

ІМУНОГІСТОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ ЕКСПРЕСІЇ КАТЕПСИНУ К ТА ОСТЕОПОНТИНУ КЛІТИННИМИ ЕЛЕМЕНТАМИ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ РЕГЕНЕРАТУ В УМОВАХ ВПЛИВУ ПРОТИПУХЛИННИХ ХІМІОПРЕПАРАТІВ

Медичний інститут Сумського державного університету (м. Суми)

t.riabenko@med.sumdu.edu.ua

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Стаття є фрагментом НДР кафедри морфології Медичного Інституту Сумського Державного університету «Морфофункціональні аспекти порушення гомеостазу організму», № державної реєстрації 0118U006611.

Вступ. Кісткова тканина безперервно оновлюється шляхом узгоджених дій кісткових клітин, які включають резорбцію кісток остеокластами та формування кісток остеобластами. При цьому остецити діють як механосенсори та регулятори процесу реконструкції кістки. Дисбаланс між резорбцією кістки (під впливом остеокластів) та її формуванням (під впливом остеобластів) призводить до втрати кісткової маси [1, 2].

Процеси кісткового ремоделювання відіграють важливу роль у пацієнтів з онкологічними захворюваннями. Адже відомо, що розвиток злоякісних пухлин в організмі спричиняє виникнення у переважній більшості пацієнтів кісткових ускладнень у вигляді остеопору, метастатичного ураження кісток та виникненням патологічних переломів [3, 4].

Відомо, що одним із основних методів лікування онкологічних захворювань на сьогодні є протипухлинна хіміотерапія. Цитотоксичні препарати призначаються курсами на значний проміжок часу у великих дозах. Тривале застосування протипухлинних хіміопрепаратів впливає на процеси фізіологічної та репаративної регенерації кісток [5, 6].

Процеси кісткового ремоделювання можна оцінити завдяки аналізу маркерів кісткової резорбції та маркерів синтезу кісткової тканини [7, 8, 9].

Одним із ферментів, що відіграють важливу роль у резорбції кісткового матриксу, є катепсин К. Він виділяється із зрілого остеокласту в «зону герметизації», багату актином. Це визначає зону резорбції кістки, де підкислене середовище здатне розчинити мінералізований компонент кістки [10]. Катепсин К – це єдина протеаза, яка здатна розщеплювати як потрійну спіраль, так і телопептиди колагенових волокон I типу, який становить приблизно 90% органічного матриксу кісток [11]. Він також може розщеплювати колаген типу II, переважний матриксний білок у хрящі та активувати матрикс-металлопротеїназу-9, яка необхідна для деградації кісткового матриксу [12, 13]. Окрім цього, катепсин К приймає участь у дефосфорильованні остеопонтина за рахунок активації остеокластів тарtrateзистентною кислотою фосфатазою. Це викликає пригнічення кісткової резорбції. Таким чином, катепсин К здійснює ауторегуляцію своєї активності через кислоту фосфатазу. У сукупності можна зробити висновок, що катепсин К необхідний для резорбції кісток, опосередкованої остеобластами [14, 15, 16].

Наступний маркер кісткового ремоделювання синтезується остеобластами. Це остеопонтін – неколагеновий білок, який бере участь в структурі та організації органічного і мінерального матриксу в кістці [17]. Він регулює зародження та ріст мінеральних кристалів кісток та є пізнім маркером мінералізації кісток [18].

Остеопонтін також є структурним елементом кісткового матриксу. Діючи як «клей» на межі розділу мінерал-колаген, він утворює міцні зв'язки, які можуть протистояти відокремленню мінералізованих колагенових фібрил і підвищувати в'язкість кісток. Тому зниження рівня цього маркера може призвести до виникнення тріщин у кістковій тканині та їх поширення, що погіршить в'язкість кісток [19].

Відомо, що остеопонтін в кістках регулює диференціацію, міграцію та активацію остеокластів, оскільки вважається, що він відіграє ключову роль у прилипанні остеокластів до кістки та утворенню пошкодженої зони під час процесу активної резорбції.

Результати останніх досліджень встановили, що остеопонтін діє як пригнічувач мінералізації у своєму фосфорильованому стані. Холлінг Ліндер та ін. показали, що фосфорильований остеопонтін зменшує мінералізацію, тоді як дефосфорильований – ні. Згідно із цими дослідженнями, остеопонтін повинен дефосфорильоватися TRAcP під час резорбції, щоб забезпечити нову мінералізацію кісткової тканини остеобластами [20].

Отже, остеопонтін є маркером мінералізації кісток та приймає участь у формуванні колагенових волокон, тому він може свідчити про формування або оновлення кісткової тканини.

Таким чином, вивчення імуногістохімічних маркерів кісткового ремоделювання в звичайній клінічній практиці дасть можливість для кращого визначення прогнозу та ризику розвитку кісткових ускладнень у пацієнтів з онкологічними захворюваннями.

Мета дослідження: на основі імуногістохімічного дослідження визначити експресію катепсину К та остеопонтину в травмованій стегновій кістці в умовах впливу протипухлинних хіміопрепаратів.

Об'єкт і методи дослідження. Для проведення експерименту було використано 96 білих лабораторних щурів-самців 7-місячного віку вагою 230±10 гр при дотриманні всіх правил гуманного відношення до тварин згідно вимог «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), Гельсінської декларації Генеральної асамблеї Всесвітньої медичної асоціації (Гельсінки, 2000) [21, 22].

