Kandidátusi értekezés

A csontszövet sejtes elemeinek lektin-hisztokémiai jellemzése, különös tekintettel az osteoclastokra

Dr. Illés Tamás

1994

D/16.626

Kandidátusi értekezés

A csontszövet sejtes elemeinek lektin-hisztokémiai jellemzése, különös tekintettel az osteoclastokra

Dr. Illés Tamás

1994

MAGYAR
TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
KÖNYVTÁRA

Tartalomjegyzék

Bevezetés 4.

Csontrendszer glikokonjugátumai 5.
Lektinek definíciója 6.
Lektinek monoszacharid specificitása 7.
Lektinek reaktivitása láncközi és elágazódó szénhidrátokkal 10.
Lektinek anomér specificitása 12.
A lektinkötés gátlása 12.
Nem szénhidrát eredetű lektinkötés 14.
Lektinek alkalmazása biokémiai, hisztokémiai célokra 15.
Előzmények 16.

Célkitűzések 20.

Anyagok és módszerek 21.

Vizsgálati anyagok 21.
Vizsgálati módszerek 23.
Dekalcinálás 25.
Klasszikus hisztokémiai eljárások 25.
Lektin-hisztokémia 25.
Előemésztés 28.
Blokkolás 28.

Eredmények 30.

Dekalcinálás hatása a lektinkötésre 30.
Embrionális csontok lektinkötése 31.
Kiérett csontok vizsgálata 43.
Óriássejtes folyamatok vizsgálata 48.
Osteoclastomák vizsgálata 51.
Nem ossificalo csont fibroma vizsgálata 59.
Osteoid osteoma vizsgálata 63.
Fibrosus dysplasia vizsgálata 67.
Myositis ossificans vizsgálata 71.
Osteogen sarcomák vizsgálata 77.

Megbeszélés 88.

Dekalcináló eljárások értékelése a lektinkötés függvényében 88.
A glikoprotein szintézis egyes lépései 89.
Az óriássejtek lektinkötése 95.
Az embrionális osteoclastok lektinkötése 95.
Érett osteoclastok lektinkötése 96.
Osteoclastok szerepe a csontlebontásban 96.
Az osteoclastok kettős megjelenésű lektinkötése 97.
Az osteoclastok PNA-kötő glikoproteinjének jellemzése 98.
A csontképző sejtek lektinkötése 99.
Az embrionális osteoblastok jellemzése 99.
Kiérett osteoblastok jellemzése 101.
Patológiás folyamatok lektinkötése 102.
Óriássejtek és eredetük 102.
Osteoclastomák 103.
Nem ossificalo fibroma 106.
Osteoid osteoma 107.
Fibrosus dysplasia 109.
Myositis ossificans 111.
Osteosarcomák 113.

Összefoglalás 117.

Köszönetnyilvánítás 119.

Irodalom 120.

Bevezetés

A csontszövet a támasztó szövetek egyik magasan differenciált formája, s mint ilyen, bonyolult szerkezeti és működési sajátságokkal bír. Mind a csontszövet szerkezetéről, mind annak működéséről szerzett ismereteink az utóbbi évtizedekben robbanásszerűen megszaporodtak (Parsons 1982). Ismerjük a csontszövet pontos felépítését (Vaughan 1970), az osteoblastos csontképzést, az osteoclastos csontlebontást, valamint ezek egymásra hatását (Rodan és Martin 1984) és ennek jelentőségét a csontújdonképződés (Sandberg és mtsai 1993) valamint a csontöregedés folyamatában (Marcus 1987). A szöveti szint mellett megismertük a csontképzés és lebontás sejtszintű hormonális regulációját (Raisz 1983, Raisz és Kream 1983). Molekuláris szinten ismerjük a csontszövet legnagyobb mennyiségű szerves alkotóelemének a kollagénnek felépítését, szintézisének mechanizmusát (Minor 1980, Vuorio és de Crombrugghe 1990). A molekuláris vizsgálatok során számos nonkollagén fehérjemolekulát (osteocalcin, osteonectin, bone morphogenetic protein) is felfedeztek (Heinegard és Oldberg 1990, Sandberg és mtsai 1993). Széleskörű ismeretekkel rendelkezünk a csontok felépítésében a kollagén molekulák után a legnagyobb jelentőséggel bíró szerves alkotóelemekről, a nagy molekulájú glikokonjugátumokról is. Ez nem meglepő, hisz a szénhidrátok egyrészről mint a biológiai struktúrák alkotói, építőelemei, másrészről mint tartalék tápanyagok, a biológiai mozgások energiaszolgáltatói kerültek a kutatások homlokterébe (Sharon 1980). A szénhidrátok egyik nagy csoportját - melyben (mono-,

oligo- vagy poliszaharidok) kovalens kötéssel kapcsolódnak más molekulatípusokhoz, elsősorban fehérjékhez vagy lipidekhez - glycokonjugátumoknak nevezzük.

Csontrendszer glikokonjugátumai

A csontrendszerben előforduló glikokonjugátumoknak két nagy csoportja ismeretes: a proteoglikánok és a glikoproteinek. A proteoglikánok olyan makromolekulák amelyekben fehérjéhez kötötten - ismétlődő diszaharida egységekből felépülő - hosszú cukorláncok találhatók. A diszaharida egységek egyik alkotóeleme mindig egy hexózamin (amely lehet glükózamin vagy galaktózamin) a másik alkotóelem pedig glükuronsav, iduronsav vagy galaktóz. A cukormolekulák nagy része szulfatált. Ezen, relatíve egyszerű szerkezetű, a csontrendszerben is nagy tömegben jelenlevő és így jól vizsgálható makromolekulák szerkezetéről, funkciójáról szerzett ismereteink az utóbbi időben robbanásszerűen megszaporodtak (Ruoslahti 1988, Módis 1991).

Nem mondható ez el a glikoproteinekről, a glikokonjugátumok másik nagy csoportjáról. A glikoprotein molekulákban szintén fehérjéhez kötötten rövid, többszörösen elágazódó szénhidrát láncok találhatók. Ezeknek a szénhidrát láncoknak az alkotásában számos 5 illetve 6 szénatomos cukor vehet részt. A fehérjékhez kötött cukorláncok biológiai szerepe igen változatos lehet (Sharon 1974, Móczár 1987):

- Stabilizálhatják a fehérjék másodlagos szerkezetét.
- Módosíthatják a fehérjék fizikai - kémiai tulajdonságait
- Szerepet játszhatnak a fehérjék funkcionális aktivitásának a kialakításában.

- Szerepelhetnek receptorként vagy reagálhatnak más receptorokkal.

-Módosíthatják a növekedési faktorok vagy az akceptor-receptor rendszerek működését.

- Lehetnek immundeterminánsok.

- Leárnyékolhatnak más immundetermináns molekulákat.

- Szerepet játszanak a sejt adhézió folyamatában.

A nagyrészt bizonyított, számos lehetőség ellenére a fehérjékhez kötött cukorláncok pontos élettani szerepe az esetek nagyobb részében még ismeretlen. Annak ellenére, hogy a modern hisztokémia kialakulását éppen a szénhidrátok kimutatására kidolgozott perjódsav-Schiff-reakció megjelenésétől számítjuk (Mc Manus 1946), a glikoproteinek oligosaccharid komponenseinek vizsgálata specifikus módszer hiányában nagy nehézségekbe ütközött. Jelentős előrelépést jelentett és alapvetően új ismereteket hozott a lektinek bevezetése a szénhidrátok vizsgálatába (Sharon 1977).

Lektinek definíciója

A lectinek felfedezése Stillmark (1888) nevéhez fűződik, aki megfigyelte, hogy a Ricinus communis növény kivonata - melyet: Ricinnek nevezett - humán és állati erythrocytákat agglutinál. Ebből a felfedezésből kiindulva a vércsoport antigének kutatása során Renkonen (1948) valamint Boyd és Reguera (1949) egymástól függetlenül bizonyították, hogy a lectinek hemagglutinációs képessége vércsoport specifikus. Ezen tulajdonság alapján alkotta meg Boyd és Schapleight (1954) a latin legere - választ, kiválaszt - szóból a lektin nevet. Watkins és

Morgan (1952) kimutatták, hogy a Lotus tetragonolobus lektin 0 vércsoportú erythrocytákra gyakorolt specifikus hemagglutinációs képessége L-fukózzal szelektíven gátolható. Igy derült fény a lectinek és a cukrok specifikus kapcsolatára.

A lektinek tehát olyan proteinek, melyek képesek az oligo- vagy poliszacharid láncok mono - és/vagy diszacharid molekuláinak specifikus felismerésére, majd receptoraik révén az azokhoz való kötődésre (Uhlenbruck 1971).

A lektin név mellett a leggyakrabban használt szinonima az agglutinin név, hisz a hemagglutináció a legszélesebb körben elterjedt metodika a lektinek identifikálására. Számos ellenvetés szól azonban az agglutinin név használata ellen, hisz hemagglutinálni vérsejteket más anyagok is képesek és a hemagglutinációs képesség a lektineknek csak egy tulajdonsága. Kiküszöbölendő a téves névhasználatot Goldstein és mtsai (1980) meghatározása a napjainkban elfogadott, miszerint a lektin olyan nem immun eredetű, szénhidrát kötő, növényi és/vagy állati fehérje, mely sejteket agglutinál és/vagy glikokonjugátumokat precipitál. Legalább két cukorkötő hellyel rendelkezik, nincs enzim aktivitása és lehet szolúbilis vagy membránhoz kötött.

Lektinek monoszacharid specificitása

A lektinek szénhidrát specificitását elsősorban a hemagglutináció gátlásban legaktívabbnak bizonyuló monoszacharid komponensek kimutatásával a Landsteiner-féle haptén inhibíciós teszt alapján határozták meg, hisz a legtöbb lektin reagál a sejtmembránok glikolipid vagy glikoprotein komponenseinek terminális szénhidrát molekuláival (Goldstein és

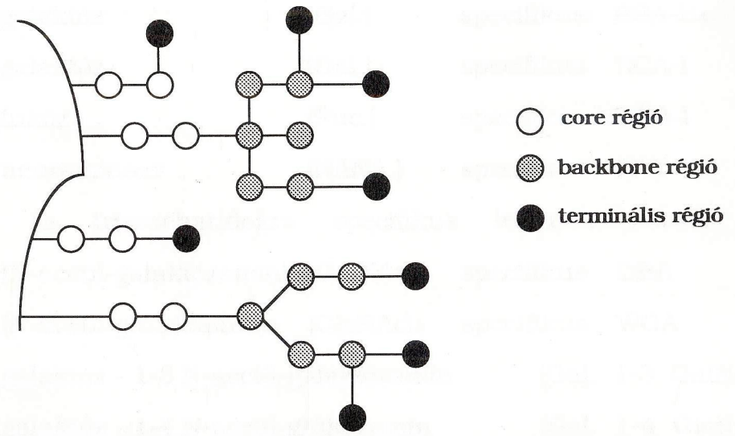
Hayes 1978). A teszt, melyben a lektinek hemagglutinációs képességét különféle szénhidrátokkal próbálták gátolni, magába foglalta a mindennapos sejtfelszíni oligoszacharidokat, a vércsoport specificitásért felelős, ill. a szénhidrátok belső szekvenciáiban előforduló cukrokat: Gal, GalNac, Glc, GlcNac, Man, Fuc, NeuNac. Figyelemre méltó azonban, hogy számos lektinkötés több cukorral gátolható effektíven és a legeredményesebb gátlás néha olyan komplex ill. szintetikusan előállított cukrokkal érhető el, melyek nem feltétlenül vannak jelen az élő sejtek felszínén. Jó példa erre az narancs fa lektin (Maclura pomifera, MPA) mely GalNac-ra specifikus, de ezerszer nagyobb effektivitással gátolható o- vagy p-nitrofenil-N-acetil-a-galaktózaminnal mint a GalNac-val (Goldstein és Hayes 1978). Számos egyazon szénhidrát specificitással rendelkező lektin eltérő affinitást mutat ugyanazon sejten vagy szövet struktúrán hisztokémiai preparátumokban (Hsu és Ree 1983). Fischer (1987) 4 különféle Gal. specifikus lektin (PNA, VAA, RCA-I, BSI-B_4) kötődését vizsgálva egér szöveti struktúrákon azt találta, hogy a különböző lektinek az eltérő szöveti komponensekhez néha egymásnak ellentmondó módon kötődnek. A fenti jelenség alapján megállapíthatjuk, hogy nincs két azonos nominális cukorspecificitású lektin, mely egymással teljesen azonos szöveti kötődést mutatna. E tényből azonban nem az következik, hogy a lektinek szöveti kötődéséből nem következtethetünk a reagáló struktúra kémiai szerkezetére, hanem ellenkezőleg arra kell következtetnünk, hogy az azonos névleges cukorspecificitású lektinek eltérő kötődése olyan finom különbségekre is rávilágíthat, mint a reagáló cukorkomponensek kötéstípusa, szubsztituáltsága, elágazódása, a szomszédos monoszacharidok szerkezete stb. Az eltérő lektin kötés az egyes

lektinek specificitásának pontos ismeretében megmagyarázható. A hemagglutináció gátlás alapján több szerző a PNA lektint egyértelműen a Gal. szöveti kimutatására ajánlja (Sato és Spicer, 1982 a,b). Részletes biokémiai vizsgálatok azonban kimutatták, hogy a PNA lektin 40-50-szer nagyobb affinitással kötődik a Gál.β1-3GalNAc diszacharidhoz (Pereira és mtsai. 1976), és 10-szer nagyobb affinitással az N-acetillaktózaminhoz (Wu 1984). Eme magas affinitás különbség valószínűvé teszi, hogy a PNA szöveti körülmények között, a lektin hisztokémiában alkalmazott 5 - 10 μg/ml lektinkoncentráció mellett csak a Gal.β1-3GalNAc diszacharidot tünteti fel. Másik kettő Gál. specifikus lektin (RCA-I, valamint BSI-B_4) eltérő szöveti kötődésére is van magyarázatunk. Ismert ugyanis, hogy míg az RCA-I nagyobb affinitással a végálló β–Gal.-hoz kötődik (Nicholson és mtsai. 1974) addig a BSI-B_4 a végálló α-Gal.-ra specifikus (Murphy és Goldstein 1977). Ezen eltérő kötődés eredményeként a Fabry- és Krabbe kórban tárolt glikolipidek diagnosztikus célokra is felhasználható elkülönítése vált lehetővé az RCA-I és a BSI-B_4 lektinek együttes alkalmazásával (Fischer és mtsai. 1987). A fentiek alapján egyértelmű, hogy a szövettani preparátumokon nem érdemes a gátló cukrok széles körét alkalmazni, hisz a monoszacharid gátlás adatai szöveti környezetben csak megközelítő becslésre adnak lehetőséget, az így szerzett biokémiai adatok pedig óvatossággal értékelendők. Hisz egyrészről azokban az esetekben amikor a lektin kötés nem gátolható teljes mértékben a lektinre specifikus cukorral, vagy különböző lektinekkel eltérő kötődés észlelhető ugyanazon szöveti struktúrán mindig felvetődik annak a lehetősége, hogy komplex szénhidrát reagál a lektinekkel. Másrészről ugyanazon cukor specificitású lektinek felismerik a szénhidrátok különféle felszíni

eltéréseit, mely szintén befolyásolhatja a szöveti kötődést (Petryniak és Goldstein 1986). A fenti alapján úgy gondoljuk, hogy a lektin hisztokémiai eredményekből a reagáló struktúra biokémiai szerkezetére csak a lektinek pontos kötődési mechanizmusának ismeretében következtethetünk. A lektin kötődés specificitásának vizsgálata napjainkban szintetikusan előállított di- és oligosaccharid komponensek felhasználásával ill. vércsoport anyagokról lehasított oligoszacharidok szerkezetének elemzésével intenzíven folyik (Pereira és Kabat 1979, Baenziger 1985, Lis és Sharon 1986).

Lektinek reaktivitása láncközi és elágazódó szénhidrátokkal

A fent említett kutatások egyértelműen bizonyították, hogy bár a legtöbb lektin elsődlegesen a terminális monoszacharidokkal



1. ábra: ***A glikokonjugátumok oligoszaccharid láncainak szerkezete***
(Fischer 1987)

reagál, számos közülük nem annyira a monoszacharidokhoz, mint inkább az oligosaccharid láncok különböző, rövidebb, hosszabb szakaszaihoz kötődik ill. néhány képes a láncközi szénhidrát molekulákat és/vagy az elágazódó láncokat is felismerni. Így ma már elkülöníthetők a sejtfelszini vagy a szekretált glikoproteinek végálló monoszacharidjaira specifikus, az elágazódó láncok közbülső szakaszára , az un. "backbone" régióra specifikus valamint a szénhidrát láncok fehérjékhez közvetlenül kapcsolódó un. "core" régiójára specifikus lektinek egyaránt (1. ábra) (Monsigny és mtsai. 1980, Yamamoto és mtsai. 1982, Baenziger 1985, Lis és Sharon 1986).

A terminális monoszacharidokra specifikus lektinek közül:

galaktóz	(Gal.)	specifikus:	BSA-B_4
galaktóz	(Gal.)	specifikus	RCA-I
fukóz	(Fuc.)	specifikus	UEA-I
neuraminsav	(NANA.)	specifikus	LPA

di - és triszacharidokra specifikus lektinek közül az:

(N-acetil-galaktózamin)$_2$	(GalNAc)$_2$	specifikus	DBA
(N-acetil-glükózamin)$_3$	(GlcNAc)$_3$	specifikus	WGA
galaktóz - 1-3 N-acetil-galaktózamin		(Gal. 1-3 GalNAc)	
galaktóz - 1-4 N-acetil-glükózamin		(Gal. 1-4 GlcNAc)	
		specifikus	PNA
difukozillaktóz		specifikus	LTA lektint

emelném ki.

A bacbone régióra specifikus lektinek közül csak a mannóz (Man.) kétágra oszló láncon reagáló Con A és az N-acetil-glükózamin hibrid láncon reagáló WGA lektineket emelném ki.

A core régióra specifikus lektinek közül nem vizsgáltunk egyet sem.

Lektinek anomér specificitása

Számos lektinnek igen kifejezett anomér specificitása van, míg mások nem ismerik fel a D-piranóz cukor különféle anomérjeit. A legjobb példa a Con A mely jól reagál a Man és Glc α-formáival, míg egyáltalán nem reagál a β-alakokkal. Másik ilyen hasonló példa az α-Gal. specifikus BSI-B_4 lektin, valamint a β–Gal. specifikus RCA-I lektin, mely lektinek eltérő kötődésének jelentőségét a tárolási betegségek diagnosztikájában már említettük (Fischer és mtsai. 1987). Más lektinek mint például SBA egyaránt reagál mind az α- mind a β- alakokkal (Pereira és Kabat 1979).

A lektinkötés gátlása

A specifikus lektinkötés gyakran több cukorral gátolható. Számos lektin elvisel bizonyos variációkat a piranóz gyűrű C-2-es szénatomán, igen kevés gyököt a C-3-as szénatomon és semmilyen oldalláncot nem visel el a C-4-es atomon (Pusztai 1987). A szerkezeti hasonlóság vagy differencia ezen három szénatomon magyarázatot ad a Man specifikus lektinek affinitására a Glc-hoz (pl: Con A, LCA). A legtöbb GalNac specifikus lektin reagál a Gál is. Viszont a Man/Glc specifikus lektinek nem reagálnak Gál/GalNac csoportba tartozó szénhidrátokkal, mely

észlelet bizonyítja, hogy a lektin kötést a szénhidrátok primer és szekunder szerkezete is befolyásolja (Pereira és Kabat 1979). Más lektinek, mint például az MPA lektin kötése 15-ször erősebben gátolható Forsmann antigénnel - melyben fehérjéhez kötötten egyetlen GalNAc molekula van jelen - mint tiszta GalNAc -val. Ez azt látszik bizonyítani, hogy a lektin kötés gátlásában a gátló cukrok tercier szerkezete is nagy jelentőséggel bír. Úgy gondoljuk, hogy a fenti példák alapján is egyértelmű, hogy a lektin-hisztokémia egyik legizgalmasabb területe a kötés gátlás. Az inhibíció szerepe ugyanis többes:

Egyrészről információt szolgáltat arról, hogy a lektin valóban valamilyen szénhidráthoz kötődött-e.

Másrészről meghatározható, hogy a kötő szénhidrát molekula mely szénatomja ill. azon milyen oldallánc köti a lektint.

Harmadrészről meghatározható a lektinkötés specificitása.

A felsorolt lehetőségek alapján tehát ismert szerkezetű természetes vagy mesterséges szénhidrátokkal végzett inhibíció alkalmazásával hisztológiai preparátumokon meghatározható a lektint kötő cukor pontos szerkezete (kötéstípus, az oldallánc típusa) melyen keresztül következtethetünk az illető cukormolekula szerepére.

Több lektinnel végzett hisztokémiai valamint kötés gátlás vizsgálat során hisztokémiai preparátumokon nyert eredmények szöveti struktúrákhoz köthetők, így mód nyílik a lektin hisztokémia alkalmazásával funkcionális morfológiai vizsgálatokra. A lektin hisztokémia ilyen irányú alkalmazása már eddig is számos új ismeretet hozott (Fischer 1987), azonban ezen vizsgáló eljárás a funkcionális morfológia terén a jövő egyik útját jelenti.

Nem szénhidrát eredetű lektinkötés

A lektinek számos nem szénhidrát eredetű, általában komplex molekulát is képesek megkötni. Ez a kötődés valószínűleg hidrofób ligandokon keresztül történik és fontos szerepet játszhat a növényekben melyekből a lektinek javarésze származik. Gyakori, hogy a lektineknek a cukorkötő helyük mellett hidrofób kötőhelyeik is vannak (Barondes 1981). Feltehetően ezen nehezen vizsgálható hidrofób kötődés lehet a lektinek in vivo szerepének egyik kulcsa.

