

**ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДІВ ЛЕКТИНОВОЇ ГІСТОХІМІЇ  
ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ПРОЦЕСІВ ФОРМУВАННЯ СУБХОНДРАЛЬНОЇ КІСТКИ****Запорізький державний медичний університет (м. Запоріжжя)****I\_monina@ukr.net**

Робота є частиною НДР кафедри анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії ЗДМУ «Реактивність органів новонароджених після дії антигенів та факторів різноманітної природи у внутрішньоутробному періоді», № державної реєстрації 01154003875.

**Вступ.** За даними сучасних досліджень, кісткова тканина характеризується активним метаболізмом, постійно оновлюється за рахунок процесів формування й резорбції, які залежать від багатьох факторів [4]. Так, кісткова тканина є мішенню для дії гормоноподібних речовин і гормонів, у тому числі для глюкокортикоїдів [4]. Високі дози гормону, в свою чергу, пригнічують проліферацію остеобластів, сприяють зменшенню їх розмірів, підвищують активність та кількість остеокластів, стимулюючи таким чином резорбцію кістки й розвиток остеопоротичних змін та як наслідок остеоартрозу [2]. В кістковому матриксі активується деградація колагенових волокон та порушується процес мінералізації [10]. На сьогодні відомо, що під дією глюкокортикоїдів порушується баланс кісткового ремоделювання в результаті прямого та опосередкованого впливу гормонів на клітини та матрикс кісткової тканини [3].

За останні десятиліття значно знизилася смертність серед недоношених новонароджених (24-26 тижнів), що багато в чому пов'язане з використанням в терапії глюкокортикоїдів при виникненні загрози передчасних пологів і призначенням сурфактанту після народження [8]. Однак навіть короткочасне призначення глюкокортикоїдів може на кілька десятиліть вперед «перепрограмувати» роботу функціональних систем плоду і негативно вплинути на формування поведінки, контроль артеріального тиску і на регуляцію обміну речовин [9]. Поза увагою дослідників залишаються морфологічні особливості формування і реактивності, субхондральної кістки після введення гідрокортизону протягом третього періоду вагітності.

Процес морфогенезу супроводжується змінами вуглеводно-рецепторного апарату інтра- і екстрацелюлярного матриксу. Лектини за рахунок селективності зв'язування з вуглеводними залишками, визнані найбільш інформативними молекулярними зондами, що дозволяють вивчати експресію глікокон'югатів на клітинній мембрані [1].

**Мета дослідження.** Описати особливості розподілу рецепторів до лектину арахісу в глибокій зоні

суглобового хряща та субхондральної кістці потовства щурів на тлі зміни гормонального статусу вагітних.

**Об'єкт і методи дослідження.** В роботі досліджено лівий колінний суглоб трьох груп щурів лінії Вістар від моменту народження до 180-ої доби життя (постачальник щурів «Біомодельсервіс» (м.Київ)). Перша група – інтактні щури, вагітним самкам другої групи в третьому триместрі вагітності вводили гідрокортизон в дозі 10 мг/кг. Вагітним самкам третьої, контрольної групи в третьому періоді вагітності вводили фізіологічний розчин. При роботі з експериментальними тваринами керувалися «Європейською конвенцією з захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 18.03.86). Щури народжувалися доношеними на 22-23 добу. Тварин виводили з експерименту на 14, 21, 28, 42, 60, 90, 120, 180 добу після народження. На кожен термін були досліджені 6 щурів від 5-6-ї виводків. Для гістологічного дослідження лівого колінного суглоба використовували стандартні набори НПК «ЛектинТест». Візуалізацію ділянок зв'язування лектину проводили в системі діамінобензидин-перекис водню. Для виявлення рецепторів до лектину арахісу використовували лектингістохімічну реакцію з лектином арахісу (PNA) [5]. Інтенсивність відкладеної бензидиновіткі оцінювали напівкількісно (+): +++ – сильна реакція (коричневий колір); ++ – помірна реакція (жовто-коричневий колір); + – слабка реакція (світло-коричневий або золотисто-жовтий колір); 0 – відсутність реакції.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Встановлено, що у процесі формування вторинного осередку окостеніння розподіл рецепторів до лектину арахісу на цитоплазматичній мембрані та у складі внутрішньоцитоплазматичних включень глибокої зони суглобового хряща та субхондральної кістки змінюються. Експресування вуглеводних залишків β-D-галактози на цитоплазматичній мембрані хондроцитів глибокої зони суглобового хряща динамічно змінюється у інтактної та контрольної груп від слабкої з 14-ї по 42-у добу життя до помірної на 60-у та 180-у добу життя, що співпадає з даними [6]. У експериментальних тварин з 14-ї по 60-у добу життя цитоплазматична мембрана хондроцитів глибокої зони суглобового хряща світло-коричневого кольору, на 90-у добу життя інтенсивність від-

