

Н.А. Шурыгина, М.Г. Шурыгин, Л.В. Родионова, В.Ф. Лебедев, Н.Н. Дремина

**КАРБОАНГИДРАЗА КАК МАРКЕР АКТИВНОСТИ ОСТЕОКЛАСТОВ
ПРИ РЕПАРАЦИИ ЗОНЫ ПЕРЕЛОМА ДЛИННОЙ КОСТИ***Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии СО РАМН (Иркутск)*

На экспериментальной модели перелома длинной кости изучена остеокластическая активность в зоне перелома. Применялись методы рутинной гистологической окраски и гистохимическое окрашивание с использованием антител к карбоангидразе II типа. Показано, что применение окрашивания на наличие в клетках карбоангидразы II типа перспективно для оценки остеокластической активности в костной ткани. Применение данной методики значительно упрощает проведение морфологического исследования, позволяет четко дифференцировать клетки преддифференцированные в остеокластическом направлении.

Ключевые слова: карбоангидраза, перелом, остеокласт

**CARBONIC ANHYDRASE AS A MARKER OF OSTEOCLAST ACTIVITY
IN THE REPAIR ZONE OF LONG BONE FRACTURE**

I.A. Shurygina, M.G. Shurygin, L.V. Rodionova, V.Ph. Lebedev, N.N. Dremina

Scientific Center of Reconstructive and Restorative Surgery SB RAMS, Irkutsk

In an experimental model of long bone fractures studied osteoclastic activity in the fracture zone. We used histological staining methods and histochemical staining with antibodies to carbonic anhydrase type II. It is shown that the use of histochemical staining to carbonic anhydrase type II cells is promising for the evaluation of osteoclastic activity in bone tissue. Application of this technique significantly simplifies the morphological study, allows a clear differentiation of osteoclastic cells.

Key words: carbonic anhydrase, fracture, osteoclast

Карбоангидразы — семейство цинк-содержащих металлоферментов, которые катализируют обратимое гидрирование CO_2 [4].

Карбоангидраза является мономерным, 1-цепочечным белком со средним молекулярным весом (30 kDa), не имеющим углеводных или фосфатных групп и дисульфидных связей [1].

Открыто 10 изоферментов карбоангидразы (I-VII, IX, XII и XIV) [2]. Они отличаются по тканевой специфичности, субклеточной локализации, кинетическим свойствам и восприимчивости к различным ингибиторам. Так, изоферменты I, II, III, VII, XIII локализируются в цитозоле, IV, IX, XII, XIV, XV связаны с мембранами, VA и VB обнаруживаются в митохондриях [1, 3].

Карбоангидразы вовлечены в различные физиологические процессы, включая дыхание, почечную ацидификацию, костную резорбцию, формирование водного баланса и церебральной жидкости и секрецию кислоты в желудке.

Карбоангидраза вовлечена во внеклеточную ацидификацию, необходимую для костной резорбции поверхности кости остеокластами. Дефект костной резорбции и общие нарушения костного ремоделирования характеризуются остеопетрозом. Ингибирование активности карбоангидразы уменьшает потерю минеральной плотности костной ткани при постменопаузальном остеопорозе [1].

Центральную роль в функции остеокласта и ремоделировании кости играет карбоангидраза II типа, катализируя формирование бикарбоната и протона. Наряду с рецептором кальцитонина,

кислой фосфатазой и металлопротеазой-9, карбоангидразу II считают маркером дифференцировки остеокластов. Остеокласты используют множественные механизмы создания кислого pH в лакуне резорбции. Карбоангидраза II и вакуольные H^+ -АТФ-азы производят и транспортируют протоны, в то время как хлоридные каналы доставляют Cl^- в место резорбции. Эти действия требуются для растворения неорганического матрикса, который предшествует ферментативному удалению органического костного матрикса. То есть, карбоангидраза участвует во внеклеточной ацидификации, необходимой для резорбции поверхности кости остеокластами.