Lektinek előfordulása, funkciói

Ma már több mint 100 különféle lektint izoláltak, melyek közül többnek az aminosav sorrendje is ismert. Annak ellenére, hogy Lis és Sharon lektinekről szóló 1973-ban összefoglalója óta (Lis, Sharon 1986) több tízezer publikáció látott napvilágot, a lektinek funkciója kevéssé tisztázott. Az eddigi vizsgálatok alapján számos helyen a lektinek jelenlétét feltételezik a normál és patológiás folyamatok alakításában. A feltételezések

mellett bizonyítottnak vehető (Barondes, 1981, 1984), hogy az endogén lectinek:

- Szerepet játszanak az intracellularis glikoprotein áthelyezésben
- Szerepet játszanak a baktériumok és az epithel sejtek kapcsolatában.
- Szabályozzák a szöveti differenciálódást.
- Szabályozzák a sejtmigrációt és adhéziót .
- Szerepet játszanak a macrophagok fagocitotikus és pinocitotikus tevékenységének a szabályozásában
- Szerepük van a tumorok metasztázis képzésében

Az exogén lectinek pedig a szénhidrát-biokémiai kutatásokat forradalmasították.

Lektinek alkalmazása biokémiai, hisztokémiai célokra

A morfológiai és biokémiai kutatások előtt Watkins és Morgan (1952) észlelete nyitotta meg az utat, akik rámutattak a lektinek specifikus cukor-kötő képességére. Azóta a lektinek széleskörű alkalmazásának eredményeképpen számos új eredmény született, melyek forradalmasították a szénhidrátok biológiai funkciójáról alkotott korábbi ismereteket. A kutatások többek között bizonyították, hogy:

- Különbség van a sejtmembránok oligoszacharid komponenseinek szerkezetében a sejtek normál differenciálódásának különféle stádiumaiban (Tettoroo és mtsai 1984).

- A sejtek egyedi életciklusa is jellemezhető eltérő lektin kötésük alapján (Lustig és Pluznik, 1983).

- A normál és daganatos sejtek, valamint a metasztatizálásra hajlamos és kevésbé metasztatizáló sejtek glikozilációjában is kefejezett különbségek lehetnek (Aub és mtsai 1963).

- A normál és daganatos sejtek közötti eltérő glikoziláció mind csökkent, mind fokozott glikoziláció lehet (Santer és mtsai 1984).

- Bizonyítottnak vehető, hogy a fehérjék intracelluláris transzportja, raktározása, a szekretálódásuk szabályozása glikozilációs különbségeik alapján valósul meg (Baenziger 1985).

- Lektinek segítségével eltérő glikozilációjuk alapján egyes sejtcsoportok elkülöníthetők egymástól (Perreira és Kabat 1979).

- Végezetül a különböző lektinek segítségével eddig ismeretlen glikoprotein molekula jelenléte, intracelluláris elhelyezkedése, esetleges funkciója válik vizsgálhatóvá (Damjanov 1987).

Előzmények

A lektin-hisztokémiai vizsgálatok nem előzmény nélküliek a csontpatológiai kutatásokban. elsősorban a csontok embrionális fejlődésének vizsgálatáról jelentek meg publikációk.

Elsőként Zimmermann és Thies (1984) számoltak be a chondrogenesis során végzett kutatásaikról. 10 és 13. napos

embrionális korban végezték vizsgálataikat. Megállapították, hogy a mannóz specifikus Con A lektin legerősebben a 10. napon reagál mind az mesenchymalis, mind a chondrogeneticus blastema sejtekben, majd aktivitása kismértékben csökken. A Con A lektin jelölődésével párhuzamosan mindkét sejttípusban megjelent a WGA lektin pozitivitás. A földimogyoró lektinnel csak a chondrogen blastema reagált, a mesenchymalis sejtek nem. A későbbi embrionális korban a lektinkötés jelentősen csökkent mindkét sejttípusban. A szerzők megállapítják, hogy a korai embrionális korban a sejtek kifejezetten kötnek különböző lektineket, majd az érés során a lektinkötés intenzitása csökken.

Hasonló észleleteket tett Milaire (1991) szintén embrionális egér femurokat vizsgálva. 9 és 16 napos embrionális korú egereken tudott csak lektin reakciót kimutatni. A 16. nap után jelölődést egyetlen esetben sem észlelt. Biotinilált lektineket használva Con A, WGA kötődést tudott kimutatni a differenciálatlan mesenchymában, Con A, WGA, RCA, és PNA reakciót tudott kimutatni a makrophagokon. A PNA reakciót csak neuraminidáz emésztés után detektálta. Ekkor azonban nemcsak a makrophagok, hanem a perichondralis pre-articularis régióban is erős reakciót észlelt.

Kiérett szöveteken a lektineket legelterjedtebben azonban a porcszövet nagy molekulájú glikokonjugátumainak, az un.: glükóz-amino-glikánoknak (GAG) vizsgálatára ajánlják (Spicer és mtsai 1983, Nakamura és mtsai 1989). A sejtes elemek vizsgálata is csak a porcok alkotásában résztvevő nagy molekulájú glikokonjugátumokhoz kapcsolódóan történt (Takagi és mtsai 1983). Farnum és munkatársai (Farnum 1985, Farnum és

Wilsman 1986) először végeztek módszeres lektinkötés vizsgálatokat növekedési porcok chondrocytáiban és alapállományában meghatározandó a sejtek ill. alapállomány glikokonjugát tartalmát. Először sikerült porcsejtek endoplazmás retikulumában Con A kötődést kimutatni, mely igen kifejezett mannóz tartalomnak tulajdonítható. A sejtek Golgi-komplexéhez kapcsolódóan számos egyéb lektin kötést is sikerült kimutatniuk bizonyítva a sejten belüli glikokonjugátum transportot.

A porc alapállomány vizsgálata során észlelt territoriális lektinkötés alapján véleményt alkottak a csontosodási folyamatokban résztvevő glikokonjugátumok funkciójáról. Farnum és munkatársai úttörő munkája mely új lehetőséget nyitott a porcok patomorfológiai és biokémiai vizsgálatai előtt rávilágítottak a lektin-hisztokémia jelentőségére a csontpatológiai kutatásokban.

A fenti észleletekre alapozva végezték Wick és mtsai vizsgálataikat dedifferenciált chondrosarcomákon, osteosarcomákon valamint malignus fibrosus histiocytomákon. (Wick és mtsai 1987). α-1-antichymotrypsin, α-1-antitrypsin, lizozim és PNA lektin meghatározás során osteosarcomában egyetlen esetben sem találtak reakciót.

Takagi és mtsai (1988) szöveti környezetben majd izolált proteoglikánokon végzett lektinkötés vizsgálatokat. Kondroitináz emésztés nélkül nem észlelt reakciót PNA lektinnel míg kondroitináz emésztés után kifejezett, a Golgi-ciszternákra lokalizált reakciót volt detektálható a porcsejtekben. Ez azt bizonyítja, hogy a PNA lektin kötő helyek maszkírozva vannak kiérett porcszövetben, mely csak emésztés után válik szabaddá.

Ezen alapvető munkákat azonban elvétve követték a csontok sejtes elemein végzett lektin-hisztokémiai vizsgálatok.

Első beszámoló mely a csontsejtek lektin hisztokémiájával foglalkozik Vaananen és mtsai tollából származik (1986) rodaminnal konjugált PNA lektineket használtak a csontban előforduló osteoclastok identifikálására. Megállapították, hogy a lektin igen jó markere mind szövetkötelékben, mind sejttenyészetben az osteoclastoknak. Neuraminidáz emésztést a PNA lektin kötődésének vizsgálata előtt nem végeztek. Véleményük szerint a PNA kötés alapján az osteoclastok kiválóan szeparálhatók más csont eredetű sejtes elemektől.

A fenti észleletek késztettek bennünket a csontszövet sejtes elemeinek lektin-hisztokémiai elemzésére.

Célkitűzések

Mivel nem létezett a csontsejtek szisztematikus lektin kötés vizsgálata, elhatároztuk, hogy az alábbi szempontok alapján vizsgálatokat végzünk e tárgyban.

- Humán embriókból származó csontokon meghatározzuk az egyes fejlődési stádiumokra jellemző lektin kötést, különös tekintettel az osteoclastokra.

- A sejtek lektin kötésének vizsgálatával megpróbáltuk azok eredetét meghatározni.

- A lektin kötés alapján a sejtekben előforduló glikokonjugátumok szintézisének ütemére és funkciójára próbáltunk következtetni.

- Különféle patológiás folyamatok és normál csontminták lektin kötését összehasonlítva a patológiás elváltozások mibenlétét kerestük.

- A lektinkötés alapján egyes elváltozások patogenezisét próbáltuk felderíteni.

- Patológiás folyamatokban lektin-hisztokémia alapján prognosztikai jellegzetességeket kívántunk meghatározni.

Anyagok és módszerek

Vizsgálati anyagok

Kóros vizsgálati anyagunk jelentős részét a Pécsi Orvostudományi Egyetem Ortopédiai klinikáján operált betegek biopsziás anyagai szolgáltatták.

- Összehasonlításként elvégeztük embrió femurok - melyek kora 8, 13, 15, 17, 21, 24, 28, 35, 40 hét - valamint egy 3 hónapos újszülött femurjainak vizsgálatát. Az embrió femurok kora a materek gesztációs korából került kiszámításra. Az embriók egytől-egyig spontán abortuszok valamint koraszülések során világrajött embriókból ill. csecsemőkből származnak. A 3 hónapos újszülött elhúzódó szülést követően kialakult subependymalis vérzés következtében hunyt el. A humán embrió-femur sorozat vizsgálatát a szerző, a párizsi Saint-Vincent-De-Paul kórház Ortopédiai Osztályán, a Magyar-Francia Államközi Műszaki Tudományos Együttműködési Szerződés keretében eltöltött 16 hónapos ösztöndíja során a fenti kórház Kórbonctani Osztályán végezte Prof. Dr. Alain Pompidou engedélyével.

- A megvizsgált 46 osteogen sarcoma közül 21 a Semmelweis Orvostudományi Egyetem Ortopédiai Klinikáján működő Csonttumor Regiszter anyaga volt. Innen a klinikai adatok ismertetése nélkül, parafinba ágyazott szövettani mintákat kaptunk, diagnózissal, valamint a szövettani altípus megjelölésével. További 7 osteosarcomás eset parafinos blokkjait Dr. James V. Luck bocsátotta rendelkezésünkre. (Orthopaedic Hospital, Los

Angeles, California) Ezen esetekben sem ismertük a betegek klinikai adatait, csak a szövettani blokkjaik álltak rendelkezésünkre. Újabb 8 eset a párizsi Saint-Vincent-De-Paul kórház ortopédiai osztályán Prof. Dr. Jean Dubousset által a szerző asszistenciájával végzett biopszia ill. végtagmegtartó műtét során nyert szövetminta vizsgálata volt. A szövettani diagnózist minden esetben az Institut Gustave Roussy (Villejuif) Anatómiai és Citopatológiai Intézetének Csont-Histopatológiai Laboratóriumában Dr. Genevieve Contesso és munkacsoportja állította fel. Ezekben az esetekben a betegek kórtörténete a betegségük klinikai lefolyására vonatkozó adatokkal csak részben áll rendelkezésünkre. 10 osteosarcomás esetünk észlelése, a szövettani mintavétel, kezelése a Pécsi Orvostudományi Egyetem Ortopédiai Klinikáján történt. Így csak ezen betegcsoport klinikai adatai álltak teljes mértékben rendelkezésünkre.

- 28 osteoclastomát elemeztünk. 10 esetben a szövettani vizsgálat során nem történt grading meghatározás. 18 esetet pedig a szövettani stádium ismeretében választottunk ki eseteink közül. Ezen betegek betegségének lefolyására vonatkozó pontos klinikai adatait a 1 sz. táblázatban közöljük. Az osteoclastomás esetek egy részének (6 eset) kettős vak vizsgálatát - mikor is a szerző sem a szövettani diagnózist, sem a stádiumot, sem a klinikai lefolyást a vizsgálat idejében nem ismerte - a szerző az Institut Gustave Roussy (Villejuif) Anatómiai és Citopatológiai Intézetének Csont-Histopatológiai Laboratóriumából származó anyagokon végezte Dr. Genevieve Contesso vezetésével.

E helyen szeretnék köszönetet mondani Dr. Szendrői Miklósnak (SOTE Ortopédiai Klinika) Prof. Dr. Jean Dubousset-nak

és Prof. Dr. Alain Pompidou-nak (Hopital St.-Vincent-De-Paul, Párizs) Dr. Genevieve Contesso-nak (Institut Gustave Roussi, Villejuif) valamint Dr. James V. Luck-nak (Orthopaedic Hospital, Los Angeles, California) a vizsgálati anyagok rendelkezésre bocsátásáért, valamint szakmai tanácsaikért.

- 25 esetben végeztük eltérő korú betegek különféle osteotomiái során kivett normál corticalis és/vagy spongiosus csonték vizsgálatát.

- Elvégeztük 8 myositis ossificans, 6 non ossificalo fibroma, 8 osteoid osteoma, 7 fibrosus dysplasia, 5 idegentest granuloma, valamint 5 epulis vizsgálatát. Vizsgálati anyagunk kiválasztásánál nem törekedtünk teljességre, s csak azokat az elváltozásokat vizsgáltuk, melyek szövettani képe egyértelműen reprezentálta az illető elváltozást, valamint amelyekről azt gondoltuk, hogy a lektin hisztokémia új információkat adhat az elváltozások természetét illetően.

Vizsgálati módszerek

A szövetminták fixálását, dekalcinálását, a hisztológiai procedúrákat, a metszetek kiértékelését, a diagnózisok felállítását a Pécsi Orvostudományi Egyetem Ortopédiai Klinikájának Szövettani Laboratóriumában végeztük szoros kollaborációban a POTE Kórbonctani Intézetével. Ezen a helyen szeretném köszönetemet kifejezni Cseh Lászlóné szövettani asszisztensnek az értékes technikai segítségéért.

Név, Kor, Nem	Első észlelés	Lokalizáció	Rtg stádium	Szövettani stádium	Terápia	Kórlefolyás
M.F., 18 ffi.	1979	distalis fibula fejecs	látens	Gr. I.	excochleatio csontgraft	tünet és panasz-mentes
A. L., 62 nő.	1980	tibia condylus	látens	Gr. I.	excochleatio csontgraft	tünet és panasz-mentes
G. S.,42 ffi.	1985	hallux	aktív	Gr. I.	amputáció	tünet és panasz-mentes
B.G., 14 nő.	1985	femur condylus	agresszív	Gr. I.	excochleatio csontgraft	nincs adat
K. L., 19 ffi.	1983	tibia disztális metaphysis	aktív	Gr. I.	excochleatio csontgraft	tünet és panasz-mentes
H. I., 36 nő.	1984	tibia proximális metaphysis	látens	Gr. I.	excochleatio csontgraft	tünet és panasz-mentes
N.M., 69 nő.	1979	mandibula	agresszív	Gr. II.	excochleatio csontgraft	1 X recidíva, exitált nem a tu miatt
T. I., 25 nő.	1979	tibia condylus	aktív	Gr. II.	excochleatio csontgraft	tünet és panasz-mentes
Sz.L., 25 ffi.	1985	radius distalis metaphysis	agresszív	Gr. II.	excochleatio csontgraft	recidíva többször jelenleg is recidivál
B. L., 36 nő.	1985	radius distalis metaphysis	agresszív	Gr. II.	excochleatio csontgraft	tünet és panasz-mentes
T. P., 33 nő.	1985	radius distalis metaphysis	aktív	Gr. II.	excochleatio csontgraft	tünet és panasz-mentes
P. I., 39 nő.	1986	femur diaphysis	aktív	Gr. II.	excochleatio csontgraft	tünet és panasz-mentes
Cs.J.,45 ffi.	1967	femur condylus	aktív	Gr. III.	rezekciós arthrodesis	1 X recidíva, exitált nem a tu miatt
M.B., 43 ffi.	1982	femur condylus	agresszív	Gr. III.	széles rezekció	1 X recidíva, azóta nem tudunk róla
Sz.L., 57 nő.	1982	tibia proximális metaphysis	agresszív	Gr. III.	amputáció	nem tudunk róla
S.J., 29 ffi.	1980	radius distalis metaphysis	agresszív	Gr. III.	széles rezekció	2 X recidíva, 1983-ban tüdő met., exitus
Cs.J.,20 ffi.	1984	radius distalis metaphysis	agresszív	Gr. III.	széles rezekció	1X recidíva, 1985-ben tüdő met., exitus
O. I., 42 nő.	1980	proximális humerus	agresszív	Gr. III.	intraarteriál is embolisatio	műtétbe nem egyezett, 1981-ben exitus

1. táblázat: ***Osteoclastomás betegeink klinikai adatai***

Dekalcinálás

A szövettani anyagaink fixálása származási helytől függetlenül azonos módon, pufferezett formalinban történt (pH: 7,0). A mésztartalmú csontszövet dekalcinálása 3-féle módon történt. A Los Angeles-i Orthopaedic Hospital Kórbonctani osztályán savas decalcináló oldatot használnak (5 l desztvíz és 1 l salétromsav keveréke) a paraplastba történő beágyazás előtt (Luck 1992). Az Institut Gustave Roussy (Villejuif) Anatómiai és Citopatológiai Intézetének Csont-Histopatológiai Laboratóriumában szintén savas decalcináló oldatot használnak, egyenáramú elektromos árammal kiegészítve (24 V) (Contesso 1989). Mi a magunk részéről 1989-ig felváltva 0,6 M sósavval és/vagy etiléndiamin-tetraacetát dinátrium sójával végeztük a dekalcinálást. A fixált szöveteket 37-40 fokon acetát pufferben (pH: 7,4) oldott 25 %-os Selecton B II. (Reanal) oldattal kezeltük, a dekalcinálandó szövet 100 g-ra 100 ml oldatot számítva (Kiszely, Barka 1958). 1990-től laboratóriumunk is a savas dekalcinálást használja egyenáramú elektromos árammal kiegészítve (Contesso 1989).

Klasszikus hisztokémiai eljárások

Hematoxilin-eozin, PAS reakciót és egyéb festéseket a hisztokémiai kézikönyvekben leírtaknak megfelelően, azok alapján végeztük (Pearse 1968).

Lektin hisztokémia

A kutatásainkban alkalmazott lektineket és azok cukorspecificitását az II. sz. táblázatban közöljük. A nagyszámú

lehetőség közül a lektinek kiválasztásánál az alábbi szempontokat alkalmaztuk:

- Mindazon monoszaccharid egységre specifikus lektin szerepeljen, mely monoszacharidok a glikoproteinek felépítésében részt vesznek.

- Ugyanazon monoszacharidra specifikus lektinek közül azokat választottuk, melyek specificitása továbbá kötődési mechanizmusa legjobban ismert. A földimogyróró lektin esetében (Arachis hypogaea, PNA) Lotan és mtsai.(1975) Sato és Spicer (1982) Bandeira simplicifolia (BSA) lektin esetében Wood és mtsai (1979) valamint Murphy és Goldstein (1977) "János" bab lektin (Concanavalin A, Con A) lektin esetében Reeke és mtsai (1974) Dolichus biflorus (DBA) lektin esetén Etzler (1972), Etzler és mtsai. (1980), Lotus tetragonolobus (LTA) lektin esetén Pereira és Kabat (1974), Ricinus communis lektin esetén Nicolson és Blaustein (1972) valamint Nicolson és mtsai. (1974), búzacsíra (Wheat-germ agglutinin, WGA) lektin esetében Allen és mtsai. (1973) valamint Goldstein és mtsai. (1975), míg az Ulex europeus lektin esetén Matsumo és Osawa (1970) alapvető munkáira támaszkodtunk.

A kiválasztott lektineket biotinnal konjugált formában (Sigma) vásároltuk. A lektin-hisztokémiai vizsgálatok menete a következő volt:

a./ Deparafinálást, majd rehidrálást követően első lépésként metszeteinket 1 %-os metanolos vagy vizes H_2O_2 oldattal kezeltük 30 percig, az endogén peroxidáz gátlása céljából.

Lektinek	Cukor specificitás	Gátló cukor
Arachis hypogaea PNA	β-D-galaktóz (1,3)-N-acetil-D-galaktózamin	D-galaktóz
Bandera simplicifolia BSA	α-D-galaktóz N-acetil-α-D-galaktózamin	D-galaktóz
Canavalia ensiformis Con A	α-D-mannóz, α-D-glükóz N-acetil-α-D-glükóz	α-metilmannozid
Dolichus biflorus DBA	N-acetil-α-D-galaktóz	N-acetil-galaktózamin
Lotus tetragonolobus LTA	α-L-fukóz	L-fukóz
Ricinus communis RCA-I	β-D-galaktóz, α-D-galaktóz	D-galaktóz
Triticum vulgaris WGA	N-acetil-β-D-glükózamin Neuraminsav	N-acetil-glükózamin
Ulex europeus UEA	α-L-fukóz	L-fukóz

II. táblázat: ***A vizsgálataink során használt lektinek, cukorspecificitásuk, valamint a gátlás során használt szénhidrátok.***

b./ Mosás csapvízben, desztillált vízben majd PB (phosphat buffered saline) vagy kalciummal kiegészített TBS (Tris buffered Saline) pufferben (pH: 7,4) 5 - 5 percig.

c./ A lektinek aspecifikus (aminó csoporttokon keresztül) történő kötődésének kiküszöbölésére a metszeteinket 1 %-os gelatinnal, vagy 1 %-os albuminnal (borjú, sertés, ill. nyúl) előkezeltük 10 percig.

d./ Mosás PB ill. TBS pufferben (pH: 7,4) 3 X 5 percig.

e./ Inkubálás biotinnal konjugált lektinekkel. A lektineket 5 - 10 μg/ml koncentrációban, szobahőmérsékleten (20 fok) alkalmaztuk 45 percig.

f./ Mosás PB ill. TBS pufferben (pH: 7,4) 3 X 5 percig.

g./ A metszeteinket ezután 100-szoros hígítású avidin - biotin - peroxidáz komplex-szel (ABC, Vector) inkubáltuk szobahőmérsékleten (20 fok) 45 percig.

h./ Mosás PB ill. TBS pufferben (pH: 7,4) 3 X 5 percig.

i./ A peroxidáz enzimet diaminobenzidin (DAB) - vagy 9-aminoetil - karbazol szubsztrátumokkal tettük láthatóvá szobahőmérsékleten (20 fok) 30 perces incubációval. Az inkubáció ideje alatt mikroszkóppal rendszeresen kontrolláltuk a reakció erősségét, a színintenzitást.

j./ Mosás desztillált vízben, magfestés, lefedés glicerin - gelatin vizes oldatával, vagy Kanada - balzsammal.