кладення бензидинової мітки варіює від помірної до вираженої та на 120-у добу є вираженою. В інтактній та контрольній групах тварин PNA<sup>+</sup> з'єднання визначаються переважно в складі цитоплазматичної мембрани хондрокластів глибокої зони суглобового хряща. Так з 21-ї по 42-у та на 180-у добу життя інтенсивність варіює від помірної до вираженої, а з 60-ї по 120-у добу життя інтенсивність відкладення бензидинової мітки виражена. У експериментальної групи тварин як і в інтактній та контрольній груп з 21-ї по 42-у добу життя інтенсивність розподілу рецепторів до лектину арахісу на цитоплазматичній мембрані хондрокластів глибокої зони суглобового хряща варіює від помірної до вираженої, на 90-у та 120-у добу життя інтенсивність відкладення бензидинової мітки виражена, в той час як на 14-у та 60-у добу – слабка.

У інтактної та контрольній групах тварин з 21-ї по 90-у добу життя PNA<sup>+</sup> з'єднання визначаються переважно в складі цитоплазматичної мембрани (++) остеобластів субхондральної кістки, на 120-у добу інтенсивність відкладення бензидинової мітки на цитоплазматичній мембрані остеобластів варіює від помірної до вираженої. У експериментальній групі на 14-у та з 28-ї по 60-у добу життя інтенсивність розподілу PNA<sup>+</sup> – рецепторів на цитоплазматичній мембрані остеобластів субхондральної кістки помірна в той час як на 21-у та з 90-ї по 120-у добу життя на цитоплазматичній мембрані остеобластів субхондральної кістки спостерігається виражена експресія рецепторів, що містять вуглеводні залишки β-D-галактози. З 14-ї по 21-у та на 60-у добу життя у щурів інтактної та контрольної групи на цитоплазматичній мембрані остеоцитів субхондральної кістки виявляється помірна експресія рецепторів до лектину арахісу, з 28-ї по 42-у та з 90-ї по 120-у доби життя відмічається інтенсивне відкладення бензидинової мітки.

У нащадків щурів після введення гідрокортизону самкам в третьому періоді вагітності з 14-ї по 21-у та на 60-у добу життя цитоплазматична мембрана остеоцитів субхондральної кістки світло-коричневого кольору, з 28-ї по 42-у добу цитоплазматична мембрана остеоцитів жовто-коричневого кольору, та з 90-ї по 120-у спостерігається виражена експресія рецепторів до лектину арахісу на цитоплазматичній мембрані остеоцитів. Максимальна інтенсивність експресії PNA<sup>+</sup> рецепторів (++++) визначається на цитоплазматичній мембрані остеокластів інтактної та контрольної груп з 28-ї по 120-у добу життя, інтенсивність розподілу PNA<sup>+</sup> структур на цитоплазматичній мембрані остеокластів субхондральної кістки на 21-у добу життя варіює від помірної до вираженої. У тварин експериментальної групи з 14-ї по 120-у добу життя спостерігається виражена експре-

сія рецепторів до лектину арахісу на цитоплазматичній мембрані остеокластів субхондральної кістки, на відміну від інтактної та контрольної групи.