Усім тваринам в умовах стерильної операційної під кетаміновим наркозом (50мг/кг) наносився дірчастий дефект діаметром 2мм шароподібною фрезою стоматологічного бору до кістково-мозкового каналу під охолодженням в ділянці середньої третини діяфізу стегнової кістки. Тварини були поділені на контрольну (n=24) та три експериментальні (I, II, III, n=72) групи. Тваринам експериментальних груп після нанесення травми вводили внутрішньоочеревинно протипухлинні хіміопрепарати: I-й експериментальній групі вводили доксорубіцин (60мг/м²), II-й-5 – фторурацил (600мг/м²), III-й – метотрексат (40мг/м²). Через кожну 21-у добу тваринам експериментальних груп повторювали введення відповідного хіміопрепарату на протязі усього експерименту. На 15-ту, 30-ту, 45-ту, 60-ту добу після травми тварин контрольної та експериментальних груп виводили з експерименту шляхом декапітації під глибоким кетаміновим наркозом (100мг/кг).

Імуногістохімічне дослідження проводили на парафінових зрізах (4×10-6м) декальцинованої тканини стегнових кісток щурів, які підлягали стандартній депарафінації та зневодненню у ксилолі та спиртах у знижуючих концентраціях. Демаскування антигенів проводили у водяній бані «ВБ-4» при температурі 97-98°C у цитратному буфері (рН-7,0). Реакція антиген-антитіло була візуалізована з використанням системи детекції «UltraVision Quanto Detection System HRP DAB Chromogen» («Thermo scientific», США), що включала блокування ендогенної активності пероксидази перекинем водню, блокування неспецифічного фонового забарвлення з використанням «Ultra 55 block», посилення реакції «Primary Antibody Amplifier Quanto» та кінцеву візуалізацію діамінобензидином (ДАБ) з дозбарвленням ядер гематоксиліном Маєра. У дослідженнях використана така панель антитіл («Thermo scientific», США) (табл. 1):

Таблиця 1 – Панель антитіл для ІГХ дослідження

Антитіло	Імунізована тварина	Клон	Розведення
Остеопонтін	Кролик	Поліклон	1:200
Катепсін К	Миша	Поліклон	1:200

Дослідження забарвленого імуногістохімічного препарату проводили за допомогою мікроскопа «Carl Zeiss Primo Star» (Німеччина) при збільшенні 50,

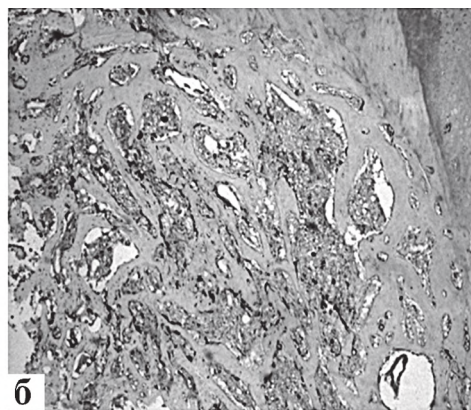
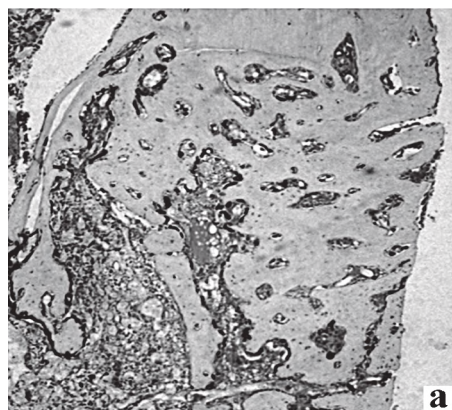


Рисунок 1 – Експресія катепсину К в ділянці кісткового регенерату: (а) в контрольній групі, (б) у тварин III експериментальної групи, яким вводили метотрексат на 15-ту добу експерименту. 36.: 50.

Таблиця 2 – Загальна оцінка імунореактивності клітин

Забарвлення (А), бали	Частка позитивно забарвлених клітин	Інтенсивність (Б), бали	Інтенсивність позитивно забарвлених клітин
0	Відсутність	0	відсутність
1	<1/100(<1%)	1	слабке
2	1/100-1/10(1-10%)	2	помірне/середнє
3	1/10-1/3(11-33%)	3	сильне
4	1/3-2/3(34-66%)		
5	>2/3(67-100%)		

100 та 200. Отримання та зберігання знімків проводили за допомогою цифрової камери « Zeiss AxioCfm ERc 5s» (Німеччина) з цифровим виходом зображення «ZEN 2 (blue edition) (Німеччина).

Оцінювали експресію вказаних маркерів за кількістю забарвлених клітин у кістковій тканині регенерату. Мікроскопічно визначалося коричневе забарвлення цитоплазми остеогенних клітин. Оцінка експресії вказаних маркерів проводилася за допомогою шкали Allred [23]. Це напівкількісна система оцінки показників в балах за двома ознаками (табл. 2): співвідношення позитивно забарвлених клітин (за шкалою 0-5) та інтенсивність забарвлення (за шкалою 0-3). Ці обидва показники підсумовували для отримання загальних балів експресії катепсину К та остеопонтину в кістковому регенераті травмованої стегнової кістки та материнській кістці, що до нього прилягала.