Előemésztés

A végálló monoszaccharid egységek enzimatikus lehasítása után mélyebben fekvő, eddig maszkírozott lektinkötő helyek válhatnak szabaddá. Munkánk során mi a neuraminidáz enzimet használtuk a lektinkötő helyek felszabadítására. Az enzimet (Vibrio cholerae, Sigma) Tris - HCl pufferben (pH: 7,4) 1U/ml-es koncentrációban alkalmaztuk 37 fokon 30 percig a lektinekkel történő inkubáció előtt.

Blokkolás

A lektinkötés specificitásának megállapítására kétféle módszer áll rendelkezésünkre. Az első során jelöletlen lektinekkel történő előinkubálás során meggyőződhetünk arról, hogy a komplex nem a peroxidáz molekula révén kötődött a metszetekhez.

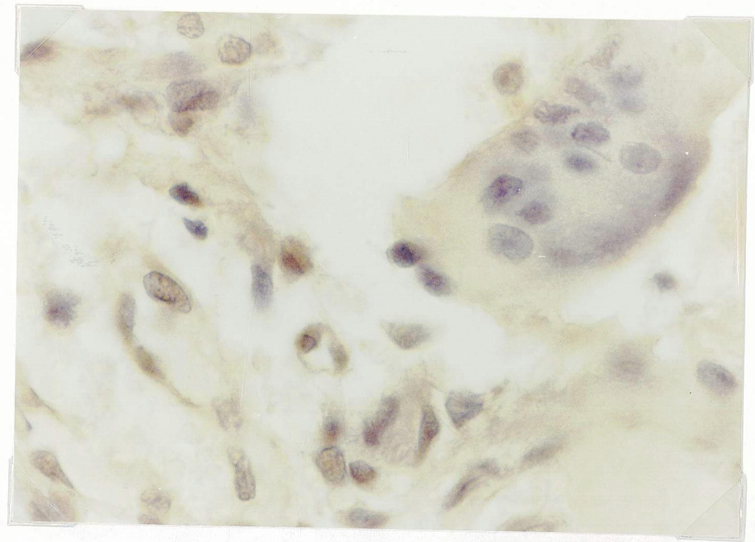
A második módszer során a jelölt lektinekkel együtt inkubálunk különböző, a lektinek specificitásának megfelelő monoszacharidokat mely bizonyítja, hogy a lektin valóban cukorspecificitásának megfelelően kötődött-e. Ez utóbbi vizsgálat során 0,1 M-nyi monoszacharidot oldunk a jelölt lektin oldatában. A megfelelő cukormolekula a lektin specifikus kötőhelyeit telíti és a kompetitív gátlás révén megakadályozza, hogy a lektin a metszet hasonló, szabad monoszaccharid egységéhez kötődjön. Az általunk alkalmazott gátló cukrokat szintén az II. sz. táblázatban közöljük.

Eredmények

Dekalcinálás hatása a lektinkötésre:

Vizsgálataim során többféle mésztelenítési eljárást használtam melyeket a lektinkötés függvényében hasonlítottam össze. Az etiléndiamin-tetraacetát dinátrium sójának oldatával (EDTA) valamint a 0,6 N HCl oldattal történő dekalcinálás jó, relatíve gyors mésztelenítést tett lehetővé. 0,6 N HCl esetében a teljes mésztartalom elvesztéséhez általában 24-48 órára, míg EDTA esetében 72-168 órára volt szükség. Egyes esetekben (pl.: osteoid osteoma) a mésztelenítés jóval több időt, néha heteket vett igénybe. Ilyenkor sósavas dekalcinálás mellett a lektinkötés - hasonlóan a magfestéshez - csökkent, míg a lektinek aspecifikus háttér reakciója jelentősen megnőtt, míg EDTA-val történt hosszú dekalcinálás során anyagaink a lektinkötő helyeik jelentős részét elveszítették (2. ábra). Mint az 2. számú ábrán látható EDTA-val történt dekalcinálás után osteoid osteomában nem észleltünk lektin kötődést. Elektromos dekalcinálást követően azonban (44, 45. ábrák) a lektinkötő helyek igen nagy számát sikerült kimutatnunk, ugyancsak osteoid osteomában. Ezen észleletünk alapján a vizsgálataink jelentős részét elektromosan elősegített savelegyben történt dekalcinálás után végeztük. A mésztelenedés elektromos dekalcinálás során általában 6 - 8 órát vett igénybe. Az osteosarcomás esetek közül 7 eset parafinos blokkjait Dr. James V. Luck bocsátotta rendelkezésünkre, (Orthopaedic Hospital, Los Angeles, California) amely anyagok mésztelenítését savelegyben végezték. A mésztelenedési idő ezen esetekben nem haladta meg a

12 -24 órát (Luck 1992 személyes közlés). A magunk részéről ezen savelegyet anyagaink mésztelenítéséhez nem használtuk. A lektinkötő helyek vizsgálatánál azonban azt tapasztaltuk, hogy ezzel a dekalcinálási móddal is kiváló lektinkötődést lehetett kimutatni.

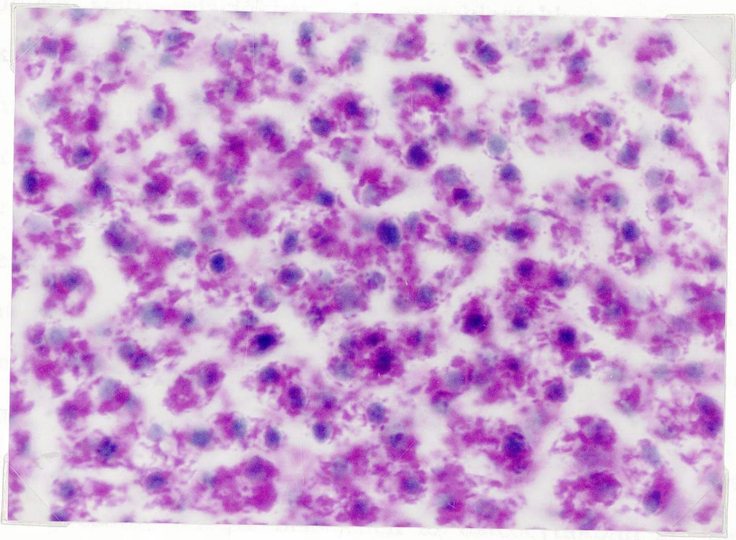


2. ábra: Osteoid osteoma N-PNA jelölés, 1000 X, Neuraminidáz emésztést követően az elváltozásban lektinkötődést nem tudtunk kimutatni.

Embrionális csontok lektinkötése:

Az embrionális csontok vizsgálatánál kizárólag azok lektinkötésére, ill. ennek függvényében a fejlődő csontok glikoprotein tartalmára voltunk kíváncsiak. A vizsgált különböző korú femurok esetében HE festés mellett mindig PAS reakciót is végeztünk, a glikogén tartalom meghatározására. A különböző korokban eltérő festődést észleltünk. 8 hetes embrióból származó végtagbimbó PAS reakciója során kifejezett, minden sejtre kiterjedő, a sejtek citoplazmájában diffúzan, egyenletesen

eloszló, finomszemcsés PAS pozitivitást észleltünk (3. ábra), mely bizonyítéka a sejtek igen jelentős glikogén tartalmának. A következő vizsgált életkorban (13. hét) ez a PAS pozitivitás már csak elvétve egy-egy sejtben volt látható, a 15. héttől egyetlen egy esetben sem volt kimutatható.

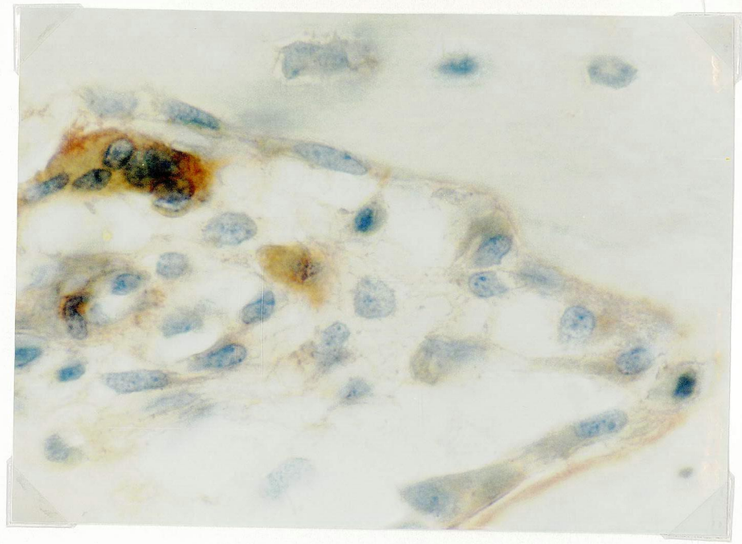


*3. ábra: **8 hetes embrió végtagbimbó, PAS reakció, 1000 X.** A sejtekben finoman szemcsés , diffúzan eloszló intracitoplazmatikus PAS pozitivitás figyelhető meg.*

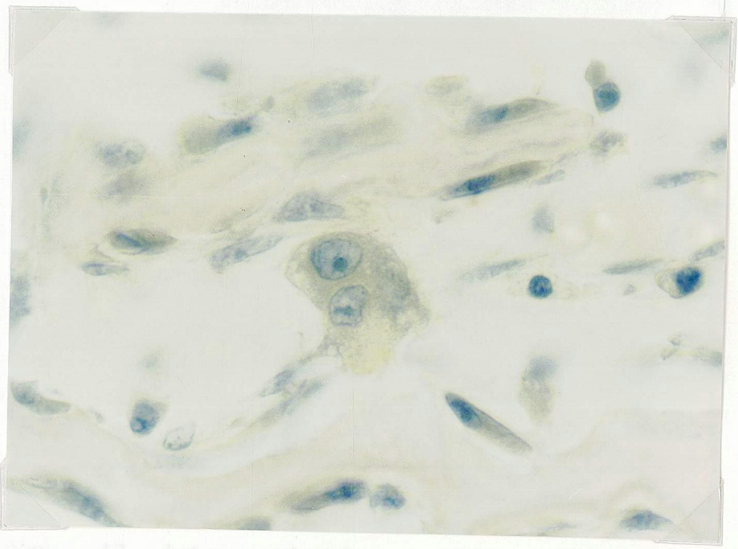
A lektinkötés tekintetében ellenkező előjelű tendencia volt megfigyelhető. A 8. hetes végtagbimbó esetében egyetlen egy vizsgált lektinnel sem észleltünk pozitív reakciót. A 13 hetes embrió femurjának vizsgálata során is csak egyetlen lektinnel, mégpedig Con A lektinnel észleltünk pozitivitást. Ez a jelölés a kialakulóban levő csontfelszín környezetében elhelyezkedő óriássejtben figyelhető meg legintenzívebben. A csontgerendák

felszínén lévő osteoblast sejtekben csak elvétve sejtehető pozitív reakció (4. ábra). Egyéb lektinekkel végzett vizsgálataink során rendre negatív eredményt kaptunk, melyek közül a N-PNA, DBA és WGA jelöléseket mutatjuk be (5, 6, 7 ábrák).

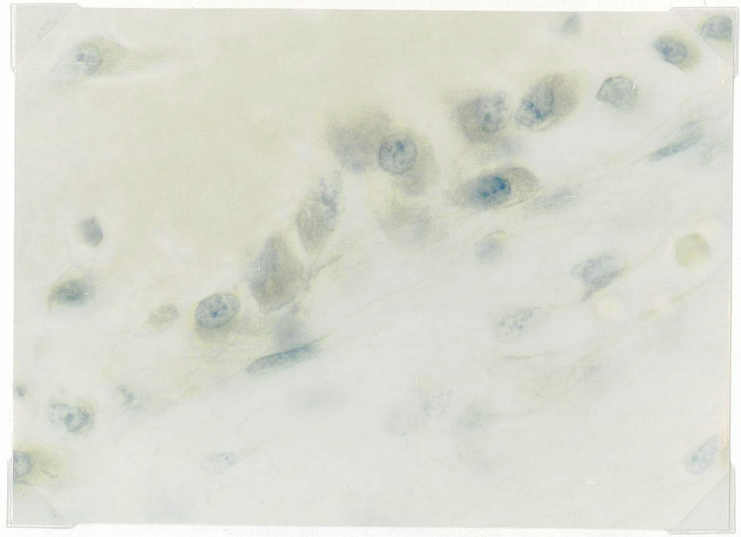
15 hetes embrió-femurokon végzett vizsgálataink azt mutatták, hogy a lektinkötő helyek jelentősen felszaporodtak a különféle sejtpopulációkban. Az osteoblastokban és/vagy azok prekurzoraiban - melyek a 8. embrionális héten közepes erősségű, diffúz intracitoplazmáris Con A kötődés figyelhető meg (8. ábra). Az osteoclastok 13. héten megfigyelt Con A jelölődésének intenzitása a 15. hétre jelentősen csökkent, de még elszórtan megfigyelhető volt. Érdekes eredményt hozott a WGA lektinkötődés vizsgálata. A csontgerendák széli részein elhelyezkedő osteoblastok ill. osteoblast kezdemények citoplazmája egy jól meghatározott perinukleáris régióban WGA pozitívvá vált. Ez a régió - a lokalizációból következtetve - a Golgi-komplexnek felelhet meg. A reakció a csontgerendák belsejében az osteocytákban is hasonló lokalizációban, de jelentősen csökkent intenzitással figyelhető meg (9. ábra).



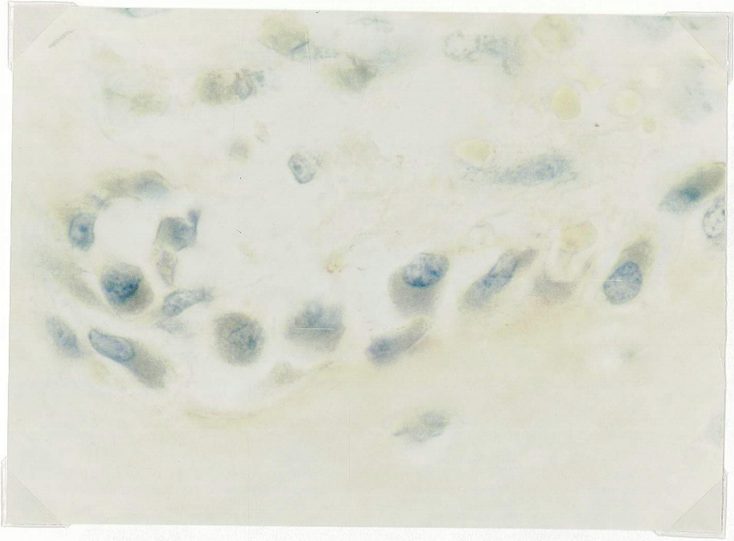
*4. ábra: **13 hetes embrió-femur, Con A jelölés, 1000 X,** A csontgerendák felszínén elhelyezkedő osteoclastokban látható diffúz intracitolplazmatikus pozitivitás. Az osteoblastok negatívak ebben az embrionális korban*



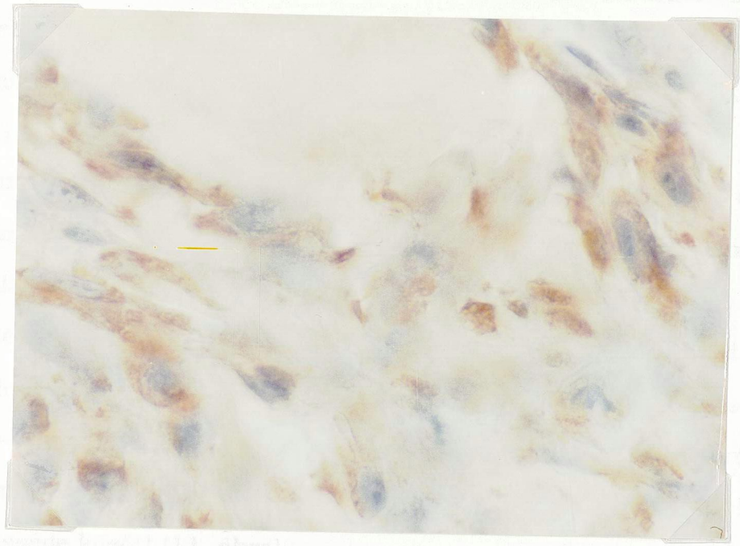
*5. ábra: **13 hetes embrió-femur, N-PNA kötés, 1000 X,** A vizsgálat során semmilyen lektinkötődés nem volt kimutatható sem az osteoclastokban, sem a csontképző sejtekben. A neuraminidáz emésztés sem befolyásolta a reakciót.*



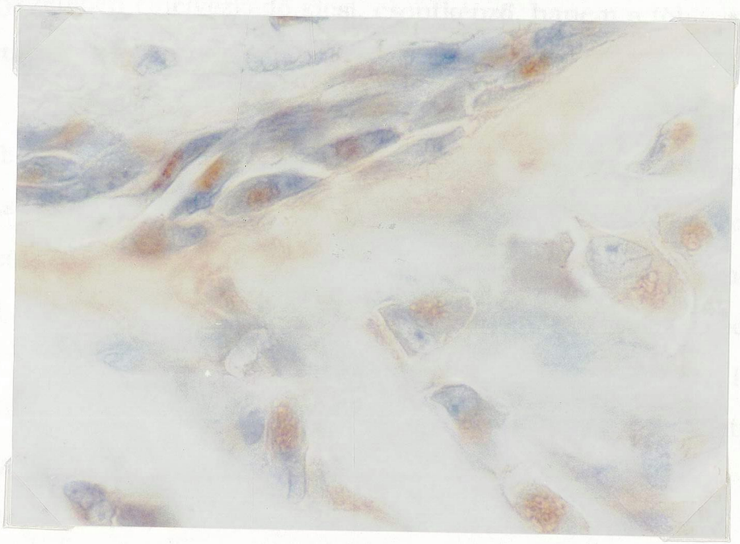
6. ábra: 13 hetes embrió-femur, DBA jelölés, 1000 X, A lektint egyetlen sejtelem sem kötötte ebben az életkorban.



7. ábra: 13 hetes embrió-femur, WGA jelölés, 1000 X, WGA lektinnel sem tudtunk kimutatni kötődést ebben az embrionális korban. Minimális aspecifikus kötődés sejthető az újonnan képződött osteoid területében.



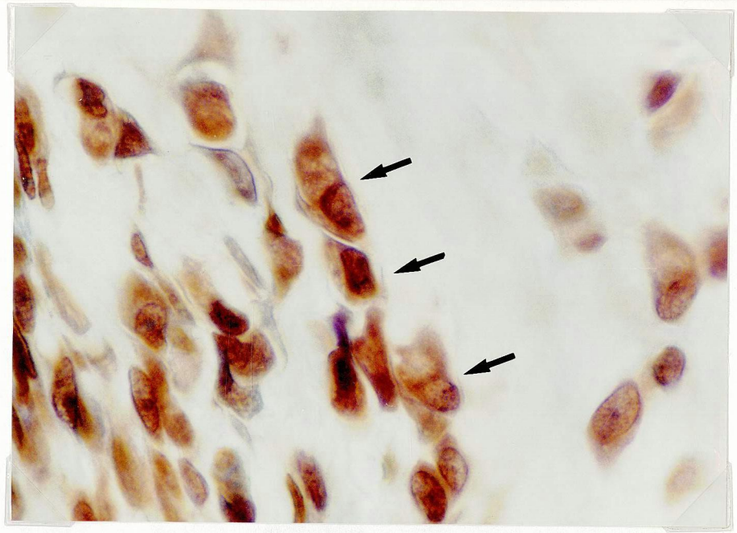
8. ábra: ***15 hetes embrió-femur, Con A jelölés, 1000 X,*** *A csontgerendák környezetében ill. felszínén pozitív reakciót adó csontképző sejtek láthatók nagy számban.*



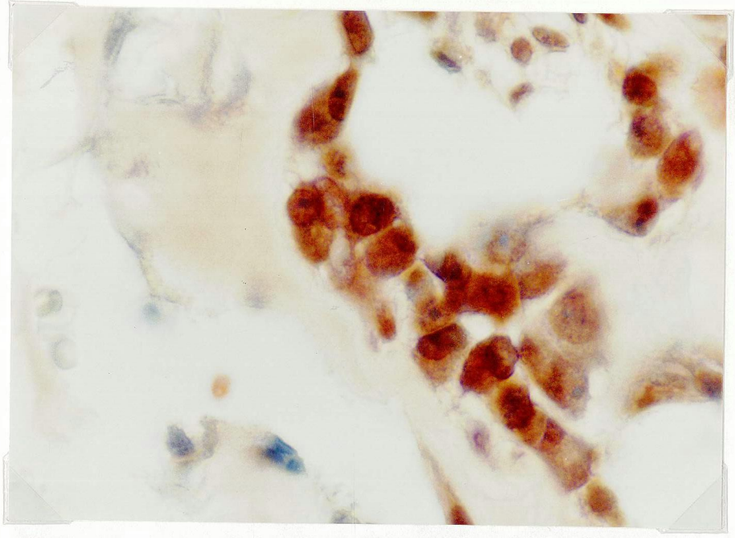
9. ábra: ***15 hetes embrió-femur, WGA kötés, 1000 X,*** *Mind a csontgerendák felszínén lévő osteoblastokban, mind az osteocytákban perinukleáris WGA pozitivitás látható. Az osteocyták reakciója csökkent intenzitású.*

A legszembetűnőbb változás a DBA lektinkötésében következett be. Míg a 13 hetes embrionális csontok esetében a csontképző sejtekben nem észleltünk semmiféle lektinkötődést, addig a 15 hetes embrionális korban a csontképző sejtek igen intenzív DBA kötő képességgel bírnak. A lektinkötés igen erős, diffúz intracitoplazmáris jellegű. Pontosabb citoplazmáris lokalizáció fénymikroszkópos szinten a reakció erőssége miatt nem ítélhető meg. A 10. ábrán bemutatott anyagunkon a periosteum kezdemény igen erős reakciója látható, mely a magfestést is teljesen háttérbe szorítja. Ezen embrionális korban nincs különbség az osteoblastok ill. az osteocyták DBA lektin kötő képessége között (11. ábra).