Інтенсивність розподілу рецепторів до лектину арахісу у складі кісткових трабекул субхондральної кістки зростає з 14-ї по 120-у добу життя у інтактної та контрольної групи спостереження, так з 14-ї по 21-у добу життя вона слабка, з 28-ї по 90-у добу життя експресія PNA<sup>+</sup> сполук помірна, на 120-у добу життя розподіл рецепторів до лектину арахісу варіює від помірної до вираженої та слабкої на 180-у добу життя. У нащадків щурів після введення гідрокортизону самкам в третьому періоді вагітності відмічається інтенсивність відкладення бензидинової мітки від слабкої до відсутності реакції на 14-у та 60-у добу життя, з 28-ї по 42-у добу життя інтенсивність варіює від слабкої до помірної, в той час як помірна інтенсивність розподілу рецепторів до лектину арахісу відмічається на 21-у та з 90-ї по 180-у добу, що узгоджується з даними.

У тварин інтактної та контрольної групи вуглеводні залишки β-D-галактози входять до складу рецепторів експресованих на структурах остеоїду субхондральної кістки. Так з 14-ї по 21-у, 42-у та з 90-ї по 120-у добу життя остеоїд субхондральної кістки жовто-коричневого кольору, на 28-у та 60-у добу життя від коричневого до жовто-коричневого кольору. У експериментальної групи тварин спостерігається помірне відкладення бензидинової мітки на структурах остеоїду субхондральної кістки з 14-ї по 21-у, 60-ї по 120-у добу життя (++), з 28-ї по 42-у та на 180-у добу життя інтенсивність розподілу рецепторів до лектину арахісу на структурах остеоїду варіює від помірної до вираженої.

### Висновки

1. При формуванні вторинного осередку окостеніння спостерігаються динамічні зміни експресії рецепторів до лектину арахісу на структурах субхондральної кістки, що формується.

2. Максимальна інтенсивність експресії рецепторів до лектину арахісу спостерігається на цитоплазматичній мембрані остеокластів субхондральної кістки та хондрокластів глибокої зони суглобового хряща досліджуваних термінів та груп спостереження.

3. У порівнянні з інтактною та контрольною групою у нащадків щурів після введення гідрокортизону самкам в третьому періоді вагітності у аналогічних термінах спостереження відмічається інтенсивніша експресія бензидинової мітки.

### Перспективи подальших досліджень

В подальшому буде вивчено розподіл рецепторів до лектинів зародків пшениці та сої у структурах субхондральної кістки.

## Література

1. Антонюк В.О. Лектини та їх сировинні джерела / В.О. Антонюк. – Львів: ПП “Кварт”, 2005. – 554 с.
2. Батура І.О. Регенерація кісткового дефекту в умовах тривалого введення гідрокортизону білим лабораторним щурам / І.О. Батура // Український морфологічний альманах. – 2006. – № 2. – С. 14-17.
3. Волошин Н.А. Влияние внутриутробного воздействия гидрокортизона на формирование морфо-функциональных зон суставного хряща крыс в раннем постнатальном периоде / Н.А. Волошин, Е.А. Григорьева // Вісник проблем біології і медицини. – 2006. – Вип. 2. – С. 190-193.