Цель исследования: определить возможность оценки остеокластической активности при переломах костей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Полный поперечный перелом бедренной кости моделировали с использованием самцов крыс линии Wistar весом 220–250 г в возрасте 9 мес. ($n = 30$). Животные содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. Все исследования проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных целей (Страсбург, 1986) и требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к Приказу Минздрава СССР от 12.08.1977 г. № 755) согласно протоколу, одобрен-

ному Комитетом по биомедицинской этике НЦРВХ СО РАМН.

Крысы оперировали в стерильных условиях операционной под кетаминным наркозом (кетамин 50 мг/кг, дроперидол 2,5 мг/кг и атропин 0,4 мг/кг), вводимым внутривенно. Моделировали полный поперечный перелом бедренной кости на границе верхней и средней трети кости, фиксацию отломков осуществляли интрамедулярным введением штифта. Животных выводили из эксперимента на 3, 5, 9, 14, 21, 35-е сутки. Для морфологического исследования иссекали фрагменты конечности, включающие зону экспериментального воздействия с окружающими тканями. Фиксацию материала проводили в растворе FineFix (Milestone, Италия). Затем осуществляли декальцинацию и заливку в парафин. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином, а также проводили иммуногистохимическое окрашивание срезов. В качестве первичных антител применяли антитела к карбоангидразе II типа (Rabbit Monoclonal Antibody, Epitomics, Cat. N 5204-1, Lot Y10 32313 D, рабочее разведение 1:250). Докрашивали препарат раствором гематоксилина. Исследование проводили с использованием микроскопа Nikon 80i (Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При исследовании препаратов, окрашенных стандартными методами гистологической окраски, выявлено, что остеокластическая активность отмечается в зоне перелома с 9 суток, когда фиксируются единичные восьмиядерные клетки в зоне перелома и перестройки кости. На 14-е и 21-е сутки остеокластическая активность нарастает (рис. 1), а к 35-м суткам в зоне перелома наблюдаются только единичные остеокласты.

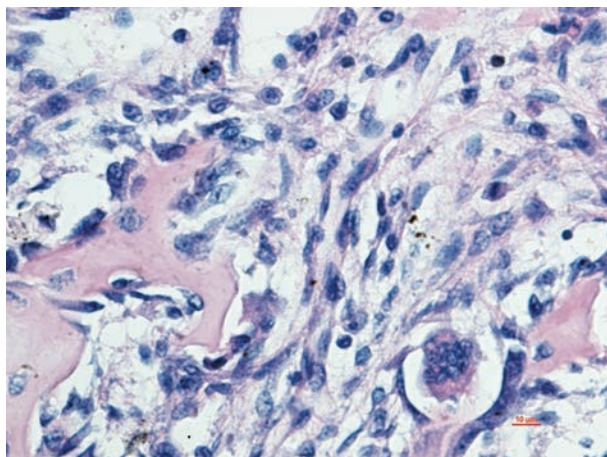


Рис. 1. Остеокласт в зоне перелома кости, 14-е сутки эксперимента, окраска гематоксилин-эозином.

При окрашивании на наличие в клетках карбоангидразы II типа выявлено, что остеокластическая активность в зоне перелома регистрируется в те же сроки, что и при рутинном гистологическом исследовании. Однако данное исследование позволяет выявлять не только окрашенные восьмиядерные клетки в зоне перелома, которые по

морфологическим признакам без труда можно классифицировать как остеокласты, но и выявлять положительно окрашенные клетки, которые по морфологическим признакам не являются типичными остеокластами (рис. 2). Так, при изучении области перелома в срок 14-е и 21-е сутки выявлялись ярко окрашенные одно- — четырехядерные клетки в зоне формирования молодой кости. Учитывая яркую специфическую окраску на наличие активности карбоангидразы II типа в данных клетках, можно утверждать, что использование окрашивания на наличие в клетках карбоангидразы II типа позволило выявить клетки преддифференцированные в остеокластическом направлении еще до формирования типичной морфологической картины, характерной для остеокластов.