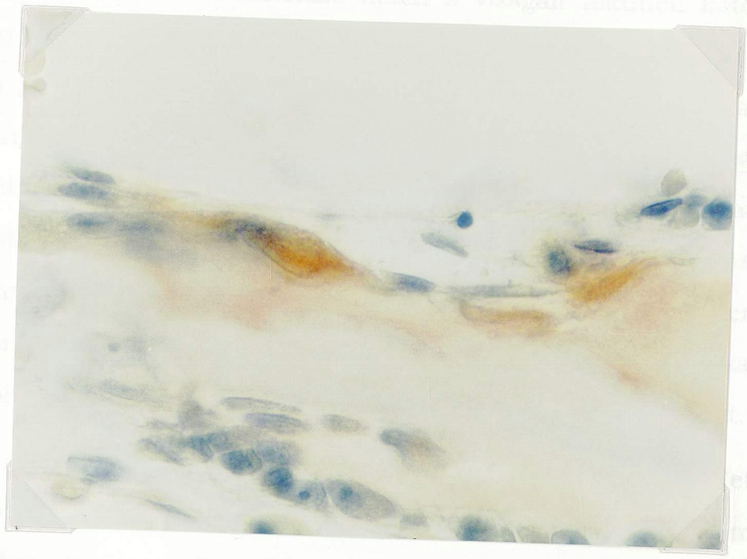
A DBA-hoz hasonló érdekes reakció változást figyeltünk meg PNA lektin esetében is, csak nem a csontgerendák környezetében elhelyezkedő kicsi, csontképző, hanem a többmagvú csontbontó sejteken, az osteoclastokon. A 13. embrionális héten PNA lektinnel egyáltalán nem láttunk reakciót. A 15. héten azonban a csontgerendák környezetében, azokhoz kitapadó óriássejtek reagáltak a PNA lektinnel. A reakció diffúz, a citoplazma egészén egyenletesen eloszló volt. Ebben a fejlődési stádiumban mind neuraminidáz előemésztés nélkül, mind azt követően hasonló jellegű PNA kötődés volt kimutatható az óriássejtekben. A PNA reakció neuraminidáz emésztés nélkül és azt követően intenzitásában is teljesen hasonló megoszlást mutatott az óriássejteken (12, 13 ábrák).



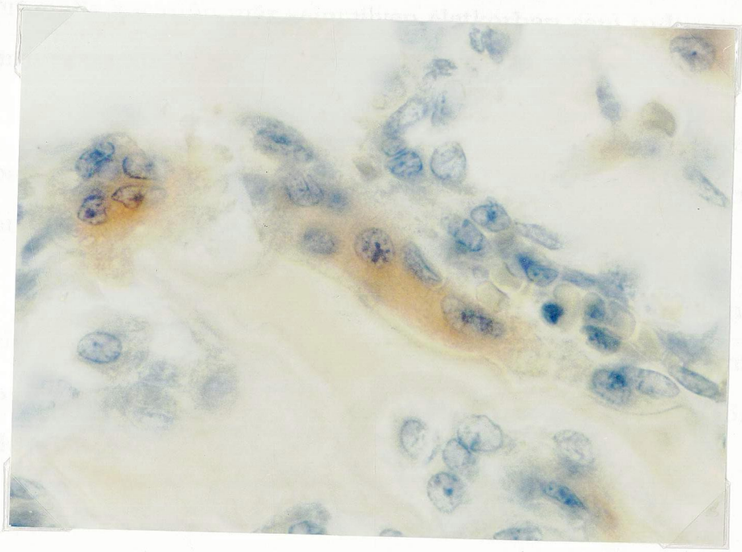
10. ábra: ***15 hetes embrió-femur, DBA kötés, 1000 X,*** *A csontgerendák széli részein a periosteális sejtek (nyilak) igen intenzíven kötik a DBA lektint.*



11. ábra: ***15 hetes embrió-femur, DBA kötődés, 1000 X,*** *A csontgerendák felszínén az aktív csontképzést végző sejtek igen intenzív DBA reakciója látható. Egy másik, feltehetően inaktív, vagy fejlődő sejt nem köti a lektint.*



12. ábra: ***15 hetes, embrió-femur, PNA kötés, 1000 X,*** *A csontgerendák széli területein elhelyezkedő osteoclast kezdeményekben intracytoplasmatikus PNA pozitivitás figyelhető meg.*



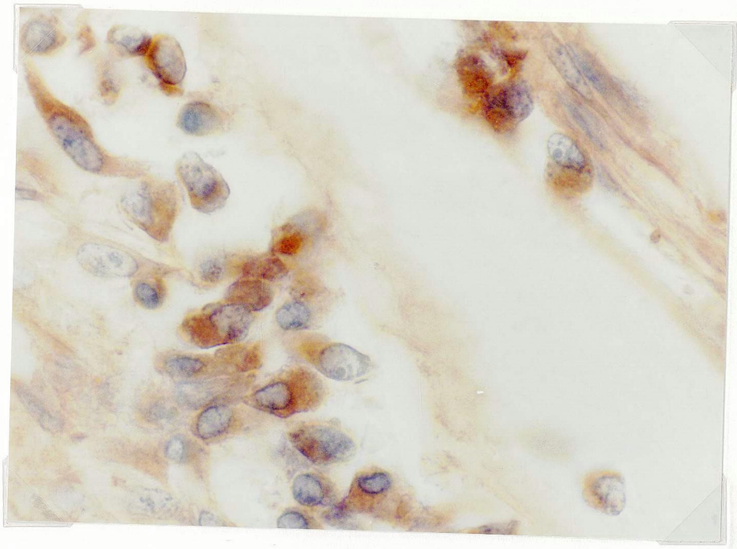
13. ábra: ***15 hetes embrió-femur, N-PNA jelölés, 1000 X,*** *Neuraminidáz emésztést követően az osteoclastokban lokalizációjában és intenzitásában is a hasonló reakciót kaptunk, PNA lektinnel.*

A 17. embrionális héten a vizsgált lektinek kötődési tulajdonságaiban ismét jelentős változásokat észleltünk. Tovább nőtt a Con A lektint kötő periosteális sejtek száma. Mint az a 14. ábránkon látható a csontképző, osteoblast sejtek mindegyike kötötte a Con A lektint. A kötés nem csak mennyiségi, hanem minőségi változáson is átment, hisz a Con A kötődés intenzitása is jelentősen megnőtt (14. ábra). A Con A lektin kötődését ebben az embrionális korban találtuk a legerősebbnek. A további vizsgált korokban a lektinkötésének intenzitása folyamatosan csökkent.

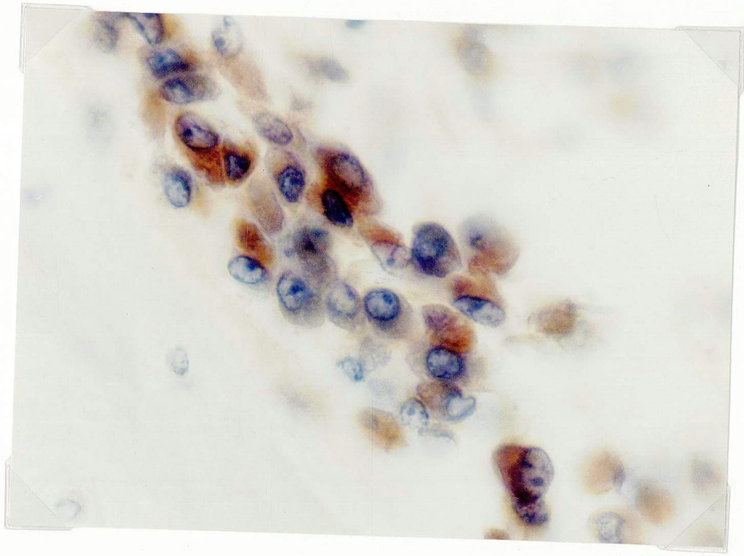
Hasonló tendenciájú változást észleltünk a DBA lektin kötődésének vizsgálatakor. Míg a 15. embrionális héten majd minden sejt igen erősen DBA pozitív volt, addig a 17. embrionális héten a DBA kötésének intenzitása kifejezetten csökkent és a sejtek közül számos már negatívvá is vált (15. ábra). Ezen embrionális kor után már semmilyen életkorban sem tudtunk DBA lektinnel reakciót kimutatni.

WGA lektinnel végzett vizsgálatunk során ebben a korban a 15. hetihez képest csökkent intenzitással, de észleltük a csontképző sejtek perinucleáris reakcióját.

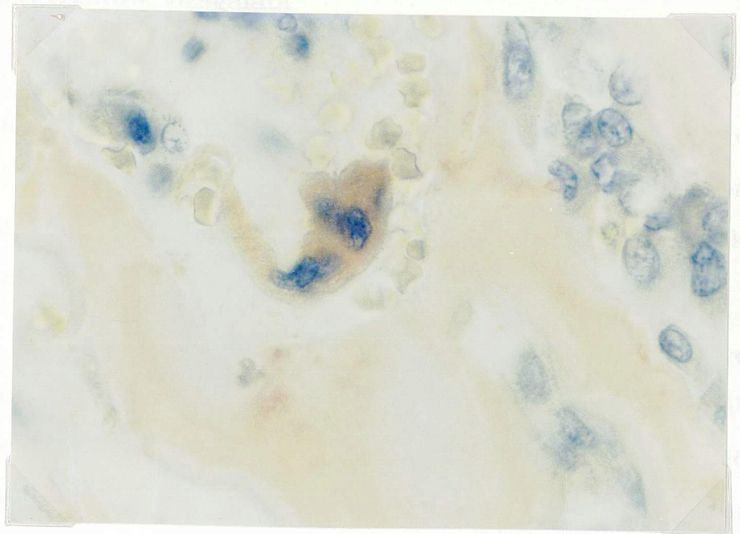
PNA lektinnel ebben az embrionális korban is észleltünk kötődést. Feltűnő volt azonban, hogy a neuraminidáz emésztés milyen mértékben növelte a reakció intenzítását (16, 17 ábrák).



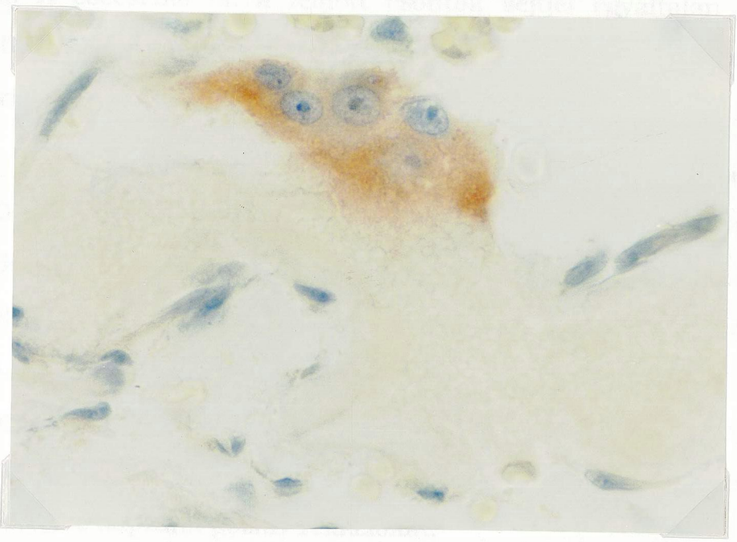
*14. ábra: **17 hetes emrió-femur, Con A jelölés, 1000 X,***
Az embrionális életben ebben az életkorban észleltük a legerősebb Con A pozitivitást az osteoblastokban.



*15. ábra: **17 hetes embrió-femur, DBA jelölés, 1000 X,***
A 15. embrionális korhoz képest jelentősen csökkent a DBA pozitivitás intenzitása. Egyes sejtek már nem kötik a lektint



*16. ábra: **17 hetes embrió-femur, PNA kötés, 1000 X,** Kifejezett PNA kötődés figyelhető meg a csontgerenda közelében található osteoclastokon*



*17.ábra **17 hetes embrió-femur, N-PNA jelölés, 1000 X,** Feltűnő, hogy a neuraminidáz emésztés milyen mértékben fokozta a PNA lektin kötődésének intenzitását.*

Kiérett csontok vizsgálata

Kiérett csontok vizsgálatán az újszülött, a 3 hónapos csecsemő valamint a különböző korú egyének osteotomiái alkalmával eltávolított csontékek vizsgálatát értjük. Az embrionális csontok vizsgálatához viszonyítva eredményeink csak a csontokban levő óriássejtek esetében hoztak érdekes, új eredményeket.

Con A lektin vizsgálata során csak igen gyenge reakciókat találtunk elvétve egye - egy osteoblast citoplazmájában. Az osteocyták negatívak voltak e lektinnnel, csakúgy, mint a kiérett óriássejtek is. Az embrionális 17 héttől - ahol az osteoblastok legnagyobb számban és intenzitással kötötték a Con A lektint (14. ábra), a Con A kötés fokozatosan, egyenletesen csökkent, míg az újszülött csontok osteoblastjai gyakorlatilag negatívak voltak (18. ábra). A csecsemő ill. a felnőtt csontok sejtjei egyáltalán nem kötötték a Con A lektint. Az óriássejtek normál esetben csak a 13. embrionális héten voltak pozitívak Con A lektinnel.

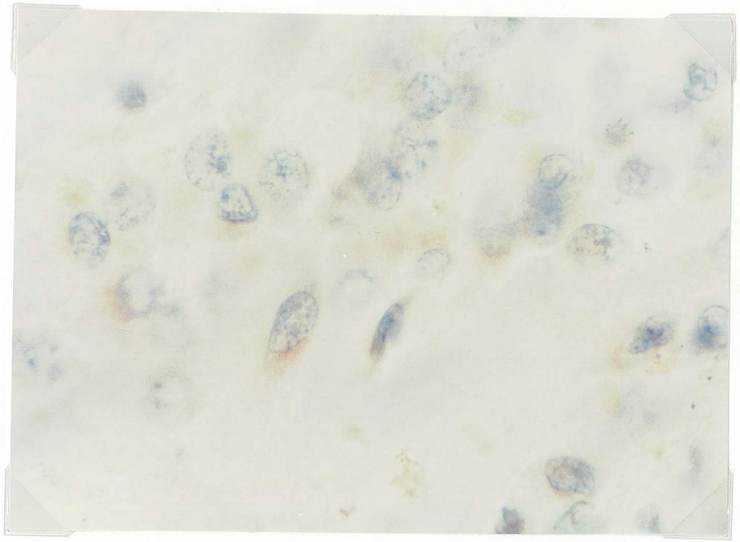
Mindenben hasonló módon viselkedtek az osteoblastok a WGA lektinkötés tekintetében is. WGA lektinnel a legintenzívebb jelölődés a 15. embrionális héten volt, majd a pozitív sejtek száma, a kötés intenzitása fokozatosan csökkent, mígnem az újszülött femurok vizsgálatánál jelölődést elvétve tudtunk kimutatni. A 3 hónapos csecsemő ill. a felnőtt csontokban WGA reakciót kimutatni egyáltalán nem sikerült (19. ábra). Az óriássejtekben is csak elvétve kaptunk pozitív reakciókat.

DBA lektinnel a 17. embrionális hét után nem tudtunk reakciót kimutatni egyetlen vizsgált életkorban sem.

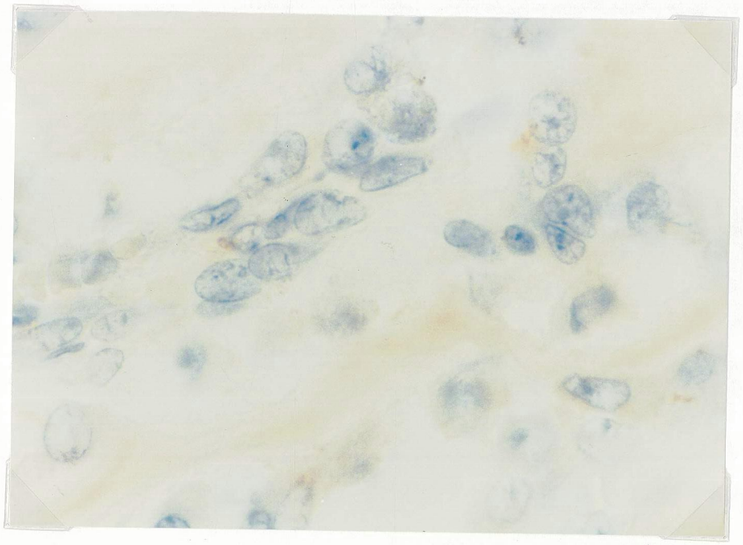
A PNA neuraminidáz emésztés nélkül csak a 15 - 17. embrionális héten mutatott kötődést. Neuraminidáz emésztéssel a 15. héttől fokozott intenzitással lehetett az óriássejtekben a PNA kötő helyeket kimutatni (20. ábra).

A 3 hónapos csecsemő femurjának, valamint ennél idősebb csontok vizsgálata során hasonló eredményt kaptunk PNA lektint használva. Neuraminidáz emésztés nélkül ezekben az esetekben sem kaptunk reakciót. A neuraminidáz emésztés azonban jelentős mértékben szabadított fel PNA kötő helyeket az óriássejtekben. Az osteoclastokon a PNA reakció kettős megjelenésű volt. Azokban az osteoclastokban, amelyek nem a csonttrabekulák felszínén, hanem szövetkötelékben voltak, a PNA kötődés granularis intracitoplazmatikus formában jelent meg (21. ábra). Ezzel ellentétben a csontfelszineken található osteoclastokban az intracitoplazmatikus, granularis kötődés lecsökkent, mellyel párhuzamosan a reszorpciós zóna egy jól meghatározott membrán szegmentuma vált igen erősen pozitívvá (22. ábra).

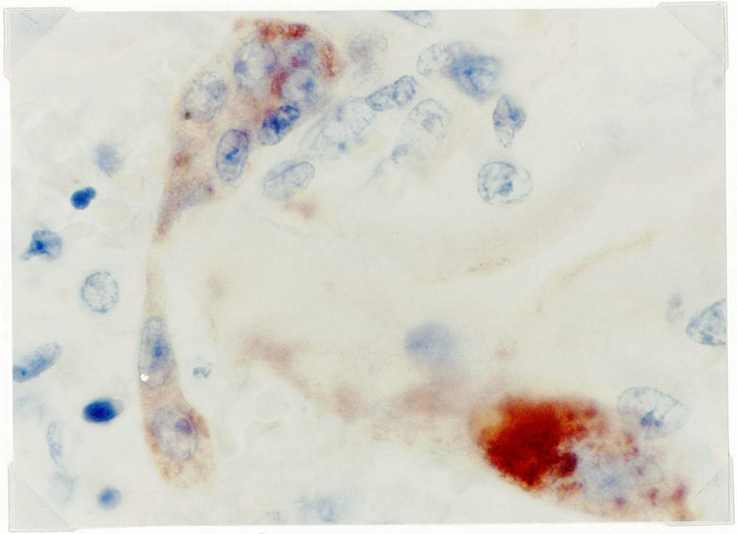
Sem az intracitoplazmatikus, sem a membrán reakció 0,2 M D-galaktóz és PNA lektin együttes inkubációja után nem volt megfigyelhető, mely blokkolódás bizonyítéka a reakció specifikus voltának. Az osteoblastok eddigi észleleteinkkel összhangban nem kötötték a PNA lektint. Az újonnan képződött osteoid azonban PNA kötő volt, mely kötést nem tudtuk 0,2 M D-galaktózzal blokkolni. Ez a tény felveti annak lehetőségét, hogy az osteoid a PNA lektint nem a specifikus cukor kötő helyein keresztül, hanem un. aspecifikus kötő helyen keresztül kötötte meg.