4. Ковешніков В.Г. Вплив підвищеного рівня глюкокортикоїдів та бісфосфоната "Зомета" на міцність кісток скелета білих щурів репродуктивного віку / В.Г. Ковешніков, В.І. Лузін, Л.В. Сткляніна // Вісник морфології. – 2006. – Т. 12, № 2. – С. 227-229.
5. Луцик А.Д. Лектины в гистохимии / А.Д. Луцик, Е.С. Детюк, М.Д. Луцик. – Львов: Вища школа, 1989. – 140 с.
6. Boileau Christelle Intracellular localization of Galectin-3 has a protective role. / Christelle Boileau, Françoise Poirier, Jean-Pierre Pelletier, Milanie Guivremont, Nicolas Duval, Johanne Martel-Pelletier // Ann Rheum Dis. – 2008. – 67. – P. 175-181.
7. Chi C.-C. Evidence-based (S3) Guideline on Topical Corticosteroids in Pregnancy / Chi Ching-Chi, G. Kirtschig, W. Aberer, J. – P. Gabbud, J. Lipozencic, S. Kopriviti, U.-F. Haustein, T. Zuberbier, F. Wojnarowska // The British Journal of Dermatology. – 2011 – 165 (5). – P. 943-952.
8. Kemp M.W. The clinical use of corticosteroids in pregnancy / M.W. Kemp, J.P. Newnham, J.G. Challis, A.H. Jobe, S.J. Stock // Human reproduction update. – Mar 2016. – 22 (2). – P. 240-259.
9. Kobayasi T. Dermal elastic fibres in the inherited hypermobile disorders / T. Kobayasi // J. Dermatol. Sci. – 2006. – Vol. 41 (3). – P. 175-185.
10. Toegel S. Glycophenotyping of osteoarthritic cartilage and chondrocytes by RT-qPCR, mass spectrometry, histochemistry with plant/human lectins and lectin localization with a glycoprotein / Stefan Toegel, Daniela Bieder, Sabine Andriy, Friedrich Altmann, Sonja M. Walzer, Herbert Kaltner, Jochen G. Hofstaetter, Reinhard Windhager, Hans-Joachim Gabius // Arthritis Research & Therapy. – 2013. – Vol. 15 – P. 147.

**УДК:** 611.7157.088.6

### **ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДІВ ЛЕКТИНОВОЇ ГІСТОХІМІЇ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ПРОЦЕСІВ ФОРМУВАННЯ СУБХОНДРАЛЬНОЇ КІСТКИ**

**Моніна О. В.**

**Резюме.** У роботі розглянуто розподіл рецепторів до лектину арахісу в субхондральній кістці щурів в ранньому постнатальному періоді онтогенезу. Досліджено лівий колінний суглоб трьох груп щурів лінії Вістар від моменту народження до 180-ої доби життя. Перша група – інтактні щури, вагітним самкам другої групи в третьому триместрі вагітності вводили гідрокортизон в дозі 10 мг/кг. Вагітним самкам третьої, контрольної групи в третьому періоді вагітності вводили фізіологічний розчин. Встановлено, що розподіл рецепторів до лектину арахісу на цитоплазматичній мембрані та в складі внутрішньоцитоплазматичних включень хондроцитів глибокої зони суглобного хряща та клітин субхондральної кістки динамічно змінюється в процесі диференціювання.

**Ключові слова:** лектин арахісу, остеоїд, субхондральна кістка, суглобовий хрящ, гідрокортизон.

**УДК:** 611.7157.088.6

### **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ ЛЕКТИНОВОЙ ГИСТОХИМИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПРОЦЕССОВ ФОРМИРОВАНИЯ СУБХОНДРАЛЬНОЙ КОСТИ**

**Монина Е. В.**

**Резюме.** В работе рассмотрено распределение рецепторов к лектину арахиса в субхондральной кости крыс в раннем постнатальном периоде онтогенеза. Исследован левый коленный сустав трех групп крыс линии Вистар с момента рождения до 180-о дня жизни. Первая группа – интактные крысы, беременным самкам второй группы в третьем триместре беременности вводили гидрокортизон в дозе 10 мг/кг. Беременным самкам третьей, контрольной группы в третьем периоде беременности вводили физиологический раствор. Установлено, что распределение рецепторов к лектину арахиса на цитоплазматической мембране и в составе внутрицитоплазматических включений хондроцитов глубокой зоны суставного хряща и клеток субхондральной кости динамически изменяется в процессе дифференцировки.