Статистичний аналіз отриманих показників (бали) проводили з використанням програмного пакету Statisticav.10 («StatSoftInc.», США) з використанням t-тест Ст'юдента. Достовірною вважали різницю при значенні p<0,05.

Результати досліджень та їх обговорення. У тварин контрольної групи на 15-ту добу експерименту в ділянці кісткового регенерату відмічалась виражена експресія катепсину К. Встановлено, що позитивна імунореактивність клітинних елементів була виражена в міжтрабекулярному просторі та ретикулофіброзній стромі. Маркер катепсину К виявлявся у 31,00±1,26% клітин, що свідчить про помірну проліферативну активність клітин (+++). Інтенсивність забарвлення цитоплазми – висока (+++).

Клітини в ділянці материнської кістки експресували катепсін К лише в поодиноких клітинах (5%), що свідчить про низьку проліферативну активність у цій ділянці. Інтенсивність забарвлення цитоплазми клітин оцінювалась як помірна (++) (рис. 1а).

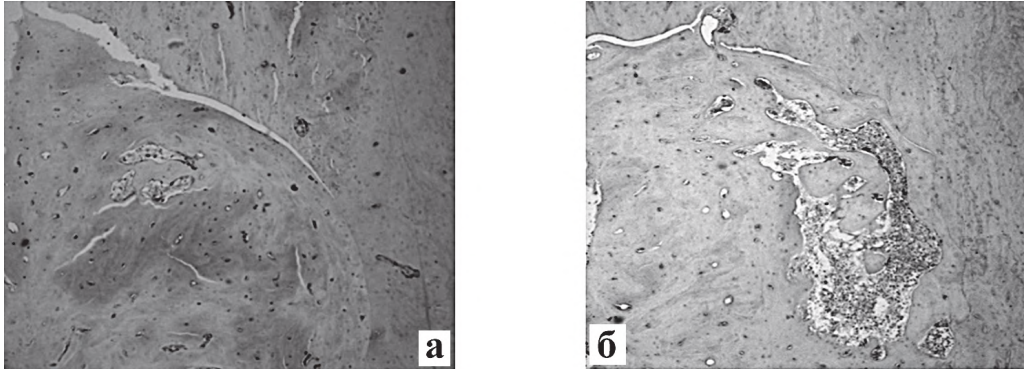


Рисунок 2 – Експресія катепсину К в ділянці кісткового регенерату на 60-ту добу експерименту: (а) у тварин II експериментальної групи, яким вводили 5-фторурацил, (б) у тварин III експериментальної групи, яким вводили метотрексат. 36.: 100.

На 30-ту добу експерименту експресія катепсину К була виявлена у $28,50 \pm 1,87\%$ остеогенних клітин регенерату, що говорить про помірну проліферативну активність клітин. Це на $8,06\%$ ($p=0,02$) менше, ніж у попередній термін експерименту. Інтенсивність забарвлення цитоплазми була помірна (++) . Отримані дані вказують на зниження інтенсивності процесів резорбції в кістковому регенераті та подальше формування остеогенних елементів у вигляді збільшення площі грубоволокнистої кісткової тканини та появи пластинчастої кісткової тканини. Підвищена експресія катепсину К була зафіксована переважно на периферії регенерату та в ділянках материнської кістки, що прилягали до регенерату.

На 45-ту добу експерименту в контрольній групі відмічалось подальше зниження експресії катепсину К. Він виявлявся у $25,17 \pm 1,47\%$ клітин, що на $18,81\%$ ($p<0,005$) менше, ніж на початку експерименту. Інтенсивність забарвлення цитоплазми клітин оцінювалась як низька (+). Зниження активності експресії катепсину К та її інтенсивності вказує на переважені процесів формування кісткової тканини в ділянці дефекту стегнової кістки над процесами резорбції.

На 60-ту добу експерименту експресія катепсину К спостерігалась у $22,67 \pm 1,63\%$ клітин кісткового регенерату, що на $9,93\%$ менше ($p=0,02$), ніж у попередній термін експерименту та на $26,84\%$ менше ($p<0,005$), ніж на 15 добу після перелому. Інтенсивність забарвлення цитоплазми клітин оцінювалась як низька (+). Це свідчить про активацію процесів проліферації в новоутвореному регенераті.

У тварин експериментальних груп на 15-ту добу експерименту експресія катепсину К була виражена наступним чином: у I групі маркер виявлявся у $33,17 \pm 1,94\%$ клітин, у II – $32,67 \pm 1,63\%$ клітин, у III – $33,83 \pm 1,47\%$ клітин. Це свідчить про високу проліфе-

ративну активність остеогенних клітин та активацію процесів резорбції в ділянці регенерату (рис. 16). Інтенсивність забарвлення цитоплазми – висока (+++).

На 30-ту добу експерименту експресія катепсину К у I групі становила $31,17 \pm 1,47\%$, у II – $30,67 \pm 1,37\%$, у III – $31,67 \pm 1,75\%$, що на $6,03\%$ ($p=0,12$), $6,12\%$ ($p=0,12$) та $6,38\%$ ($p=0,08$) відповідно менше, ніж у попередній термін експерименту. Однак, рівень експресії катепсину К у I, II та III групах у порівнянні з контролем був вищим на $9,37\%$ ($p=0,02$), $7,61\%$ ($p=0,04$) та $11,12\%$ ($p=0,01$) відповідно. Інтенсивність забарвлення цитоплазми остеоцитів залишалась високою (+++).