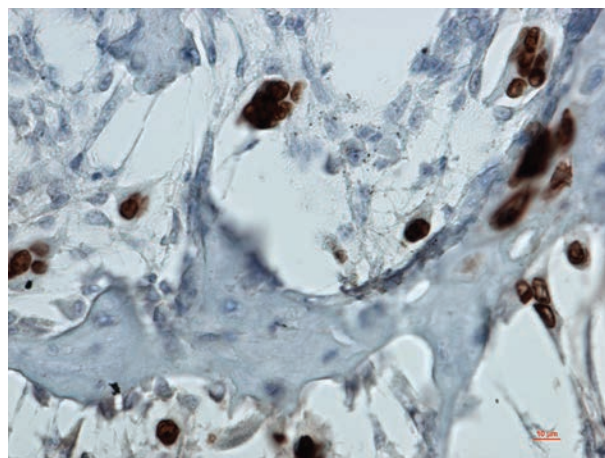


Рис. 2. Ярко окрашенные остеокласты и преддифференцированные в остеокластическом направлении клетки в зоне репарации кости, 14-е сутки эксперимента, иммуногистохимическая окраска, первичные антитела к карбоангидразе II типа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, применение окрашивания на наличие в клетках карбоангидразы II типа перспективно для оценки остеокластической активности в костной ткани. Кроме того, применение данной методики значительно упрощает проведение морфологического исследования, поскольку положительно окрашенные в темно-коричневый цвет клетки четко дифференцируются на фоне бледно-голубого окрашивания окружающих тканей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Krishnamurthy V.M., Kaufman G.K., Urbach A.R. et al. Carbonic anhydrase as a model for biophysical and physical-organic studies of proteins and protein-ligand binding // *Chem. Rev.* — 2008. — Vol. 108. — P. 946 — 1051.
2. Mori K., Ogawa Y., Ebihara K. et al. Isolation and characterization of CA XIV, a novel membrane-bound carbonic anhydrase from mouse kidney // *J. Biol. Chem.* — 1999. — Vol. 274, N 22. — P. 15701 — 15705.
3. Oksala N., Levula M., Pelto-Huikko M. et al. Carbonic anhydrases II and XII are up-regulated in osteoclast-like cells in advanced human atheroscle-

rotic plaques-Tampere Vascular Study // Ann. Med. — 2010. — Vol. 42, N 5. — P. 360—370.

4. Shah G.N., Hewett-Emmett D., Grubb J.H. et al. Mitochondrial carbonic anhydrase CA VB: differences

in tissue distribution and pattern of evolution from those of CA VA suggest distinct physiological roles // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2000. — Vol. 97, N 4. — P. 1677—1682.

Сведения об авторах

Шурыгина Ирина Александровна — доктор медицинских наук, заместитель директора по научной и инновационной деятельности, заведующая лабораторией патоморфологии Научного центра реконструктивной и восстановительной хирургии СО РАМН (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; тел.: 8 (3952) 29-03-38; e-mail: shurygina@rambler.ru)

Шурыгин Михаил Геннадьевич — доктор медицинских наук, заведующий научно-лабораторным отделом Научного центра реконструктивной и восстановительной хирургии СО РАМН (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; тел.: 8 (3952) 29-03-69)

Родионова Любовь Викторовна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии Научного центра реконструктивной и восстановительной хирургии СО РАМН (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; тел.: 8 (3952) 29-03-50)

Лебедев Виктор Федорович — кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник отделения лабораторной диагностики Научного центра реконструктивной и восстановительной хирургии СО РАМН (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; тел.: 8 (3952) 29-03-50)

Дремина Наталья Николаевна — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории патоморфологии Научного центра реконструктивной и восстановительной хирургии СО РАМН (664079, г. Иркутск, мкр. Юбилейный, 100; тел.: 8 (3952) 40-76-67)