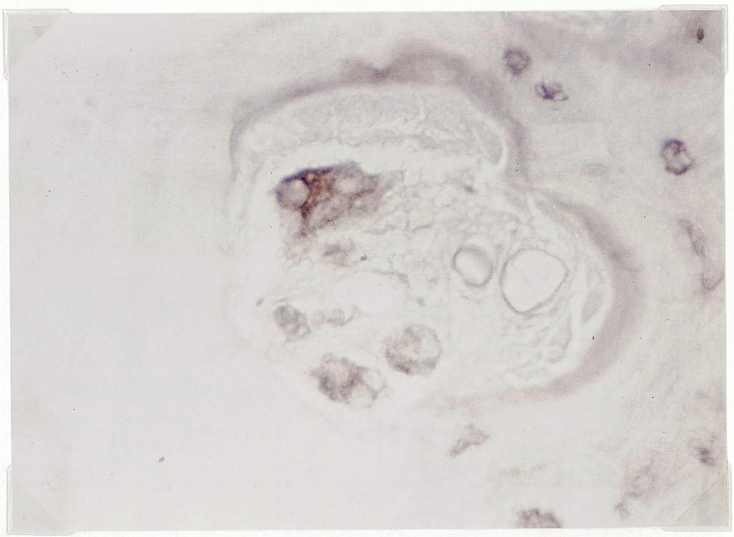
18. ábra: ***Újszülött femur, Con A jelölés, 1000 x,*** *A vizsgálat során csak elvétve észleltünk igen gyenge pozitivitást. A sejtek nem kötötték a lektint.*



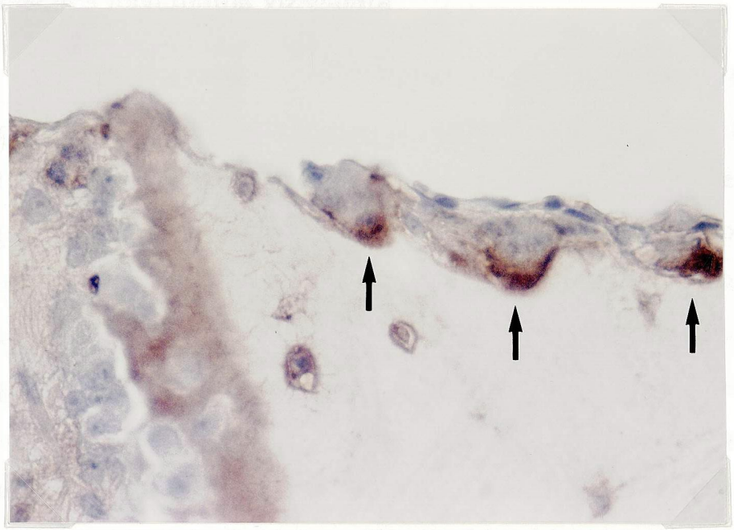
19. ábra: ***Újszülött femur, WGA kötés, 1000 X,*** *A sejtek jelentős része nem köti a lektint. Elvétve észlelhető igen gyenge perinukleáris pozitivitás, mely a későbbi életkorra teljesen megszűnik.*



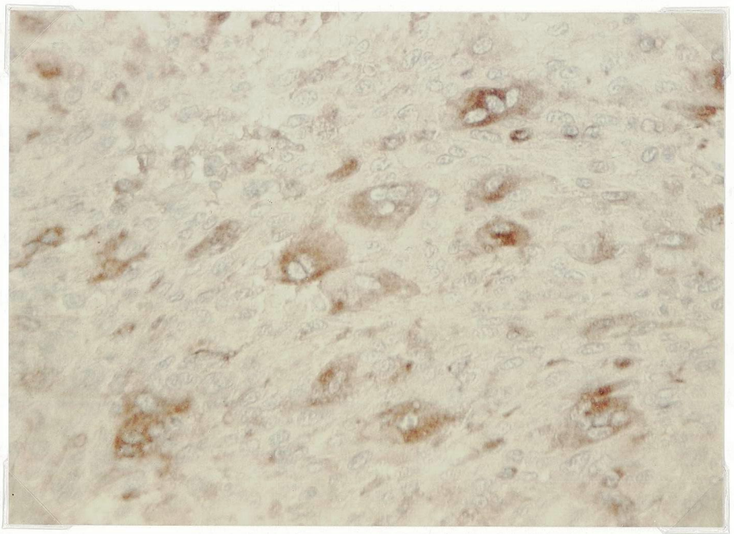
20. ábra: ***Újszülött femur, N-PNA jelölés, 1000 X,*** *Neuraminidáz emésztés után az óriássejtek egy része PNA kötővé vált. Neuraminidáz emésztés nélkül egyetlen óriássejt sem kötötte a lektint.*



21. ábra: ***Normál csont, N-PNA jelölés, 1000 X,*** *A szövetkötelékben levő osteoclastok diffúz, intracytoplasmatikus formában kötik a PNA lektint.*



22.____ábra: ***Normál csont, N-PNA kötés, 1000 x,*** *A lebontandó csontfelszínre tapadt osteoclastokban membrán jelölődés észlelhető (nyilak). Az osteoid aspecifikus reakciója látható a negatív osteoblastok mellett.*



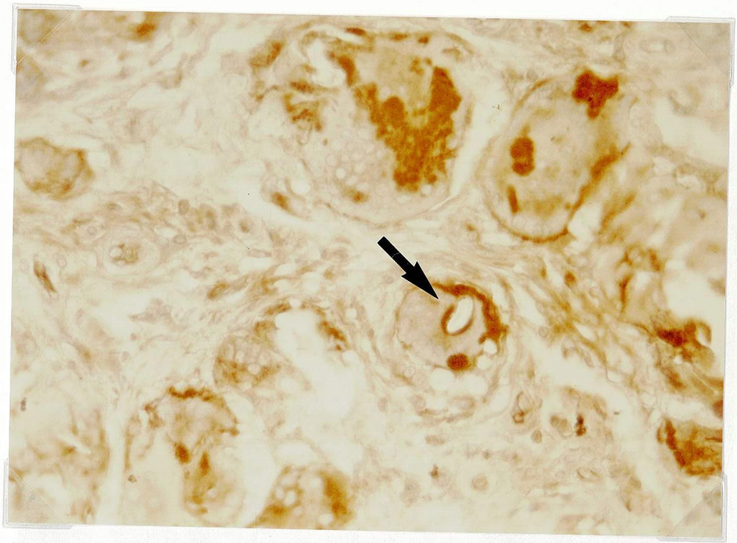
23.____ábra: ***Osteoclastoma, WGA jelölés, 400 X,*** *Neuraminidáz emésztés nélkül is látunk pozitív reakciót az óriássejtekben.*

Óriássejtes folyamatok vizsgálata

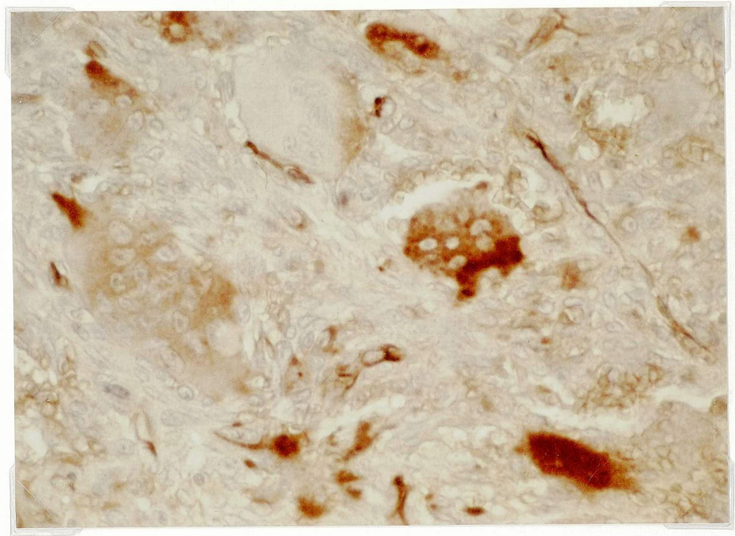
Kezdetben az óriássejtek lektin-hisztokémiai vizsgálatát azok eredetének meghatározására, ill. a feltételezett eredet bizonyítására kívántuk használni. Az osteoclastok eredetét magyarázandó számos teória létezik. Magunk részéről a monocyta-macrophag eredetet próbáltuk meg a lektin-hisztokémia módszereivel bizonyítani és/vagy cáfolni. Ennek érdekében vizsgáltunk olyan óriássejtes folyamatokat, ahol az óriássejtek eredete egyértelműen tisztázott. Idegentest granulomát, epulist hasonlítottunk össze lektinkötés tekintetében óriássejtes csonttumorokhoz (osteoclastomákhoz). Idegentest granulomában Con A és DBA lektinekkel nem észleltünk reakciókat. WGA lektinnel neuraminidáz emésztés nélkül is láttunk osteoclastomákban kötődést, mely az emésztést követően eltűnt. Ezért e reakció bizonyítéka a WGA lektin neuraminsav kötő képességének. Érdekes azonban, hogy normál csontok WGA kötése igen kis intenzitású, néhol nem is észlelhető (23. ábra).

PNA lektint előkezelés nélkül nem kötötte az elváltozásban levő egyetlen sejt sem. Neuraminidáz emésztés után azonban az idegentest típusú óriássejtek PNA lektinkötővé váltak (24. ábra). Az óriássejtekben a citoplazmában intenzív finoman szemcsés reakció volt látható, mely pozitivitás az idegentestek környezetében is megfigyelhető volt. Teljesen hasonló lektinkötést mutatott az epulisban található óriássejtek nagy része is (25. ábra), azzal a különbséggel, hogy egyes esetekben a reakció a sejtek citoplazmájának egy széli területére koncentrálódott.

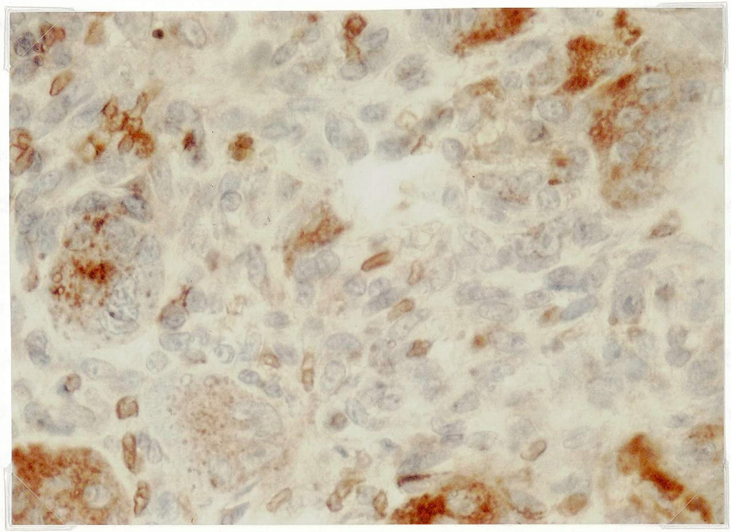
Az osteoclastomákban igen érdekes reakció eloszlást figyeltünk meg. Az óriássejtek jelentős részében a neuraminidáz emésztést követő PNA reakció finoman szemcsés intracitoplazmatikus formában volt jelen (26. ábra). Ugyanazon tumor más területeiben az intracitoplazmatikus jelölődés lecsökkent és a normál csontoknál megfigyelt membrán reakció jelent meg. Egy lényeges különbség azonban szembetűnő volt. Míg normál csontok esetében membrán reakciót csak a lebontandó csontfelszínre kitapadt osteoclastokban sikerült kimutatni, addig osteoclastomákban akkor is látható egyes esetekben membrán reakció, mikor az óriássejtek környezetében nincs lebontandó csontfelszín (27. ábra).



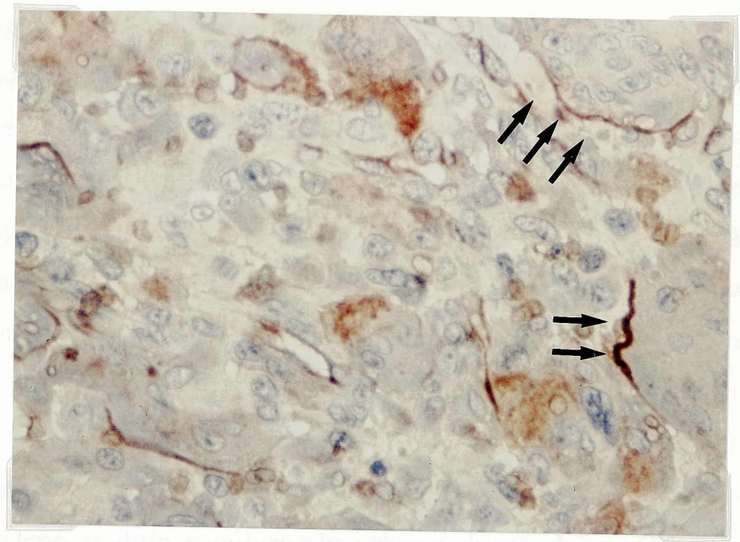
*24. ábra: **Idegentest granuloma, N-PNA jelölés, 1000 X***
Az idegentest típusú óriássejtek erős citoplazmatikus PNA kötést mutattak. A nyíl egy idegentestet mutat, melynek környezetében a lektinkötés intenzív.



25. ábra: ***Epulis, N-PNA jelölés, 1000 X,***
Az óriássejtek eltérő intenzitású jelölődése figyelhető meg, mely esetleges funkcióbeli eltérést is tükrözhet.



26. ábra: ***Osteoclastoma, N-PNA kötés, 1000 X,***
Hasonlóan a normál csontokhoz, az osteoclastokban finoman szemcsés intracitoplazmatikus reakció figyelhető meg.



*27. ábra: **Osteoclastoma, N-PNA kötés, 1000 X,***
A tumor egyes területeiben akkor is megfigyelhető a normál csontoknál észlelt membrán reakció, ha nincs a sejtek közelében lebontandó csontfelszín (nyilak).

Osteoclastomák vizsgálata

A vizsgált osteoclastomákban néha igen gyenge reakciót, néha pedig igen erős reakciókat észleltünk. Ezen reakció-intenzitás változásokat nem tudtuk kezdetben magyarázni. Mint ismeretes az osteoclastomáknak szövettani megjelenésében három stádium különíthető el, mely stádiumok pontos meghatározása a terápiás beavatkozás minőségét tekintve igen fontos. Feltételeztük, hogy a neuraminidáz emésztést követő lektinkötés intenzitásának a változása valamilyen kapcsolatban lehet a szövettani stádiumokkal. Operált osteoclastomás betegeink anyagai közül random kiválasztott 18 esetet vizsgáltunk.

Beteganyagunk átlagéletkora 36,6 év. A legidősebb beteg 69 éves, míg a legfiatalabb 14 éves volt. Vizsgált betegeink

közül 10 nő és 8 férfi volt. Lokalizációt tekintve a hosszú csöves csontok epiphysisére lokalizálódott 16 tumor. Ezen kívül egy mandibula és egy hallux lokalizációjú tumort vizsgáltunk. Eseteinket mind radiológiai, mind szövettani megjelenés alapján stádiumokba osztottuk. A radiológiai stádium meghatározásánál Campanacci és mtsai. által ajánlott beosztást használtuk (Campanacci és mtsai 1975, 1987). Latens az a stádium amikor is a tumor jól meghatározható határokkal bír, a csont cortexe intakt és nem deformált. Eseteink közül ebbe a radiológiai stádiumba tartozott 3 beteg. Aktív a tumor, amikor relatíve jó határokkal bír, de nincs radiopaque szegélye és a cortex valamint az itt már megjelenő reaktív csontszegély vékony, kissé deformált, de még intakt. Ebbe a stádiumba tartozott eseteink közül 6. Agresszív stádiumban volt 9 esetünk, amire jellemző, hogy az elváltozás egyenetlen határú, valamint az, hogy a tumor a lágyrészeket is infiltrálja.

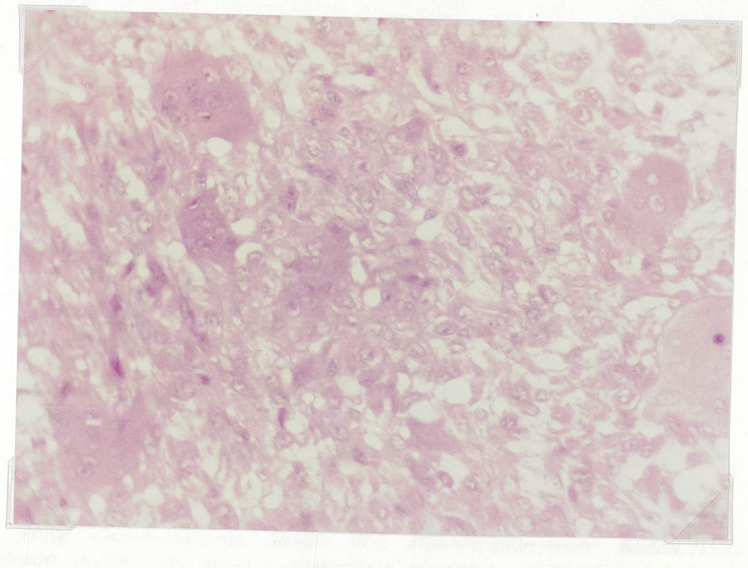
A szövettani stádium beosztásra a Jaffe (1940) valamint Juhász (1980) által ajánlott beosztást használtuk mely szerint Gr I-es stádiumú a tumor ha számos osteoclast jelenléte mellett a stroma kiérett és kis helyet foglal el (28. ábra) Gr II-es a tumor, ha a stroma felszaporodik az óriássejtek rovására és a stromában mérsékelt polimorfia és elszórtan mitózisok észlelhetők (29.ábra). Gr III-as stádiumú a tumor amikor is a sejtdús, kifejezett polimorfiát mutató, sarcomatózus stromában találhatók az óriássejtek (30. ábra). Eseteinkből mindhárom szövettani stádiumba 6 - 6 eset tartozott. Itt kell megjegyeznünk, hogy a Gr III-as stádiumba tartozó eseteink közül 1 az első észlelés után 1 évvel, 1 másfél évvel, 1 pedig 3 évvel lokális recidíva és tüdő metasztázisok következtében exitált.

DBA lektinekkel sem az óriássejtekben sem pedig a stromális sejtekben nem kaptunk pozitív reakciót. WGA-val végzett vizsgálataink során az óriássejtek intenzív festődését figyeltük meg. Neuraminidáz emésztés után jelentős mértékben csökkent a WGA pozitív óriássejtek száma. A stromális sejtek mind neuraminidáz emésztés előtt, mind az után negatívak maradtak WGA lektinnel.

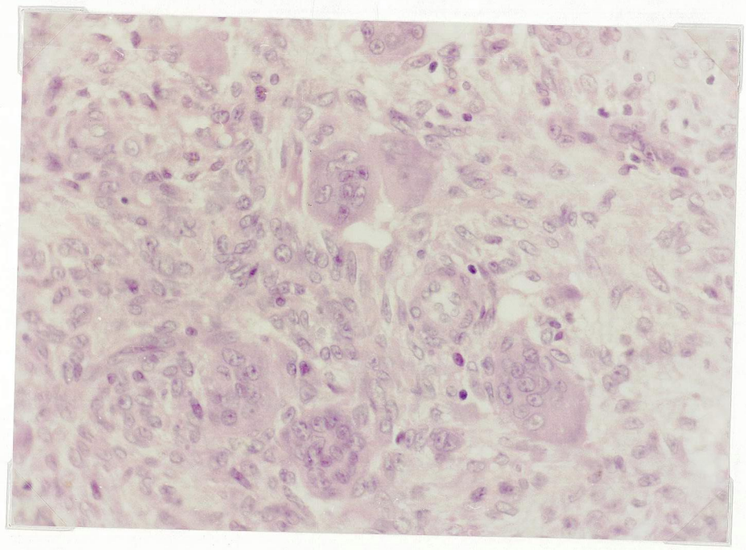
Az alapállományt alkotó egyes stroma elemek Con A lektinnel mutattak pozitív reakciót. A Con A lektinnel reagáló sejtek orsószerűen megnyúlt magvú, elnyújtott citoplazmájú, fibroblastokra emlékeztető sejtek, melyekben a Con A kötődése diffúz intracitoplazmatikus volt és α-metilmannosid hozzáadásával blokkolni lehetett. Ugyanakkor a tumorokban nem minden stromális sejt kötötte a Con A lektint. A negatív stromális sejtek általában kerek, vagy ovoid magvú és citoplazmájú, makrophag szerű sejtek voltak. A Con A pozitív sejtek száma a Gr III-as stádiumú elváltozásokban több volt mint a Gr I-es és a Gr II-es csoportba tartozó tumorokban mely mellett az is szembeötlő volt, hogy a Con A kötés erőssége a Gr III-as stádiumú tumorok esetében (31. ábra) erősebb volt mint a Gr I-es ill. a Gr II-es tumorokban (32. ábra). Megjegyzendő, hogy a kiértékelést megnehezítette az a tény, hogy a Con A a specifikus intracitoplazmáris kötődés mellett jelentős aspecifikus háttér festődést is eredményezett melyet α-metilmannosiddal nem tudtunk blokkolni.

Vizsgálatainkban a PNA lektin az óriássejtek jó markerének bizonyult. Bár neuraminidáz emésztés nélkül egyetlen esetben sem kaptunk pozitív reakciót, neuraminidáz előemésztés jelentős mennyiségű PNA kötőhelyet szabadított fel az

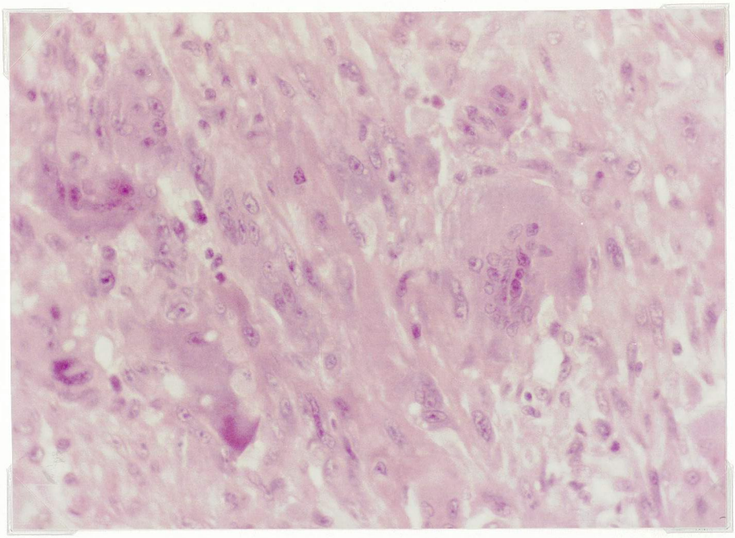
óriássejtekben. A PNA kötődése neuraminidáz emésztést követően minden esetünkben felismerhető, de a már fentebb említett felvetésnek megfelelően, az egyes szövettani stádiumokban más - más jellegű és intenzitású volt. Gr I-es osteoclastomákban nem minden óriássejtben volt megfigyelhető. 100 osteoclastot megszámolva átlag 31 nem kötötte a PNA-t. A kötődés intenzitását szemikvantitatív módon vizsgálva (+ ⇨ gyenge reakció, ++ ⇨ közepes reakció, +++ ⇨ erős reakció) gyenge reakciót mutatott 100 óriássejtből 45. Közepes reakciót (++) 18 sejtben míg erős reakciót (+++) mindössze 5 - 6 sejtben észleltünk (I grafikon). Feltűnő volt az is, hogy a gyenge reakciók mindig diffúz intracitoplazmáris jellegűek voltak, míg az erős reakciót az osteoclastok egy jól körülhatárolt membrán szegmentumán észleltük (33. ábra). A Gr II-es csoportba tartozó tumorok esetében csak 2 - 3 osteoclastot találtunk 100-ból negatívnak és a gyenge reakciót mutató sejtek száma is csökkent (20-21 %). Jelentősen megnőtt a közepes erősségű (52 %) valamint az erős reakciót mutató sejtek aránya (23 %) (I. grafikon) (34. ábra). A Gr III-as stádiumú tumorokban PNA negatív sejtet csak elvétve lehetett találni. A gyenge reakciót mutató sejtek aránya 10 % alatt maradt, míg a közepes reakciójú sejtek aránya 20 % körül mozgott. Az óriássejtek nagy része igen erős intracitoplazmatikus PNA kötést mutatott (35. ábra) (I. grafikon). A Gr II és Gr III-as stádiumú tumorokban sohasem láttunk az osteoclastok membránjára lokalizált PNA kötést, ami a Gr I-es esetekben rendszeresen felismerhető volt. Mindhárom stádiumú osteoclastomás esetünkben elszórtan a kerek ill. ovoid magvú mononukleáris stromális sejtekben is észleltünk diffúz, intracitoplazmatikus PNA kötést.