На 45-ту добу спостереження маркер катепсину К виявлявся в I групі у $29,50 \pm 1,87\%$ клітин, у II групі – у $28,50 \pm 1,05\%$, у III – $29,83 \pm 1,47\%$. Кількість імунопозитивних клітин в регенераті знизилась на $14,67\%$ ($p=0,38$), $11,68\%$ ($p=0,04$), $15,62\%$ ($p=0,03$) відповідно у порівнянні з 30-ю добою, але вона є вищою, ніж у контролі на $17,20\%$ ($p=0,0012$), $13,23\%$ ($p=0,0011$) та $18,50\%$ ($p=0,0002$) відповідно. Інтенсивність забарвлення цитоплазми остеоцитів була помірною (++) .

На 60-ту добу експерименту експресія катепсину К виявлялась у I групі у $28,50 \pm 1,87\%$ клітин, у II групі – у $26,67 \pm 1,63\%$, у III – $27,83 \pm 1,17\%$. Інтенсивність забарвлення цитоплазми була помірною (++) , як і в попередньому терміні експерименту (рис. 2. а, б). Відмічалось зменшення активності досліджуваного маркера у тварин усіх експериментальних груп, але даний показник був вищим на $25,72\%$ ($p<0,005$), $17,64\%$ ($p<0,005$) та $22,76\%$ ($p<0,005$) відповідно у порівнянні з контрольною групою.

Підвищений рівень катепсину К у тварин усіх експериментальних груп вказує на посилену резорбцію кісткової тканини регенерату при проведенні протипухлинної хіміотерапії та сприяє розвитку крихкості кісток (рис. 3).

Згідно останніх літературних даних, високі рівні активатору рецептора ліганду ядерного фактора к-(RANKL), необхідного для остеокластогенезу, посилюють експресію катепсину К. Це призводить не лише до втрати ендостальної кістки, але й обмежує формування окістя, викликаючи деградацію періостину, та ще більше сприяє крихкості кісток [24].

У свою чергу, дослідження наступного показника кісткового ремоделювання – остеопонтину показало, що у контрольній групі на 15-ту добу рівень його експресії в ділянці кісткового дефекту становив $18,17 \pm 1,47\%$, інтенсивність забарвлення імунопозитивних клітин була низькою. За даними літератури, остеопонтин відіграє важливу роль на ранніх стадіях

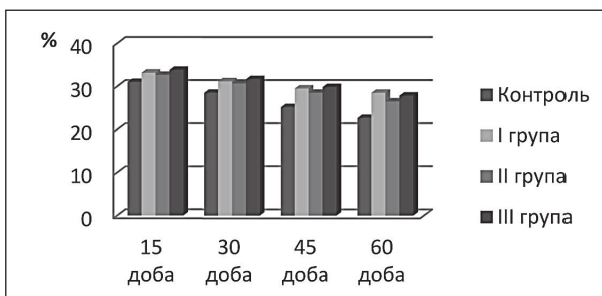


Рисунок 3 – Динаміка змін рівня катепсину К у ділянці дефекту стегнової кістки в контрольній та експериментальних групах: I – доксорубіцин, II – 5-фторурацил, III – метотрексат.

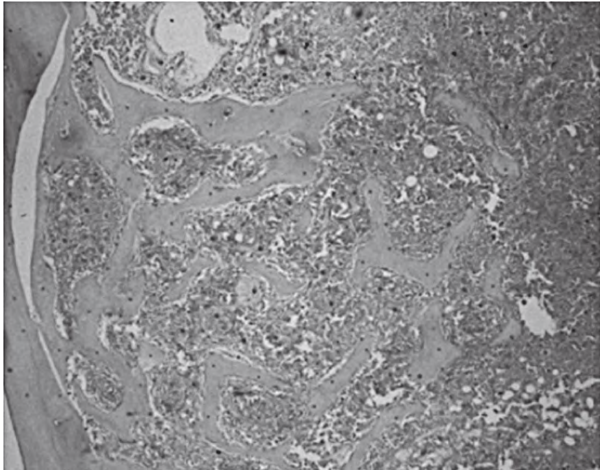


Рисунок 4 – Експресія остеопонтину в ділянці кісткового регенерату на 15-ту добу експерименту у тварин I експериментальної групи, яким вводили доксорубіцин. Зб.: 100.

репаративної регенерації шляхом регуляції ангиогенезу, необхідного для нормального раннього формування кісткової мозолі [25].

На 30-ту добу дослідження відмічалось збільшення кількості імунопозитивних клітин в межах $20,83 \pm 1,17\%$, що розташовані були переважно по краям регенерату. Інтенсивність забарвлення цитоплазми була низькою. За нашими даними, це свідчить про початок мінералізації новоутвореного кісткового матриксу в ділянці дефекту. Отримані результати підтверджують роботи Bailey S. et. al., в яких саме некалогеновим білком (остеопонтину, остеокальцину) клітинного матриксу належить провідна роль у біомінералізації кісткового матриксу та формуванні мікроархітектури кістки, що в подальшому знизить ризик виникнення переломів при лікуванні протипухлинними хіміопрепаратами [26].