**Ключевые слова:** лектин арахиса, остеоид, субхондральная кость, суставной хрящ, гидрокортизон.

**UDC:** 611.7157.088.6

### **THE USE OF LECTIN HISTOCHEMISTRY METHODS TO STUDY THE PROCESSES OF FORMATION OF SUBCHONDRAL BONE**

**Monina E. V.**

**Abstract.** Peanut lectin receptors' distribution in the subchondral bone of rats in the early postnatal period of ontogenesis is examined in the work. It was studied a left knee joint of three groups of Wistar rats from birth to 180 days of life. First group – intact rats; pregnant female rats of the second group in the third trimester were administered hydrocortisone at 10 mg/kg. Pregnant females of the third, control group in the third period of pregnancy were injected with saline. It is found out that the distribution of peanut lectin receptors on the cytoplasmic membrane and in the contents of intracytoplasmic inclusions of chondrocytes of deep zone of articular cartilage and cells of subchondral bone changes dynamically during differentiation.

In intact and control groups of animals from 21- th to 90- th day life PNA<sup>+</sup> receptors are mainly localized on the cytoplasmic membrane (++) of subchondral bone osteoblasts, at 120-day deposits of PNA<sup>+</sup>-receptors on the cytoplasmic membrane of osteoblasts varies from moderate to minimal expression. In the experimental group on the 14th and 28th to 60 -th day of life the intensity of distribution of PNA<sup>+</sup>-receptors on the cytoplasmic membrane of subchondral bone osteoblasts is moderate, while on the 21st and 90th to 120th day life cytoplasmic membrane of subchondral bone osteoblasts is deeply colored (+++). From 14th to 21th and 60th day life in rats of intact and the control group in the cytoplasmic membrane of subchondral bone osteocytes revealed mild expression of PNA<sup>+</sup>

receptors, from 28th to 42th and 90th to 120-th day life it is marked an intense deposition of PNA<sup>+</sup>-receptors. In the offspring of rats after administration of hydrocortisone to pregnant rats during the third period of pregnancy from 14th to 21th and 60th day life cytoplasmic membrane subchondral bone osteocytes is light brown, at 28th to 42th day osteocytes cytoplasmic membrane are of yellow- brown color, and from 90th to 120th there is an intensive expression of peanut lectin receptors on the cytoplasmic membrane of osteocytes. The maximum intensity of PNA<sup>+</sup>-receptors' expression (+++) is determined on the cytoplasmic membrane of osteoclast of intact and control groups from 28th to 120th day of life, the intensity of distribution of PNA<sup>+</sup> structures on the cytoplasmic membrane of subchondral bone osteoclast on the 21st day of life varies from moderate to minimal express. In the experimental group of animals from the 14th to the 120th day of life there is a well-defined expression of peanut lectin receptors on the cytoplasmic membrane of subchondral bone osteoclasts, unlike intact and the control group. The intensity of distribution of receptors to peanut lectin consisting of bone trabecular subchondral bone increases from 14th to 120th day of life in the intact and the control groups. In the offspring of rats after administration of hydrocortisone to pregnant rats in the third period of pregnancy it is marked an intensive deposits of PNA<sup>+</sup>-receptors from a weak to a lack of response to the 14th and 60th day of life, from 28th to 42th day of life the intensity varies from mild to moderate in while moderate intensity distribution of peanut lectin receptors observed at the 21st and at the 90th to the 180th day. In the intact and controls animals the PNA<sup>+</sup> receptor are expressed on structures of osteoid of subchondral bone: from the 14th to the 21st, 42nd and 90th to 120th day of life osteoid of subchondral bone is yellow-brown, on the 28th and 60th day of life it is brown to yellow-brown. In the experimental group of animals it is observed a moderate deposition of PNA<sup>+</sup>-receptors on osteoid of subchondral bone structures of the 14th to 21th, 60th to 120th day of life (++), from 28th to 42nd and the 180th day after birth the intensity of distribution of peanut lectin receptors on osteoid structures ranging from mild to minimal express.

**Keywords:** Pea Nut lectin, osteoid, subchondral bone, articular cartilage, hydrocortisone.

*Рецензент – проф. Білаш С. М.*  
Стаття надійшла 02.03.2016 року