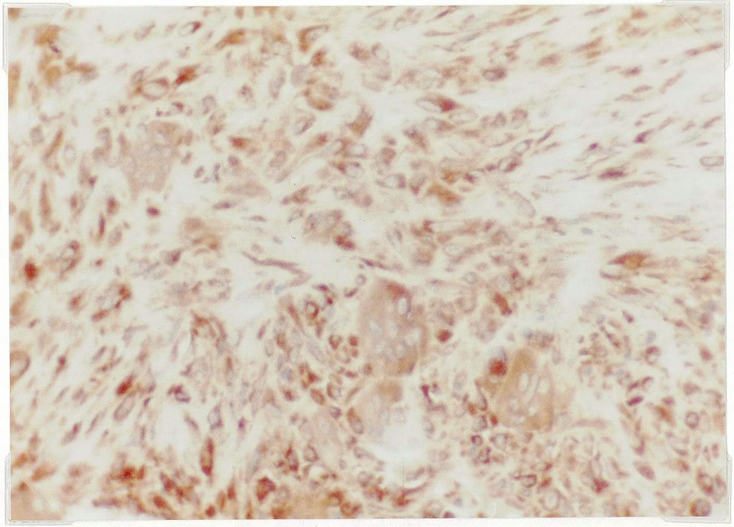
28. ábra: ***Oteoclastoma (Grade I.) Hematoxilin-eozin festés 1000 X,*** *Grade I-es tumorban számos osteoclast mellett kiérett stroma látható.*



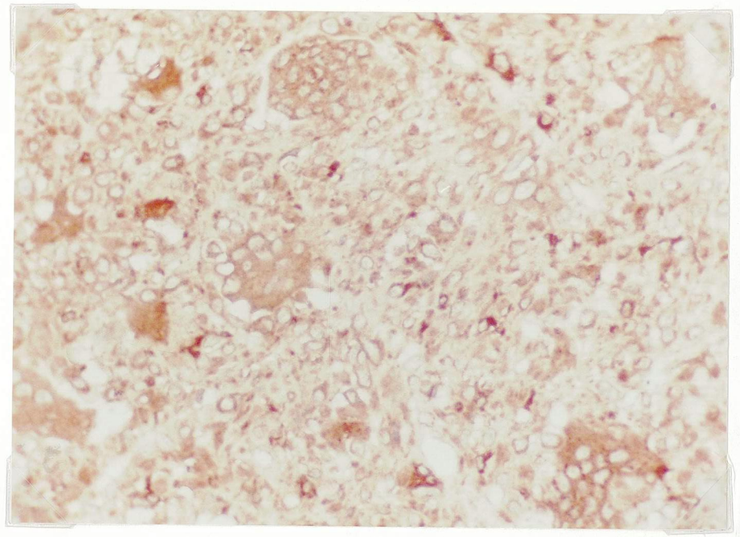
29. ábra: ***Osteoclastoma (Grade II.) Hematoxilin-eozin festés, 1000 X,*** *Grade II-es tumorban felszaporodott stromában elszórtan osteoclastok láthatók. A stroma mérsékelt polimorfiát mutat.*



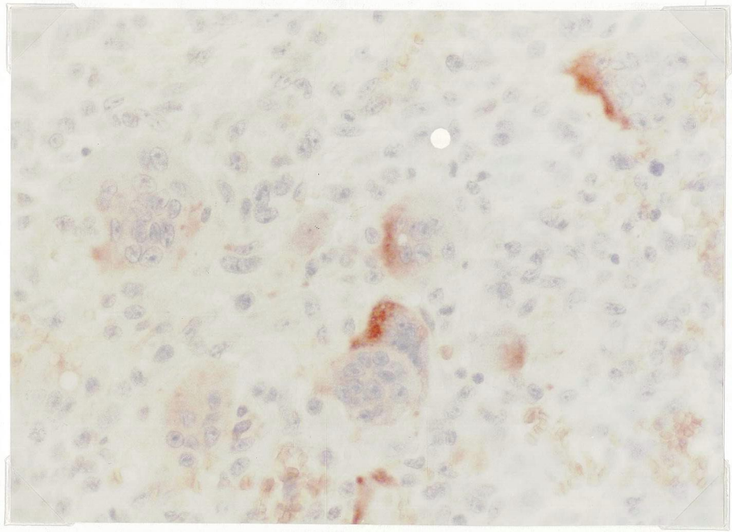
30. ábra: ***Osteoclastoma (grade III.), Hematoxilin-eozin festés,1000 X,*** *Kifejezett polimorfiát mutató stromában elszórtan óriássejtek találhatók. A stromára jellemző a magas mitózis szám.*



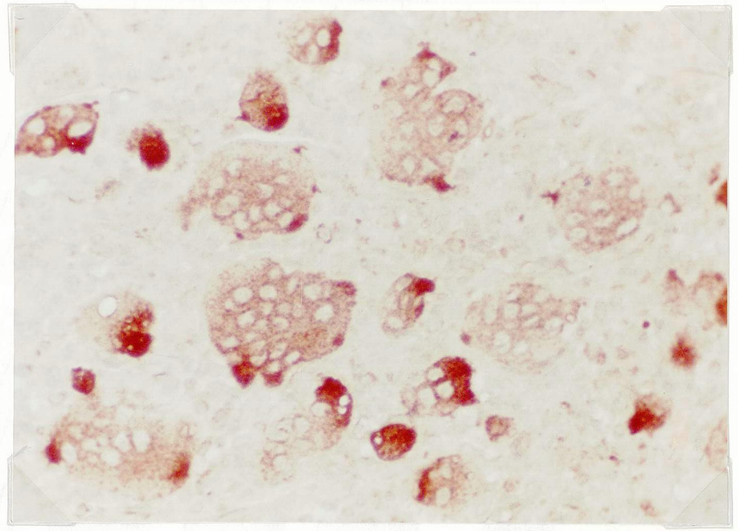
31. ábra: ***Osteoclastoma (Grade III.) Con A jelölés, 1000 X,*** *Mind az orsószerű, megnyúlt citoplazmájú sejtekben, mind az óriássejtekben kifejezett Con A pozitivitás figyelhető meg.*



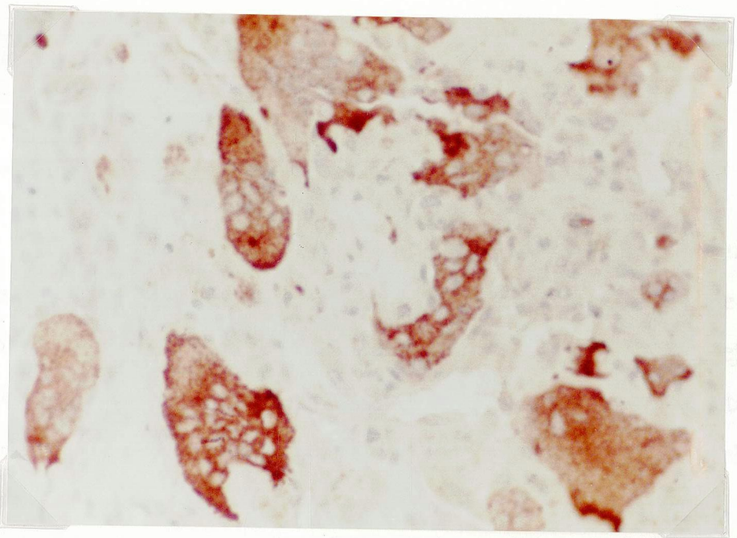
32. ábra: ***Osteoclastoma (Grade II) Con A kötés, 1000 X,*** *A tumor stromális sejtjei közül számos köti a Con A lektint csakúgy, mint az óriássejtek. Intenzitásában ez a reakció kisebb mint a Gr. III-as tumoroknál.*



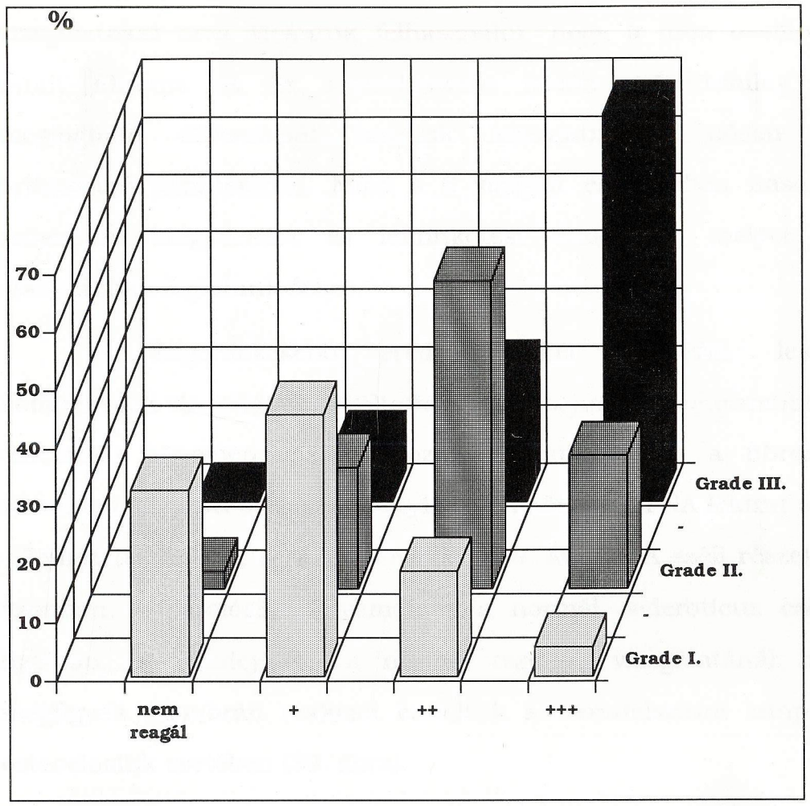
33. ábra: ***Osteoclastoma (Grade I.), N-PNA jelölés, 1000 X,*** *Az osteoclastok jelentős részében kifejezetten gyenge a reakció. Az erős reakció mindig a sejtmembrán egy jól definiált membrán szegmentumán látható.*



34. ábra: ***Osteoclastoma (Grade II.), N-PNA jelölés, 1000 X,*** *Az osteoclastok jó része közepes ill. erős reakciója látható PNA lektinnel neuraminidáz emésztés után.*



35. ábra: ***Osteoclastoma (grade III.), N-PNA jelölés, 1000 X,*** *Az osteoclastok majd mindegyike igen erősen köti a PNA lektint emésztés után.*



I.sz. grafikon: Az óriássejtek PNA lektin kötése a stádium függvényében.

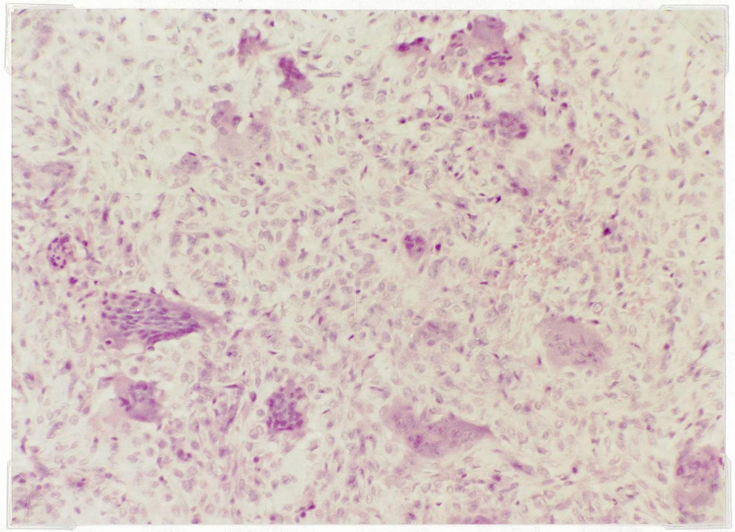
Nem ossificalo csont fibroma vizsgálata

A nem ossificalo csont fibroma benignus, kollagenetikus reaktív lézió, melynek szövettani képére a fibroblastok felszaporodása a jellemző. A kötőszöveti sejtek nyalábokba rendeződnek, változó irányú örvényes lefutású kötegeket alkotva. A fibroblastokban gazdag területeken többmagvú óriássejtek találhatók nagy számban (36. ábra). Az elváltozás ilyenkor nagymértékben hasonlít osteoclastomára (37. ábra). Differenciál diagnosztikai problémát elsősorban az osteoclastomáktól történő elkülönítése jelent, főleg akkor, amikor az elváltozás számos osteoclastot tartalmaz. A lektin-hisztokémiai

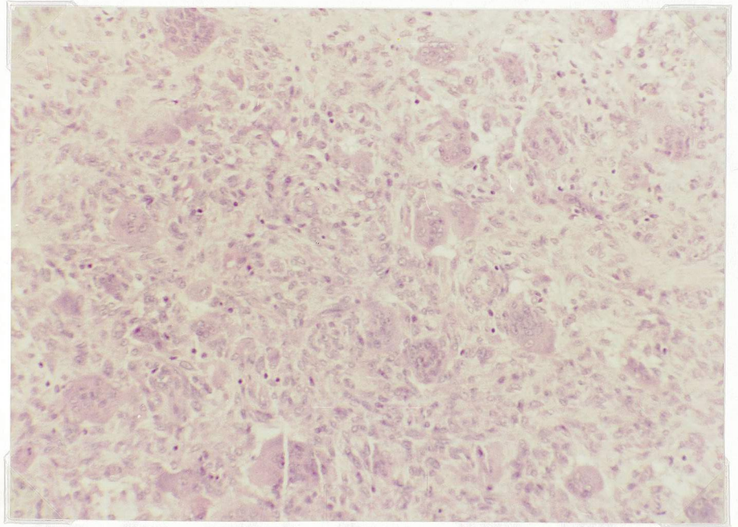
vizsgálatokat arra kívántuk felhasználni, hogy a nem ossificalo csont fibroma és az osteoclastoma között szövettanilag jól megfogható differenciát tudjunk kimutatni különösen az óriássejtek tekintetében. Mind a 6 vizsgált esetünkben hasonló szövettani megjelenést és lektinkötést észleltünk melyet az alábbiakban foglalunk össze.

Legérdekesebb eredményeinket a PNA lektin kötődésének vizsgálata szolgáltatta az óriássejtekben neuraminidáz emésztést követően. Az elváltozások centrumában a fibrosus stromába ágyazott óriássejtek egyike sem kötötte a PNA lektint sem előemésztés nélkül, sem azt követően (38. ábra). A széli részeken azonban, a patológiás folyamat és a normál, scleroticus csont határán, igen kifejezett, a normál csontok vizsgálatánál már megfigyelt membrán reakciót észleltük a csontfelszínre kitapadt osteoclastok esetében (39. ábra).

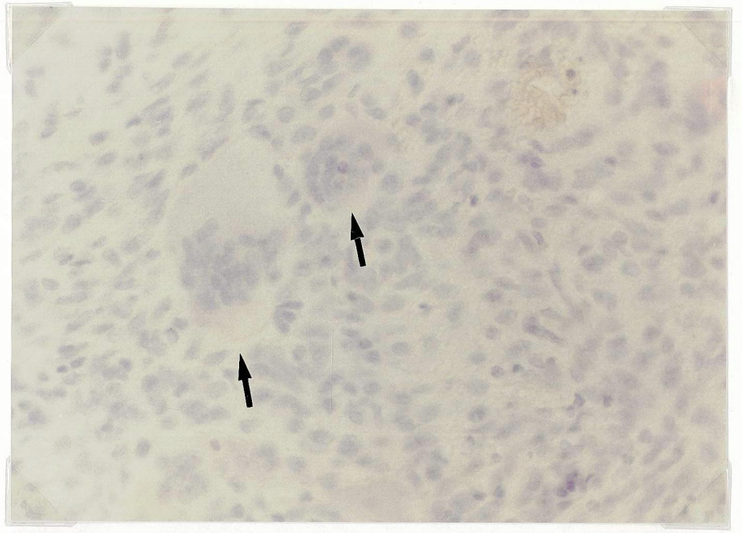
Con A lektinnel a stromális sejtek jelentős részében finonszemcsés intracitoplazmatikus reakciót láttunk, mely reakció erőssége jelentősen meghaladta a grade I-es osteoclastomák esetében észlelt pozitivitást. Az óriássejtek Con A lektinnel is adtak diszkrét reakciót (40. ábra). Nem ossificalo csont fibromában a vizsgált egyéb lektinekkel nem észleltünk pozitív reakciót.



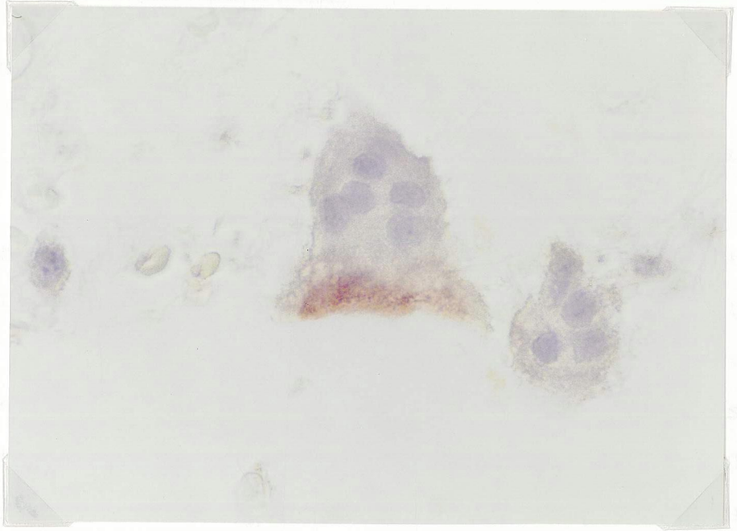
36. ábra: ***Nem ossificalo fibroma, HE. festés 400 X,*** *Az örvényes lefutású fibrosus stromába ágyazottan számos óriássejt figyelhető meg.*



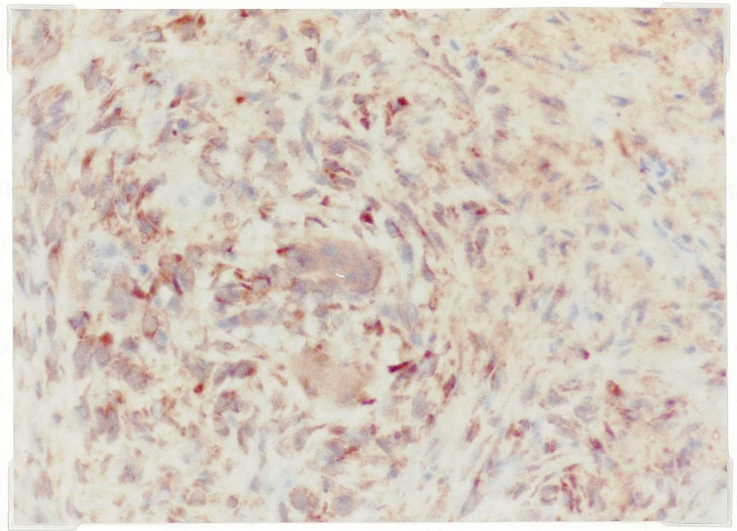
37. ábra: ***Osteoclastoma (Grade II), HE. festés 400 X,*** *Differenciál diagnosztikai problémát jelenthet a két elváltozás elkülönítése.*



38. ábra: ***Nem ossificalo fibroma, N-PNA jelölés, 1000 X,*** *Az elváltozás centrumában elhelyezkedő óriássejtek egyike sem reagált neuraminidáz emésztést követően sem a PNA lektinnel (nyilak).*



39. ábra: ***Nem ossificalo fibroma, N-PNA jelölés, 1000 X,*** *A patológiás folyamat és a normál csont határán a csontfelszínre kitapadt aktív óriássejtekben intenzív membrán reakció látható. Az inaktív óriássejtekben nem észlelhető reakció.*



40. ábra: ***Nem ossificalo fibroma, Con A jelölés, 1000 X,*** *A stromális sejtek jelentős részében finomszemcsés reakció látható. Az óriássejtek is diszkrét reakciót adnak.*

Osteoid osteoma vizsgálata.

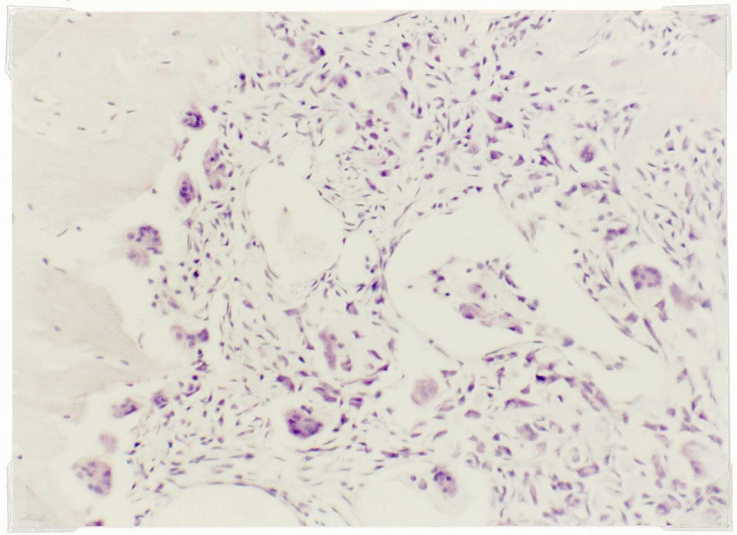
Az osteoid osteoma benignus, osteogeneticus, reaktív lézió. Szövettani megjelenésére a szabálytalan, vékonyabb, vastagabb, egymással összefüggő, néhol gerendákat alkotó osteoid szövet képződése a jellemző. Az osteoid gerendák között igen sejtdús, fiatal osteogen mesenchyma megléte a jellemző óriássejtektől kísérve (41. ábra). Az elváltozásban az osteoblastok az újonnan képződött osteoid felszínén néhol több rétegben helyezkednek el ugyanúgy mint az óriássejtek, mely sejtek pontos eredete nem tisztázott. Feltehető azonban, hogy ezek az óriássejtek is osteoclastok (42. ábra).