На 45-ту добу показник експресії остеопонтину виявлявся у $24,00 \pm 1,41\%$ клітин, що на $13,21\%$ ($p=0,002$) більше, ніж у попередній термін експерименту. Інтенсивність забарвлення цитоплазми була помірною. Отримані дані можуть свідчити про зростання процесів мінералізації в регенераті.

60-та доба експерименту характеризувалась високою інтенсивністю забарвлення цитоплазми імуноактивних остеобластів, які рівномірно були розподілені у новоутвореному кістковому регенераті. Маркер остеопонтину був виявлений у цитоплазмі $26,67 \pm 1,21\%$ клітин, що на $11,12\%$ ($p=0,006$) більше, ніж у попередній термін експерименту та на $46,78\%$ ($p<0,005$) більшим, ніж на початку експерименту. Зазначені зміни є підтвердженням подальшої активної мінералізації у кістковій мозолі.

У тварин експериментальних груп були виявлені наступні значення показників експресії остеопонтину. Так, на 15-ту добу експерименту експресія цього маркера була слабо виражена в ділянці регенерату і становила у I групі $14,17 \pm 1,17\%$, у II групі – $15,83 \pm 1,17\%$, у III – $14,83 \pm 1,17\%$ (рис. 4). Інтенсивність забарвлення цитоплазми імунопозитивних клітин була низькою.

На 30-ту добу експерименту в усіх експериментальних групах лише окремі кісткові клітини, розташовані переважно на периферії регенерату, виявляли імунореактивність. При цьому рівень експресії

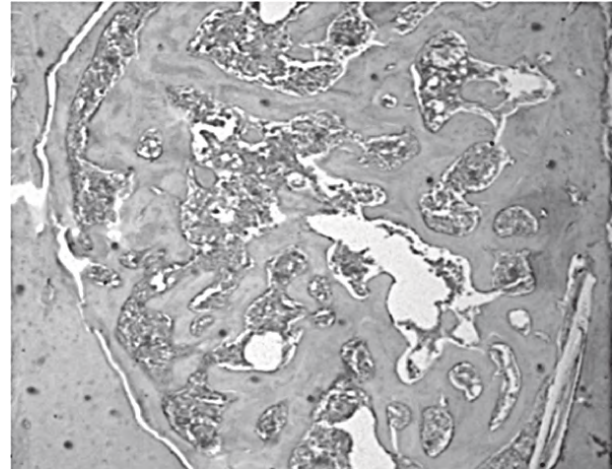


Рисунок 5 – Експресія остеопонтину в ділянці кісткового регенерату на 30-ту добу експерименту у тварин II експериментальної групи, яким вводили 5-фторурацил. Зб.: 100.

остеопонтину клітинами в ділянці регенерату становив у I групі $17,33 \pm 1,21\%$, у II групі – $18,50 \pm 1,05\%$, у III – $17,50 \pm 1,05\%$, що на $16,80\%$ ($p<0,005$), $11,19\%$ ($p<0,005$) та $18,15\%$ ($p<0,005$) відповідно нижче, ніж у тварин контрольної групи. Інтенсивність забарвлення їх цитоплазми була низька (рис. 5).

На 45-ту добу відмічалось незначне збільшення показника експресії остеопонтину, який у I групі виявлявся у $19,17 \pm 1,47\%$ клітин, у II групі – $21,67 \pm 1,21\%$, у III – $19,33 \pm 1,63\%$, що на $14,81\%$ ($p=0,003$), $13,74\%$ ($p=0,002$) та $12,93\%$ ($p=0,019$) більше, ніж на 30-ту добу після перелому та на $20,13\%$ ($p=0,0001$), $13,87\%$ ($p=0,0001$) та $19,46\%$ ($p=0,0003$) менше, ніж у контрольній групі. Імунопозитивні клітини зосереджені були переважно по краям кісткового дефекту. Інтенсивність забарвлення цитоплазми позитивно забарвлених клітин залишалась низькою.

60-та доба дослідження характеризувалась незначним зростанням рівня експресії остеопонтину у всіх експериментальних групах (рис. 6).

Так, експресія остеопонтину у I групі становила $21,17 \pm 1,47\%$ (рис. 7а), у II групі – $22,17 \pm 1,47\%$ (рис. 7б), у III – $20,83 \pm 1,17\%$. При цьому відмічалось значне його зниження на $20,62\%$ ($p<0,005$), $18,87\%$ ($p<0,005$) та $21,89\%$ ($p<0,005$) відповідно у порівнянні з контролем. Інтенсивність забарвлення цитоплазми імуноактивних клітин була помірна.

За останніми даними літератури, зляксіні епітеліальні клітини (нирки, молочна залоза та шкіра) здатні активно секретувати остеопонтин. Адже, цей некалогеновий білок регулює взаємодію клітин-ма-

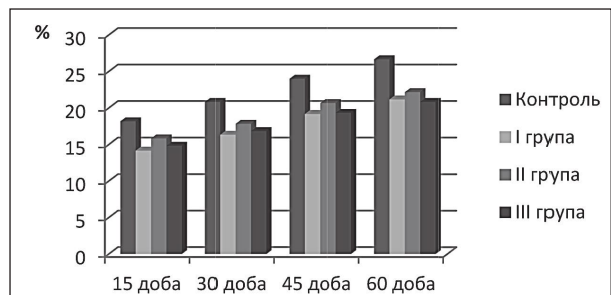


Рисунок 6 – Динаміка змін рівня остеопонтину у ділянці дефекту стгенової кістки в контрольній та експериментальних групах: I – доксорубіцин, II – 5-фторурацил, III – метотрексат.

