изучения строения суставного хряща крыс в раннем постнатальном периоде онтогенеза // Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения. 2006; 142(1): 13-15.)

8. Kagayama M., Sasano Y., Akita H. Lectin binding in bone matrix of adult rats with special reference to cement lines. Tohoku J Exp Med. 1993; 170(2): 81-91.
9. Kolesnik M. Osteoporosis: Causes of development, path of correction. Ukr. Med. Journal. 2012. 20 March [Electronic publication] <http://www.umj.com.ua/wp-content/uploads/2012/03/Osteoporos.pdf?upload=> Russian: (Остеопороз: причины развития, пути коррекции. Укр. Мед. Часопис, 2012, 20 березня [Електронна публікація]) Дата останнього оновлення: March березень 2012. Дата останнього доступу: April квітень 2013.
10. Lutsyk AD, Detyuk ES, Lutsyk MD Lectins in histochemistry. Lions: Vyscha School. 1989. Russian: (Луцик А.Д., Детьюк Е.С., Луцик М.Д. Лектины в гистохимии. Львов: Выща школа, 1989.)
11. Mansson B., Carey D., Alini M., Ionescu M., Rosenberg L.C., Poole A.R., Heinegard D., Saxne T. Cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis. Differences between rapid and slow progression of disease identified by serum markers of cartilage metabolism. J Clin Invest. 1995; 95(3): 1071-1077.
12. Nakamura M., Akita H., Mizoguchi I., Kagayama M. A histochemical localization on Maclura pomifera lectin during osteogenesis. Histochemistry and Cell Biology. 1989; 92(3): 225-230.
13. Povorozniuk VV, Grigorieva NV, Tatartchuk T.F. Osteoporosis - "Silent epidemic". Health of Ukraine 2007; 3: 61. Ukrainian: (Поворознюк В.В., Григор'єва Н.В., Татарчук Т.Ф. Остеопороз - "Мовчазна епідемія". Здоров'я України, 2007; 3: 61.)
14. Riggs BL, Melton LJ, Robb RA, et al. A population-based assessment of rates of bone loss at multiple skeletal sites: evidence for substantial trabecular bone loss in young adult women and men. J Bone Miner Res. 2008; 23: 205-214.
15. Roth J. Lectins for histochemical demonstration of glycans. Histochem Cell Biol. 2011; 136: 117-130.
16. Sharon N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. J Biol Chem. 2007; 282: 2753-2764.
17. Shkandina TI, Dzhura OR, Overchuk MO, et al. Investigation of tracheal cell glycoepitopes with eight sialospecific lectins. Acta Medica Leopoli (Lviv). 2012; 18(1): 59-65. Ukrainian: (Шкандіна Т.І., Джюра О.Р., Оверчук М.О. та ін. Дослідження глікоепітопів клітин трахеї з використанням 8 сіалоспецифічних лектинів. Acta Medica Leopoliensia 2012; 18(1): 59-65.)
18. Tuchendler D, Bolanowski M. Assessment of bone metabolism in premenopausal females with hyperthyroidism and hypothyroidism. Endokrynol Pol. 2013; 64(1):40-44.
19. Varki A., Cummings R.D., Esko JD, et al. Essentials of glycobiology (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory

- Press: 2009.
20. Zapadnyuk IP, Zapadnyuk VI, Zaharyya EA Zapadnyuk BV Laboratornye animals. Kiev: High School. 1983. Ukrainian: (Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В. Лабораторные животные. Киев: Вища школа, 1983.)
21. Zschabitz A., Gabius H., Krahn V., Michiels I., Schmidt W., Koepf H., Stofft E. Distribution patterns of neoglycoprotein-binding sites (endogenous lectins) and lectin-reactive glycoconjugates during cartilage and bone formation in human finger. *Acta Anat (Basel)*. 1995; 154(4): 272-282.
22. Zschabitz A., Krahn V., Gabius H., Weiser H., Khaw A., Biesalski H., Stofft E. Glicoconjugate expression of chondrocytes and perichondrium during hyaline cartilage development in the rat. *JAnat*. 1995; 187(1): 67-83.