Mivel a folyamat pontos patogenezise máig sem ismert, lektin hisztokémiai vizsgálatainktól várható volt, hogy esetleges

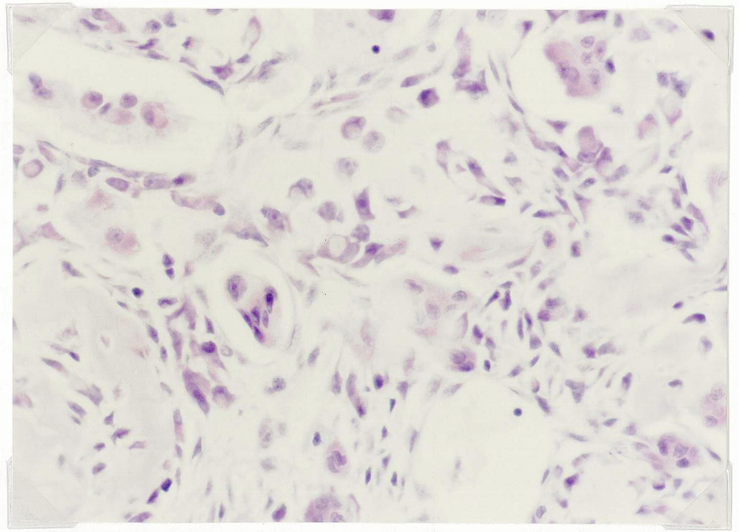
újabb szempontot sikerül találnunk, mely közelebb visz a folyamat patogenezisének megértéséhez.

Kezdeti vizsgálatainkat nem kísérte szerencse, hisz sem Con A, sem DBA, sem pedig WGA lektinekkel a folyamat legfőbb komponensének tartott osteoblastokban nem sikerült reakciót kimutatnunk. Meglepetésünkre az osteoid reagált mindhárom lektinnel, de különböző intenzitással. Legenyhébb reakciót DBA lektinnel sikerült kimutatni. Ennél erősebben reagált a Con A lektin, míg a legerősebb reakciót a WGA lektinnel észleltük (43. ábra). Sajnos ezek a reakciók nem tekinthetők specifikusnak, hisz egyetlen esetben sem sikerült a kötődést a lektinekre specifikus cukrok és a lektinek együttes inkubációjával blokkolni.

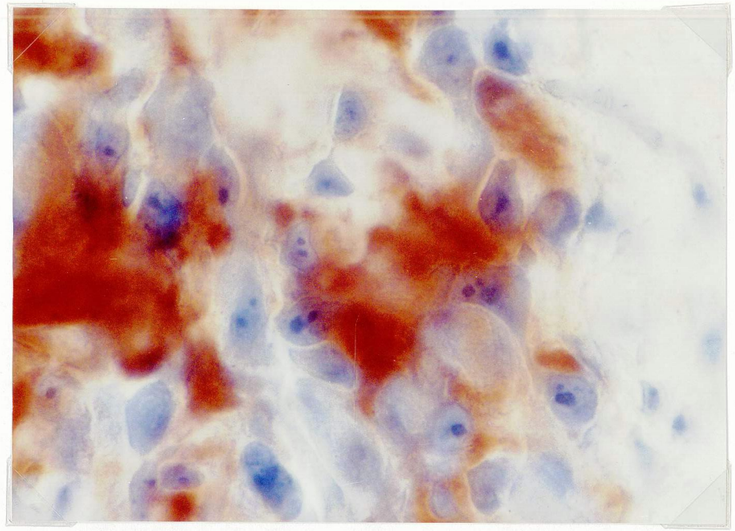
Meglepő eredményeket kaptunk azonban neuraminidáz emésztést követően a PNA lektin kötődését vizsgálva. Az elváltozás és a normál csont határán elhelyezkedő, a csontfelszínre kitapadó osteoclastokban igen intenzív, a lebontandó csontfelszinnel határos membrán szegmentumon észleltünk pozitív reakciót csakúgy, mint ahogy azt normál csontok esetében már megfigyeltük (44. ábra). A patológiás folyamat centrumában azonban csak diffúz, igen erős intracitoplazmatikus reakciót észleltünk függetlenül attól, hogy az óriássejt a csontfelszínre kitapadt vagy sem (45. ábra).



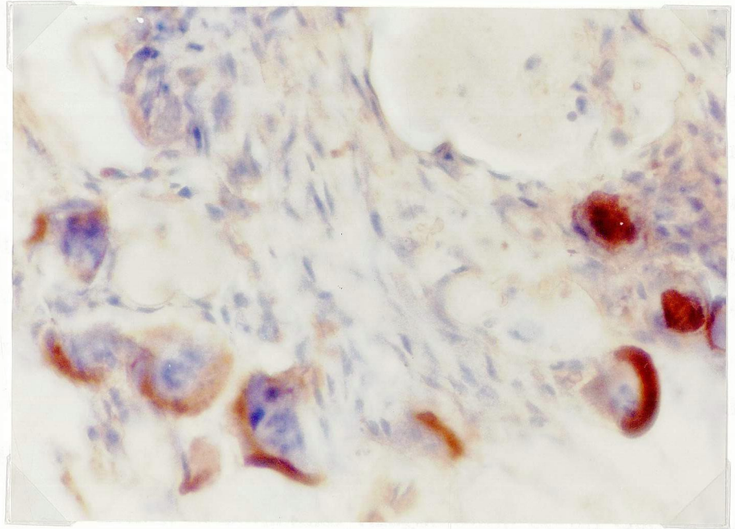
41. ábra: ***Osteoid osteoma, Hematoxilin-eozin festés 400 X,*** *Az elváltozásra fiatal osteogeneticus mesenchyma a jellemző osteoid képződéssel és óriássejtekkel.*



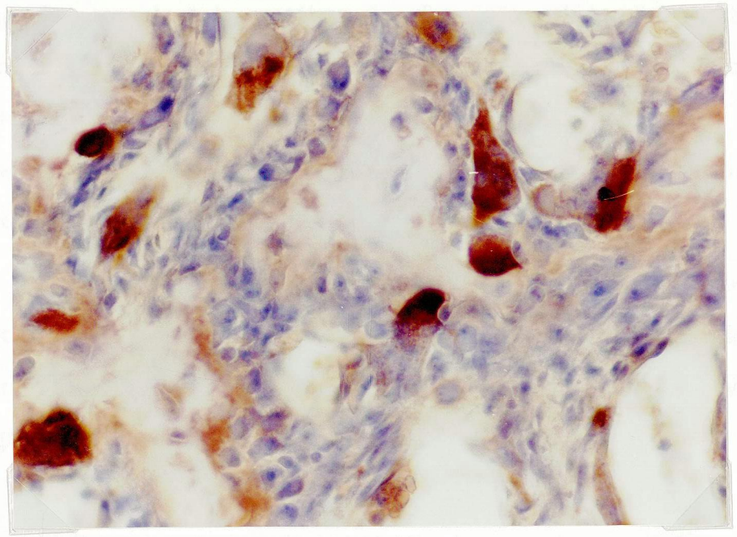
42. ábra: ***Osteoid osteoma, Hematoxilin-eozin festés, 1000 X,*** *Az osteoblastok az osteoid felszínén helyezkednek el. Számos óriássejt is megfigyelhető az osteoid gerendák között.*



43. ábra: ***Osteoid osteoma, WGA kötés, 1000 X,***
A Con A lektin kötődésénél jóval intenzívebb reakció volt megfigyelhető az osteoid területében. Ez a reakció is aspecifikusnak tekinthető, hisz nem volt blokkolható.



44. ábra: ***Osteoid osteoma, N-PNA jelölés, 1000 X,***
A normál csontfelszínre kitapadt osteoclastoknak a lebontandó csontfelszínnel határos membrán szegmentuma igen intenzíven jelölődött.



*45. ábra: **Osteoid osteoma, N-PNA jelölés, 1000 X,** Az osteoclastok diffúz, igen erős intracytoplasmatikus reakciója látható. Még akkor sem észlelhető membrán reakció ha az osteoclastok az újonnan képződött csont felszínére kitapadtak.*

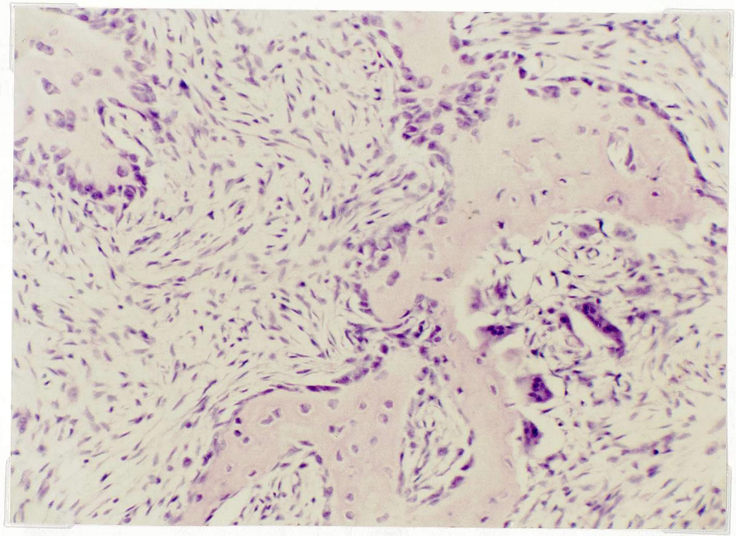
Fibrosus dysplasia vizsgálata

A fibrosus dysplasia valószínűleg csontfejlődési zavar következtében kialakuló elváltozás. Szövettani képére jellemző a fibrosus kötőszövet felszaporodása és a kötőszövetben metapláziás csontképzés jelenléte (46. ábra). Az új csontgerendák azonban szabálytalan lefutásúak, jellemzően szabálytalan un. "fonatos" szerkezetűek, környezetükben számos osteoclasttal (47. ábra). Bár az elváltozást a fejlődési rendellenességek csoportjába sorolják, a patogenezis nem teljesen tisztázott.

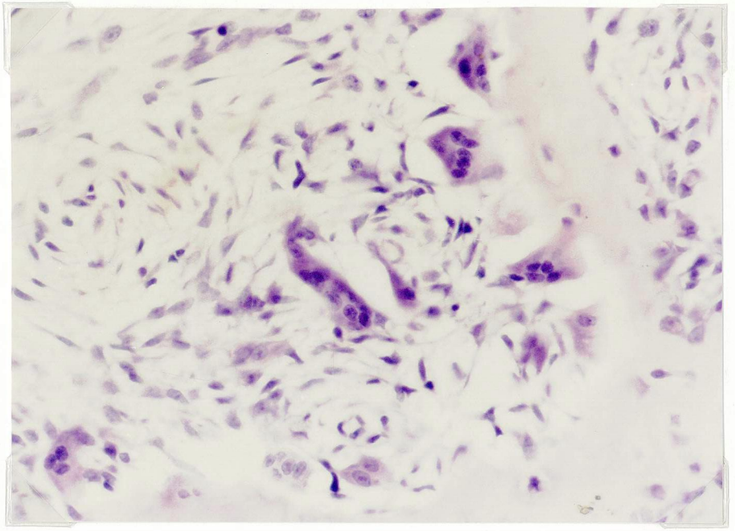
Lektin-hisztokémiai vizsgálataink során elsősorban az óriássejtek viselkedésére voltunk kezdetben kíváncsiak. Emiatt neuraminidáz emésztést követően PNA reakciókat végeztünk, melyek az eddig már többször észlelt lektin kötés megoszlást mutatták. A csontgerendák környezetében található ill. azokhoz

kitapadt osteoclastok esetében megfigyeltük itt is a lebontandó csontfelszin irányában az erős membrán jelölődést (48. ábra). A szövetkötelékben elhelyezkedő osteoclastok igen erős intracitoplazmatikus reakciót adtak. Ezekben a sejtekben sohasem észleltünk membrán jelölődést (49. ábra).

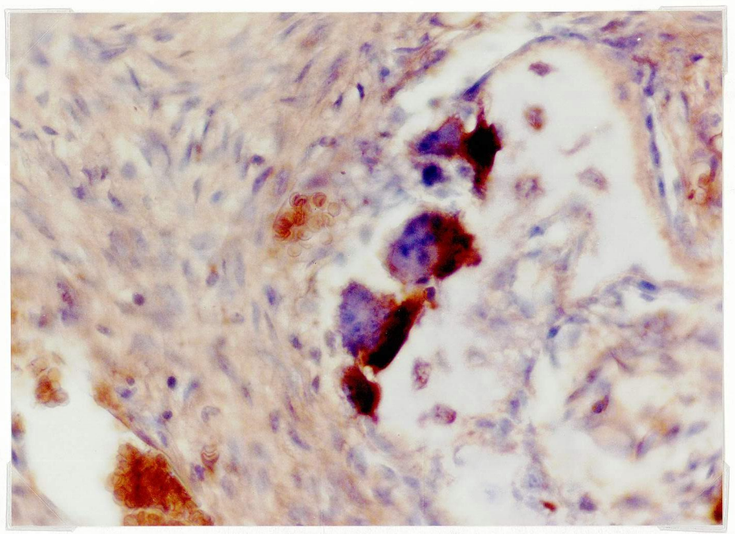
Míg DBA és WGA lektinekkel nem észleltünk pozitív reakciót, a fibrosus stromában képződő irreguláris csont felszínén viszont igen erős Con A pozitivitást adó sejtek voltak megfigyelhetők (50. ábra).



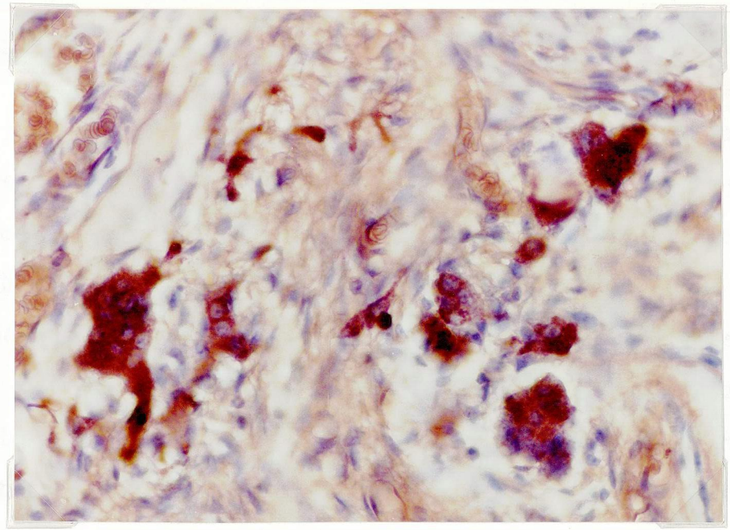
46. ábra: ***Fibrosus dysplasia, Hematoxilin-eozin festés, 400 X,*** *Kiérett fibrosus kötőszövetben elhelyezkedő csontgerendák felszínűkön osteoblastokkal valamint számos óriássejttel.*



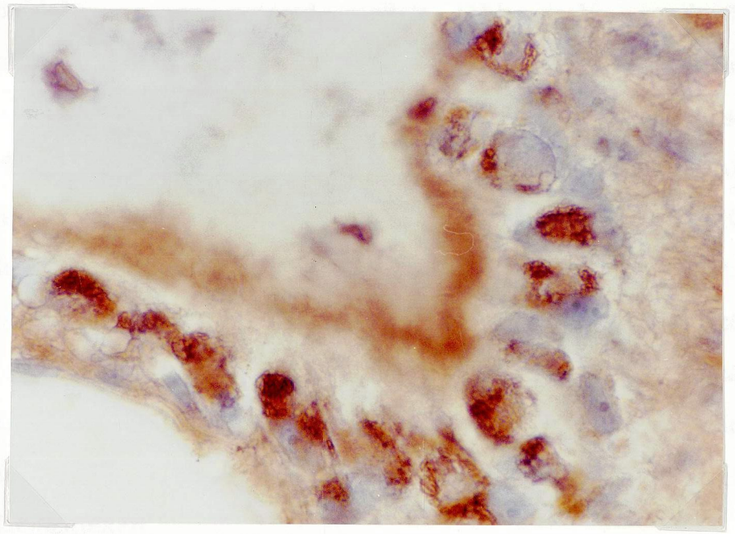
47. ábra: ***Fibrosus dysplasia, Hematoxilin-eozin festés, 1000 X,*** *A csontgerendák szabálytalan lefutásúak, elhajlanak. Felszínükön számos óriássejt figyelhető meg.*



48. ábra: ***Fibrosus dysplasia, N-PNA jelölés, 1000 X,*** *A csontgerendák környezetében ill. azokhoz kitapadt osteoclastokban a már megismert membrán reakciót észleltük igen intenzív mértékben.*



49. ábra: ***Fibrosus dysplasia; N-PNA jelölés, 1000 X,*** *A szövetkötelékben levő osteoclastok igen erős, diffúz intracitoplazmatikus reakciót mutattak a PNA lektinnel neuraminidáz emésztést követően.*



50. ábra: ***Fibrosus dysplasia, Con A jelölés, 1000 X,*** *A képződő csontgerendák felszínén majd mindegyik osteoblast igen intenzíven kötötte a lektint. Ilyen intenzitású elváltozást csak embrionális korban észleltünk osteoblastokon.*

Myositis ossificans vizsgálata

A 8 vizsgált eset mind klinikailag, mind hisztológiailag típusos myositis ossificansnak bizonyult. Szövettani vizsgálattal a léziókban az elváltozásokra jellemző zonális elrendeződést észleltük. 3 különálló zóna volt elkülöníthető: centrális, differenciálatlan zóna, középső átmeneti zóna és a széli területeken a kiérett csont zónája. A centrális zónában éretlen lazán szerveződött, erősen vascularisalt fibroblastikus szövet volt megfigyelhető, mely megjelenésében granulációs szövetre emlékeztetett. A korai elváltozásokban a centrális zónában elszórtan károsodott izomnyalábok is megfigyelhetők voltak. (51. ábra). A centrális zóna körül átmeneti terület volt látható, fibroblastokkal, újonnan képződött osteoiddal, s az osteoid mellett több sorba rendeződött osteoblastokkal (52. ábra). Csontképződés csak a legkülső zónára volt jellemző, melyben a csontgerendák felszínén egysoros osteoblast réteg helyezkedett el (53. ábra). Az egyes zónák nagysága a folyamat érettségének függvényében változott. Korai stádiumban (2-3 hét) a granulációs szövetre emlékeztető centrális zóna volt a legkifejezettebb. 4 és 6 hét között az osteoid képződés volt a legjellemzőbb, míg a 6. hét után az elváltozások legnagyobb részét kiérett csontszövet alkotta. Az igen késői elváltozásokban már az osteoclastok is megjelentek a csontfelszíneken.

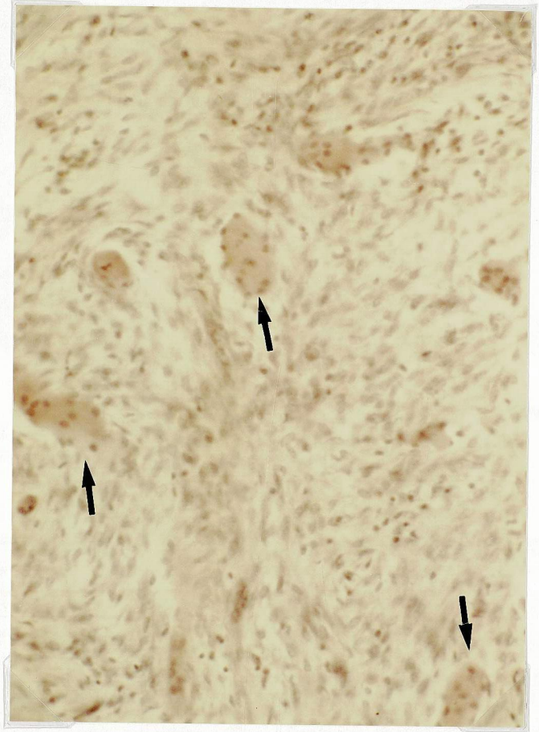
A myositis ossificans lektinkötését vizsgálva mind stádium, mind szövettani zóna szerinti különbségeket észleltünk. A betegség I stádiumára a károsodott izmok

környezetében elszórtan megjelenő WGA-pozitív sejtpopuláció volt a jellemző (54. ábra). Az I stádium későbbi szakában a WGA pozitív sejtek száma jelentősen felszaporodott és az elváltozások egészében diffúzan megtalálhatóvá vált (55. ábra). A lektinkötés intenzitása ezekben a kis sejtekben a szövettani stádiumtól függően változott. A legerősebb WGA-kötés a II. stádiumban volt megfigyelhető, ahol az osteoid felszínén elhelyezkedő sejtek mindegyike erős festődést mutatott (56. ábra). A WGA reakció a citoplazma perinuclearis régiójára lokalizálódott, mely terület megfelelhet a Golgi- komplexnek. Ugyanezen stádium későbbi időpontjában azonban a sejtek egy része már csökkent intenzitással kötötte a WGA lektint (57. ábra), míg a III. stádiumban az osteoid ossificatiojával párhuzamosan a csontgerendák felszínén lévő osteoblastok elvesztették WGA kötő képességüket. A WGA kötés minden esetben blokkolható volt 0,2 M N-acetil-glükózamin és a jelölt lektin együttes inkubációjával, mely a lektinkötődés specificitását mutatja. A WGA festődés intenzitása nem változott neuraminidáz emésztés után, ami azt bizonyítja, hogy a neuraminsav nem játszik lényeges szerepet az osteoblastok WGA kötésében, az teljes egészében N-acetil-glükózamin jelenlétének tulajdonítható.