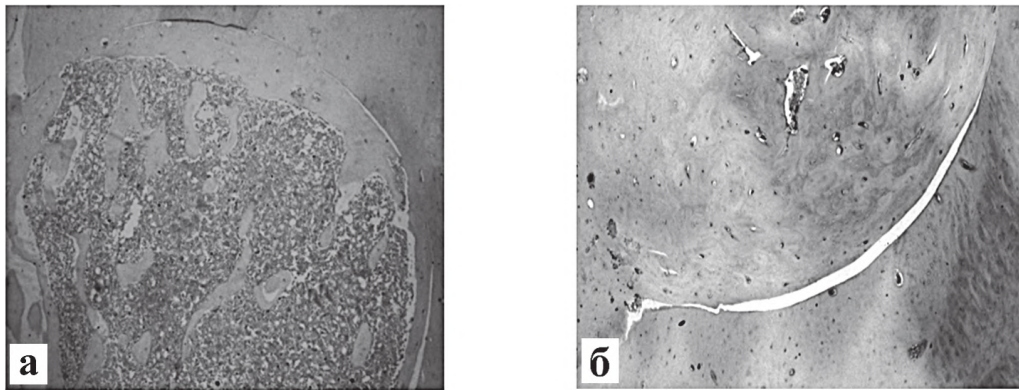


Рисунок 7 – Експресія остеопонтину в ділянці кісткового регенерату на 60-ту добу експерименту: (а) у тварин I експериментальної групи, яким вводили доксорубіцин, (б) у тварин II експериментальної групи, яким вводили 5-фторурацил. Зб.: 100.

триксу та передачу сигналів клітин через зв'язування з інтегринами та рецепторами CD44 і, отже, бере активну участь у зростанні та розвитку пухлини [27]. Тому визначення його рівня є важливим біомаркером в оцінці ефективності терапії онкологічного захворювання.

Висновки. На основі імуногістохімічного дослідження встановлено, що застосування протипухлинних хіміопрепаратів викликає підвищення експресії катепсину К в ділянці кісткового регенерату та прилягаючих ділянках материнської кістки, що свідчить про активацію остеокластогенезу та посилення процесів резорбції в кістковій тканині. Також відмічається зменшення рівня та активності остеопонтину в процесі репаративної регенерації, що призводить

до сповільнення формування кісткового регенерату в ділянці травми та низької його мінералізації. Тривале застосування протипухлинних хіміопрепаратів внаслідок активації остеокластогенезу та зниження функціональної активності остеобластів зумовлює посилену втрату кісткової маси. Це підвищує ризик виникнення переломів у пацієнтів з онкологічними захворюваннями при проведенні протипухлинної хіміотерапії.

Перспективою подальших досліджень буде вивчення морфологічних особливостей репаративної регенерації в умовах дії протипухлинних хіміопрепаратів за допомогою растрової електронної мікроскопії.

Література

1. Bahney CS, Zondervan RL, Allison P, Theologis A, Ashley JW, Ahn J, et al. Cellular biology of fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research*. 2019;37(1):35-50. doi: <https://doi.org/10.1002/jor.24170>.
2. Giannoudis PV, editor. *Fracture Reduction and Fixation Techniques*. Switzerland: Springer; 2018. Chapter 1, Fracture Healing: Back to Basics and Latest Advances; p. 3-17. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-68628-8_1.
3. Sturgeon KM, Mathis KM, Rogers CJ, Schmitz KH, Waning DL. Cancer and Chemotherapy Induced Musculoskeletal Degradation. *JBM plus*. 2019;3(3):e10187. doi: <https://doi.org/10.1002/jbpm.4.10187>.
4. Handforth C, D'Oronzo S, Coleman R, Brown J. Cancer Treatment and Bone Health. *Calcif Tissue Int*. 2018;102:251-264. doi: <https://doi.org/10.1007/s00223-017-0369-x>.
5. Riabenko TV, Ponyrko AO. Analiz vplyvu zloiakisnykh novoutvoren' na stan kistkovoï systemy ta poiava dii protypukhlynykh khimio-preparativ na reheneratsiiu kistkovoï tkanyny (ohliad literatury). *Bukovyns'kyi medychnyi visnyk*. 2020;24.1(93):242-249. [in Ukrainian].
6. D'Oronzo S, Stucci S, Tucci M, Silvestris F. Cancer treatment-induced bone loss (CTIBL): Pathogenesis and clinical implications. *Cancer Treatment Reviews*. 2015;41(9):798-808. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.09.003>.
7. Greenblatt MB, Tsai JN, Wein MN. Bone Turnover Markers in the Diagnosis and Monitoring of Metabolic Bone Disease, *Clinical Chemistry*. 2017;63(2):464-474. doi: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.259085>.
8. Ferreira A, Alho I, Casimiro S, Costa L. Bone remodeling markers and bone metastases: From cancer research to clinical implications. *BoneKEY Reports*. 2015;4:668. doi: <https://dx.doi.org/10.1038/bonekey.2015.35>.
9. Konukoglu D. Bone markers. *Int J Med Biochem*. 2019;2(2):65-78. doi: [10.14744/ijmb.2019.60362](https://doi.org/10.14744/ijmb.2019.60362).
10. Takito J, Inoue S, Nakamura M. The Sealing Zone in Osteoclasts: A Self-Organized Structure on the Bone. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(4):984. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms19040984>.
11. Dai R, Wu Z, Chu HY, Lu J, Lyu A, Liu J, et al. Cathepsin K: The action in and beyond bone. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020;8:433. doi: <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00433>.
12. Costa AG, Cusano NE, Silva BC, Cremers S, Bilezikian JP. Cathepsin K: its skeletal actions and role as a therapeutic target in osteoporosis. *Nat Rev Rheumato*. 2011;17:447-456. doi: <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.77>.
13. Christensen J, Vonwil D, Shastri VP. Non-invasive in vivo imaging and quantification of tumor growth and metastasis in rats using cells expressing far-red fluorescence protein. *PloS one*. 2015;10(7):e0132725. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132725>.
14. Drake MT, Clarke BL, Oursler MJ, Khosla S. Cathepsin K inhibitors for osteoporosis: biology, potential clinical utility, and lessons learned. *Endocrine reviews*. 2017;38(4):325-350. doi: <https://doi.org/10.1210/er.2015-1114>.
15. Okamoto K, Takayanagi H. Osteoimmunology: the conceptual framework unifying the immune and skeletal systems. *Physiological reviews*. 2017;97(4):1295-1349. doi: <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2016>.
16. Ono T, Nakashima T. Recent advances in osteoclast biology. *Histochemistry and cell biology*. 2018;149(4):325-341. doi: <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1636-2>.
17. Depalle B, McGilvery CM, Nobakhti S, Aldegaither N, Shefelbine SJ, Porter AE. Osteopontin regulates type I collagen fibril formation in bonetissue. *Acta biomaterialia*. 2021;120:194-202. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.04.040>.
18. Rodriguez DE, Thula-Mata T, Toro EJ, Yeh YW, Holt C, Holliday LS, et al. Multifunctional role of osteopontin in directing intrafibrillar mineralization of collagen and activation of osteoclasts. *Acta biomaterialia*. 2014;10(1):494-507. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.010>.
19. Si J, Wang C, Zhang D, Wang B, Hou W, Zhou Y. Osteopontin in bone metabolism and bone diseases. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. 2020;26:e9191591. doi: <https://doi.org/10.12659/MSM.919159>.
20. Linder HC, Ek-Rylander B, Krumpel M, Norgard M, Narisawa S, Millan JL, et al. Bone Alkaline Phosphatase and Tartrate-Resistant Acid Phosphatase: Potential Co-regulators of Bone Mineralization. *Calcified tissue international*. 2017;101(1):92-101. doi: <https://doi.org/10.1007/s00223-017-0259-2>.

21. Verhovna Rada Ukrainy. Evropeyska konventsia pro zahist hrebetnih tvarin, scho vikoristovuyutsya dlya doslidnih ta inshih naukovih tsiley. Strasburg, 18 bereznya 1986 roku: ofitsiyiniy pereklad [Internet]. Dostupno: http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994_137. [in Ukrainian].
22. Verhovna Rada Ukrainy. Zakon Ukrainy № 3447-IV vid 21.02.2006 «Pro zahist tvarin vid zhorstokogo povodzheniya» [Internet]. 2006. Dostupno: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15#Text>. [in Ukrainian]
23. Kukharuk VR. Alhorytmy heneruvannia imunohistokhimichnykh zobrazhen. Ternopil: Zakhidnoukrayins'kyi natsional'nyy universytet; 2020. 74 s. [in Ukrainian].
24. Bonnet N, Douni E, Perréard Lopreno G, Besse M, Biver E, Ferrari S. RANKL induced increase in cathepsin K levels restricts cortical expansion in a periostin dependent fashion: a potential new mechanism of bone fragility. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2021;2021:1. doi: <https://doi.org/10.1002/jbmr.4307>.
25. Duvall CL, Taylor WR, Weiss D, Wojtowicz AM, Goldberg RE. Impaired Angiogenesis, Early Callus Formation, and Late Stage Remodeling in Fracture Healing of Osteopontin-Deficient Mice. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2006;22(2):286-297. doi: 10.1359/jbmr.061103.
26. Bailey S, Karsenty G, Gundberg C, Vashishth D. Osteocalcin and osteopontin influence bone morphology and mechanical properties. *Ann N Y Acad Sci*. 2017;1409(1):79-84. doi: 10.1111/nyas.13470.
27. Wei R, Wong JPC, Kwok HF. Osteopontin – a promising biomarker for cancer therapy. *J Cancer*. 2017;8(12):2173-2183. doi: 10.7150/jca.20480.

ІМУНОГІСТОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ ЕКСПРЕСІЇ КАТЕПСИНУ К ТА ОСТЕОПОНТИНУ КЛІТИННИМИ ЕЛЕМЕНТАМИ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ РЕГЕНЕРАТУ В УМОВАХ ВПЛИВУ ПРОТИПУХЛИННИХ ХІМІОПРЕПАРАТІВ

Рябенко Т. В., Кореньков О. В., Понирко А. О., Теслик Т. П., Гула В. І.

Резюме. У пацієнтів з онкологічними захворюваннями відмічається високий відсоток виникнення переломів кісток, обумовлений розвитком порушень кісткового метаболізму в вигляді метастатичного ураження кісток, остеопорозу та виникнення патологічних переломів. У зв'язку з необхідністю призначення тривалих курсів протипухлинних хіміопрепаратів для лікування раку загоєння переломів у таких пацієнтів часто відбувається на фоні застосування цитотоксичної терапії. Тому метою нашого дослідження було вивчення активності маркерів резорбції та кісткоутворення в ділянці кісткового регенерату в умовах впливу протипухлинних хіміопрепаратів. Дослідження було проведене на лабораторних щурах, яким наносився дірчастий дефект діаметром 2мм в ділянці середньої третини діафізу стегнової кістки. Тварини були поділені на контрольну, а також три експериментальні групи, яким після нанесення травми вводили внутрішньоочеревинно протипухлинні хіміопрепарати: I – доксорубіцин (60мг/м²), II – 5-фторурацил (600мг/м²), III – метотрексат (40мг/м²). Через кожну 21-у добу тваринам експериментальних груп повторювали введення відповідного хіміопрепарату на протязі усього експерименту. На 15-ту, 30-ту, 45-ту, 60-ту добу після травми тварин виводили з експерименту. Застосовуючи імуногістохімічне дослідження визначали експресію катепсину К та остеопонтину клітинними елементами регенерату. Було встановлено, що протипухлинні хіміопрепарати посилюють експресію катепсину К в ділянці кісткового регенерату: доксорубіцин – на 25,72% (p<0,005), 5-фторурацилу – на 17,64% (p<0,005), метотрексат – на 22,76% (p<0,005) у порівнянні з контрольною групою на 60-ту добу експерименту. Поряд із цим, протипухлинні хіміопрепарати викликали зниження активності остеопонтину в кістковому регенераті: доксорубіцин – на 20,62% (p<0,005), 5-фторурацилу – на 18,87% (p<0,005) та метотрексат – на 21,89% (p<0,005) у порівнянні з контролем на 60-ту добу після травми. Найбільш виражений негативний вплив на формування кісткової мозолі відмічався при застосуванні метотрексату та доксорубіцину. Призначення протипухлинних хіміопрепаратів призводить до посилення процесів резорбції в кістковому регенераті внаслідок активації остеокластогенезу та зниження функціональної активності остеобластів, що сповільнює мінералізацію в ділянці перелому.

Ключові слова: кістковий регенерат, катепсин К, остеопонтин, протипухлинні хіміопрепарати.

IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF CATHEPSIN K AND OSTEOPONTIN EXPRESSION BY CELLULAR ELEMENTS OF REGENERATED BONE TISSUE UNDER THE INFLUENCE OF ANTITUMOR CHEMOTHERAPEUTICS

Riabenko T. V., Korenkov O. V., Ponyrko A. A., Teslyk T. P., Hula V. I.

Abstract. Patients with oncological diseases have a high percentage of bone fractures due to the development of disorders of bone metabolism in the form of metastatic bone lesions, osteoporosis and pathological fractures. Due to the need for long-term courses of anticancer chemotherapy to treat cancer, fracture healing in such patients often occurs with cytotoxic therapy. Therefore, the aim of our study was to study the activity of markers of resorption and bone formation in the area of bone regeneration under the influence of antitumor chemotherapeutics. The study was performed on laboratory rats, which were inflicted a perforated defect with a diameter of 2 mm in the middle third of the femoral shaft. Animals were divided into control and three experimental groups, which after injury were injected intraperitoneally with anticancer chemotherapeutics: I – doxorubicin (60 mg / m²), II-5 – fluorouracil (600 mg / m²), III – methotrexate (40 mg / m²). Every 21 days, the animals of the experimental groups were repeated administration of the appropriate chemotherapy throughout the experiment. On the 15th, 30th, 45th, 60th day after injury, the animals were removed from the experiment. Using immunohistochemistry, the expression of cathepsin K and osteopontin was determined by the cellular elements of the regenerate. It was found that antitumor chemotherapeutics increase the expression of cathepsin K in the area of bone regenerate: doxorubicin – 25.72% (p<0.005), 5-fluorouracil – 17.64% (p<0.005), methotrexate – 22.76% (p<0,005) compared with the control group on the 60th day of the experiment. In addition, antitumor chemotherapeutics caused a decrease in osteopontin activity in bone regenerate: doxorubicin-by 20.62% (p<0.005), 5-fluorouracil-by 18.87% (p<0.005) and methotrexate-by 21.89% (p<0,005) compared with the control on the 60th day after injury. The most pronounced negative effect on the formation of callus was observed with the use of methotrexate and doxorubicin. The appointment of antitumor chemotherapeutics leads to increased resorption processes in bone regenerate due to the activation of osteoclastogenesis and reduced functional activity of osteoblasts, which slows mineralization in the fracture site.

Key words: bone regenerate, cathepsin K, osteopontin, antitumor chemotherapeutics.

*Рецензент – проф. Проніна О. М.
Стаття надійшла 26.01.2021 року*