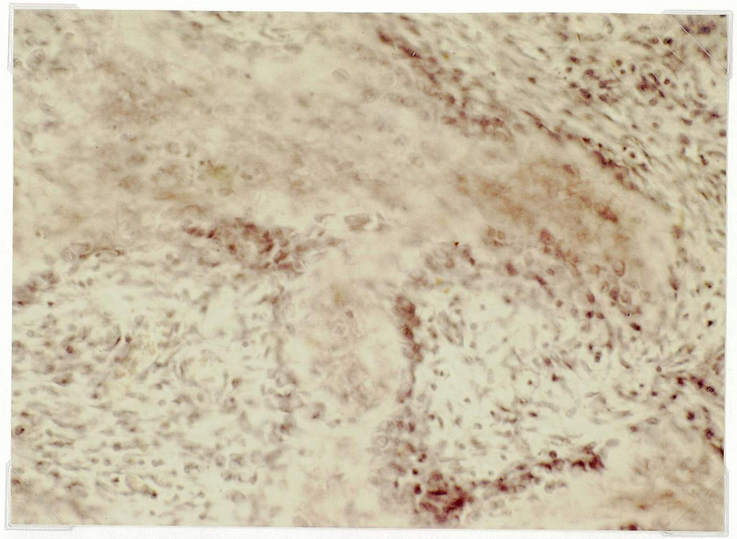
Myositis ossificansban a csontképző sejtek nem kötötték a PNA lektint. Neuraminidáz emésztést követően azonban a késői myositis ossificansban előforduló osteoclastok PNA kötővé váltak. A PNA kötés 0,2 M D-galaktózzal blokkolható volt.

Con A lektint használva mind az osteoblastok, mind az osteoclastok pozitívak voltak. Ez a jelölődés azonban az erős

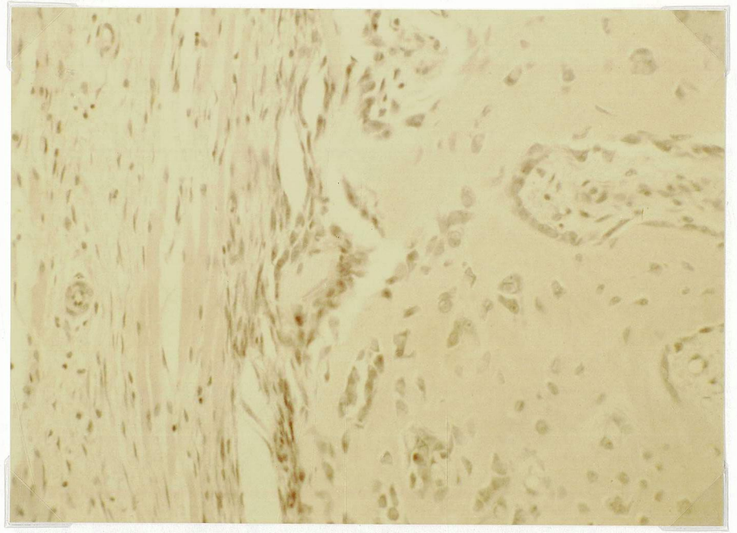
háttér festődés miatt nehezen volt értékelhető, míg a DBA lektinnel nem észleltünk pozitív reakciót.



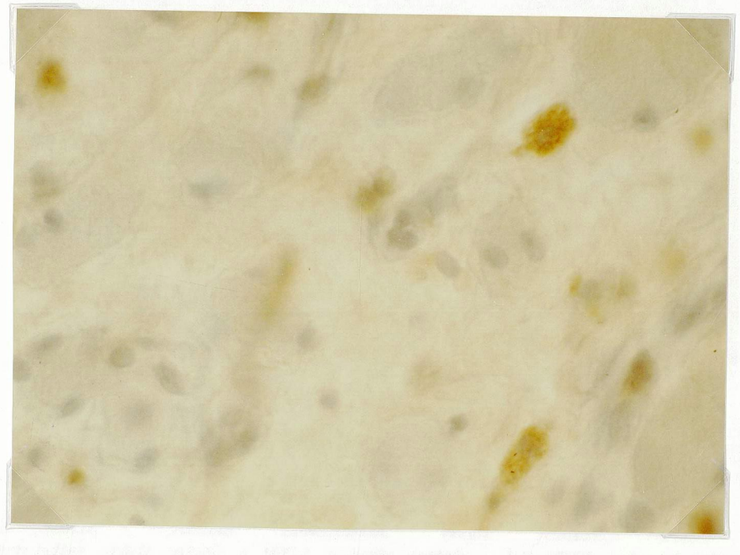
51. ábra: ***Myositis ossificans, Hematoxilin-eozin festés, 400 X,*** *A granulációs szövetre emlékeztető korai elváltozásban károsodott izomnyalábok is megfigyelhetők (nyilak).*



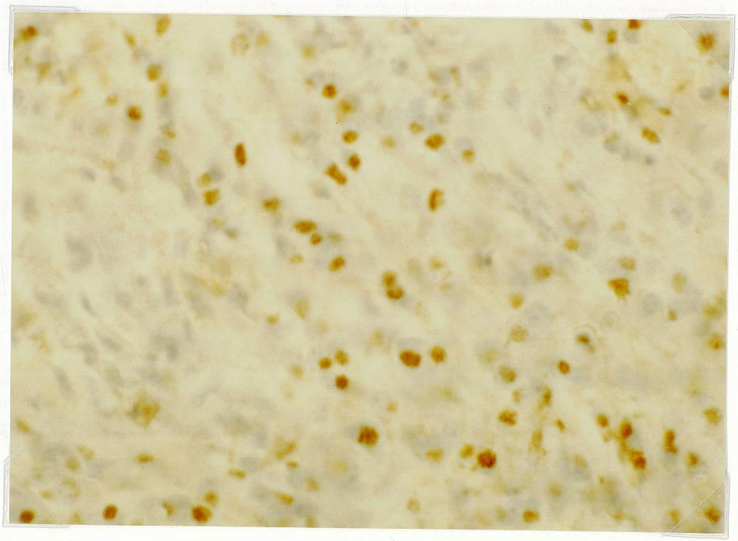
52. ábra: ***Myositis ossificans, Hematoxilin-eozin festés, 400 X,*** *Az átmeneti zónában újonnan képződött osteoid mellett több sorban elhelyezkedő osteoblast réteg látható.*



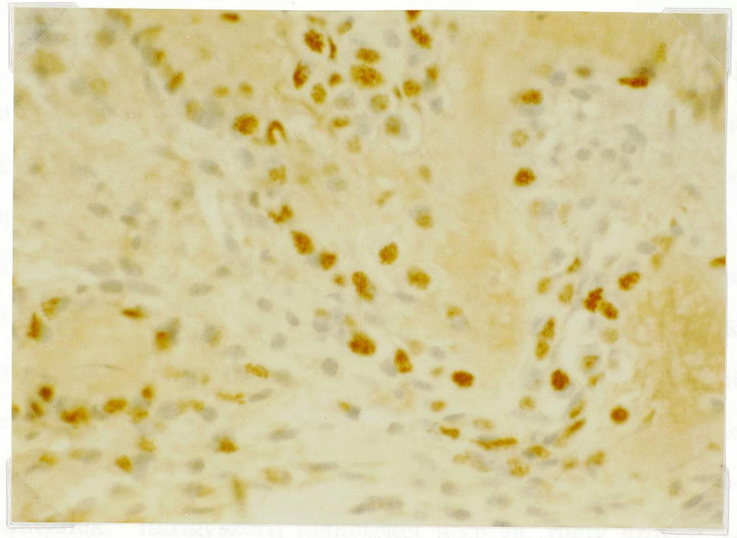
53. ábra: ***Myositis ossificans, Hematoxilin-eozin festés, 400 X,*** *Érett myositis ossificansra jellemző szöveti kép. Az izomnyalábok között kiérett csontszövet látható.*



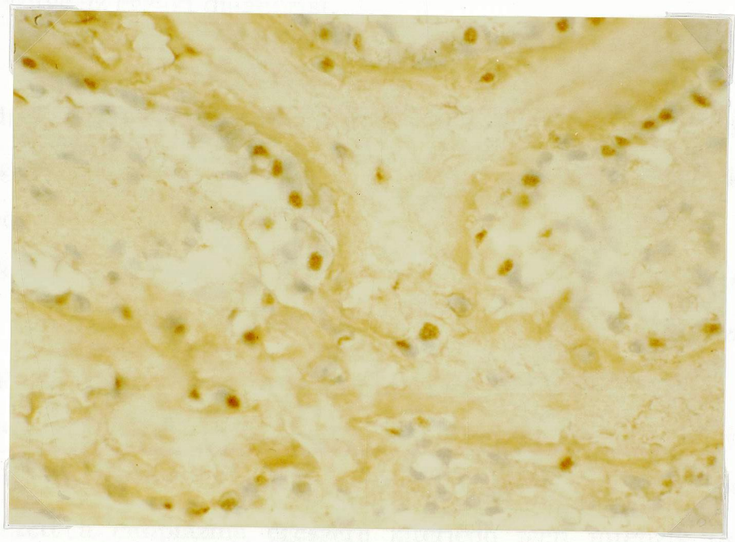
54. ábra: ***Myositis ossificans, WGA jelölés, 1000 X,*** *Korai stádiumban a károsodott izomnyalábok körül elszórtan WGA pozitív sejtek láthatók.*



55. ábra: ***Myositis ossificans, WGA jelölés, 1000 X,*** *A folyamat előrehaladtával, de még a korai stádiumban a WGA pozitív sejtek száma jelentősen megnövekedett, elszórtan elhelyezkedve.*



56. ábra: ***Myositis ossificans, WGA jelölés, 1000 X,*** *Intermedier stádiumban a WGA pozitív sejtek a képződő osteoid felszínén helyezkednek el, azzal szoros kapcsolatot mutatva. Az osteoid területében is enyhe WGA pozitivitás figyelhető meg.*



57. ábra: ***Myositis ossificans, WGA reakció, 1000 X,*** *Az intermedier stádium egy későbbi időpontjában a képződő csontgerenda felszínén még láthatók a WGA pozitív sejtek, de számuk csökkenő tendenciát mutat.*

Osteogen sarcomák vizsgálata

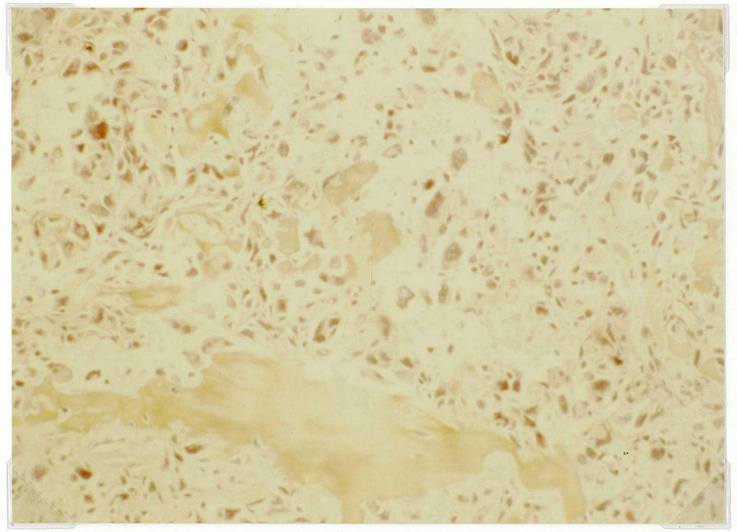
Az osteosarcomák szöveti felépítése jellemző, hogy sarcomatosus stromában neoplasticus csont és osteoid képződés található. Az osteoid és csont malignitás az osteoblastok polimorfiáján alapul, melynek jellegzetességei a hyperchrom, igen változatos nagyságú magok, valamint az igen magas mitózis szám melyek jelentős része kóros mitozist takar (58. és 59 ábrák). A bizarr tumor sejtek néhol multinucleáris óriássejtekké alakulnak groteszk nucleolusokkal (65. és 66. ábrák). Megint máshol a tumorsejtek fészkekbe rendeződnek, kevés citoplazmával rendelkeznek, mirigyszerű képleteket alkotva, mely szöveti képet felületes szemlélő metasztatikus carcinomával keverheti össze (71. ábra). A tumorokban a fenti általános jellegzetességek mellett előfordulhatnak fibrosus területek porcszigetek óriássejtek tovább nehezítve az egzakt diagnózist.

Az osteogen sarcomák lektinkötését vizsgálva meglepő eredményeket kaptunk. Con A lektinnel gyakorlatilag minden vizsgált osteogen sarcomában pozitív reakciót kaptunk az osteoblast sejtekben. A kötés intenzitása azonban változó volt. Azokban a tumorokban ahol kifejezettebb osteoid ill. csontképzés volt látható, a Con A gyengébb volt (60. ábra). A kifejezetten anaplasias tumorban az osteoblastok majd mindegyike igen kifejezett intracytoplasmatikus Con A pozitivitást mutatott (67 és 68. ábrák). A mirigyszerűen elhelyezkedő osteoblast sejtekben is kifejezett a citoplazma egészére kiterjedő igen intenzív Con A reakció volt a jellemző (72. ábra).

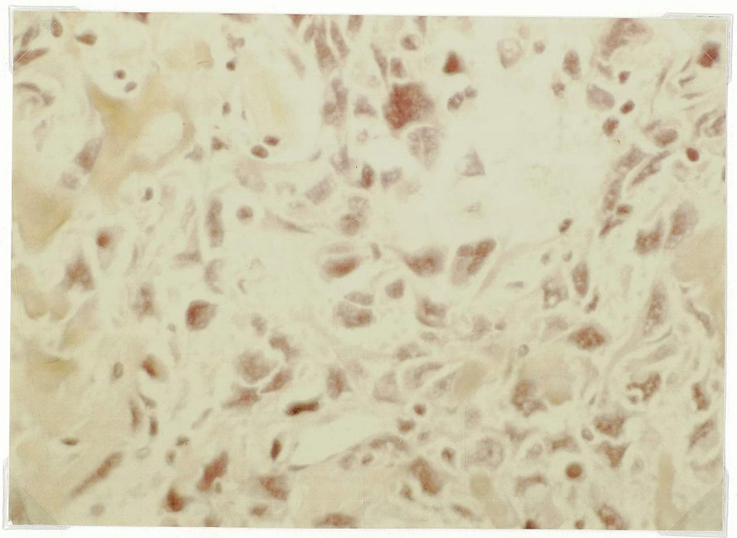
A patológiás osteoid környezetében DBA lektinnel nem észleltünk pozitivitást (61. ábra), csakúgy, mint a polimorf tumornál is negatívak maradtak az osteoblastok (69. ábra). Ezzel szemben a mirigyes elrendeződést mutató osteoblast sejtekben igen kifejezett a citoplazma egészére lokalizált intenzív DBA pozitivitás volt megfigyelhető (73. ábra).

A WGA lektinnel végzett vizsgálataink esetében minden anyagunkban pozitív jelölés volt megfigyelhető. A megjelenésben eltérő tendenciák voltak észlelhetők. Az osteoidot termelő tumorok esetében a csontgerendák felszínén elhelyezkedő osteoblastokban a mag közvetlen közelében fokális erős pozitivitás volt jellemző (62. ábra). A kifejezetten anaplasias tumorban a reakció diffúz intracytoplasmáris volt (70. ábra) míg a mirigyes felépítésű tumorban ismételten a magok mellett egy igen intenzíven jelölődő gócot találtunk (74. ábra).

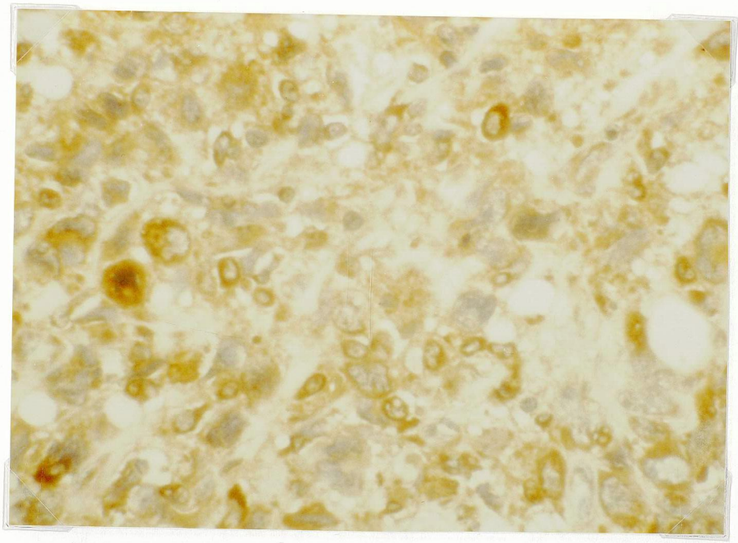
PNA lektinnel a kiérettebb, osteoidot termelő tumorban, a tumor és a normál csont határán a már előzőekben ismertetett intenzív membrán jelölődést észleltük (63. ábra). A tumorszövetben található óriássejtek azonban negatívak maradtak (64. ábra). A kifejezetten anaplasias tumorban gyakorlatilag negatívak voltak a bizarr magvú óriássejtek. Ezzel ellentétben a mirigyes felépítésű tumorban található óriássejtek igen intenzíven reagáltak a PNA lektinnel (75. ábra).



58. ábra: ***Osteosarcoma, Hematoxilin-eozin festés, 400 X,*** *Az osteosarcomák szöveti jellegzetessége a patológiás csont és osteoid képződés.*

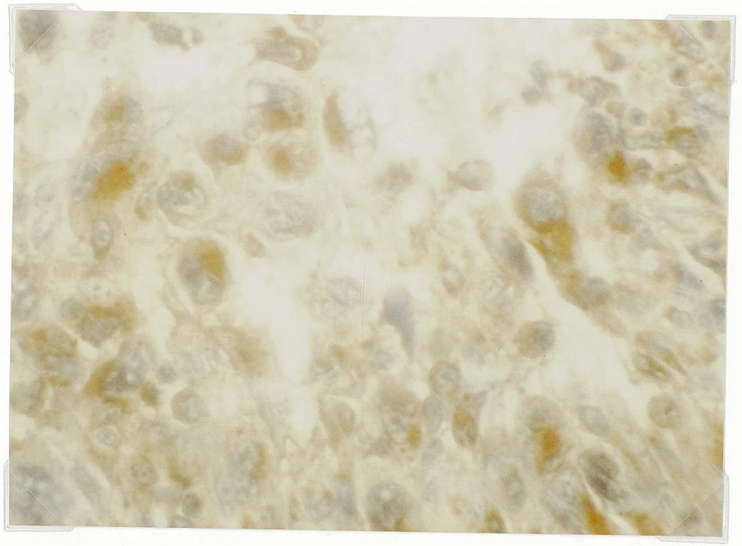


59. ábra: ***Osteosarcoma, Hematoxilin-eozin festés, 1000 X,*** *Osteosarcomára jellegzetes polimorfia, magas mitózis szám, ill. az atípusos mitózisok jelenléte.*

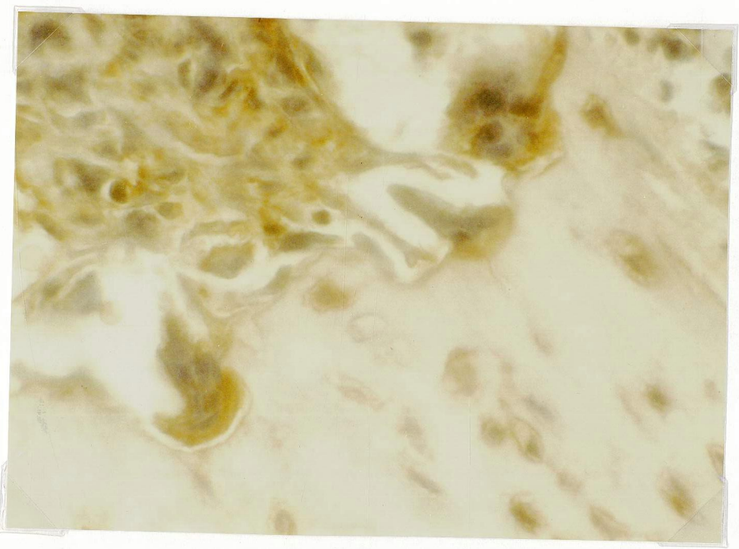


60. ábra: ***Osteosarcoma, Con A jelölés, 400 X,***
Az intenzíven osteoidot képző tumorokban is megtalálható a Con A pozitivitás, intracitoplazmatikus, diffúz eloszlásban. Nem minden tumorsejt pozitív.

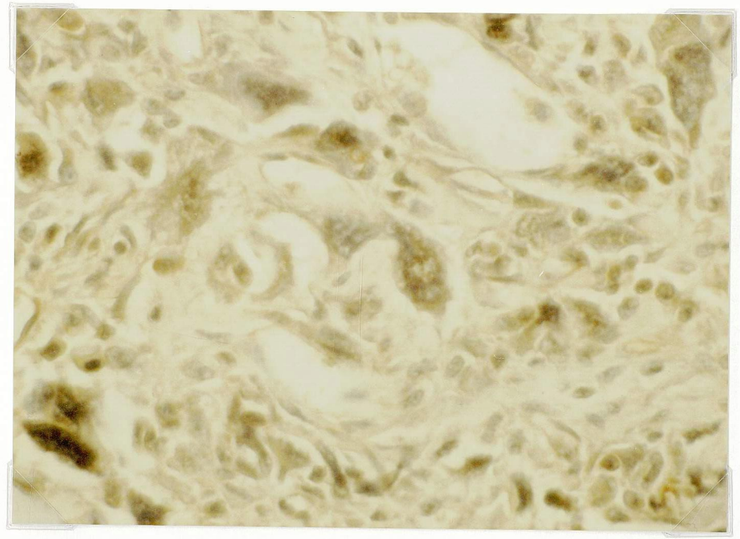
61. Ábra: ***Osteosarcoma, DBA jelölés, 1000 X,***
A patológiás osteoid környezetében negatívak maradtak a sejtek DBA lektinnel.



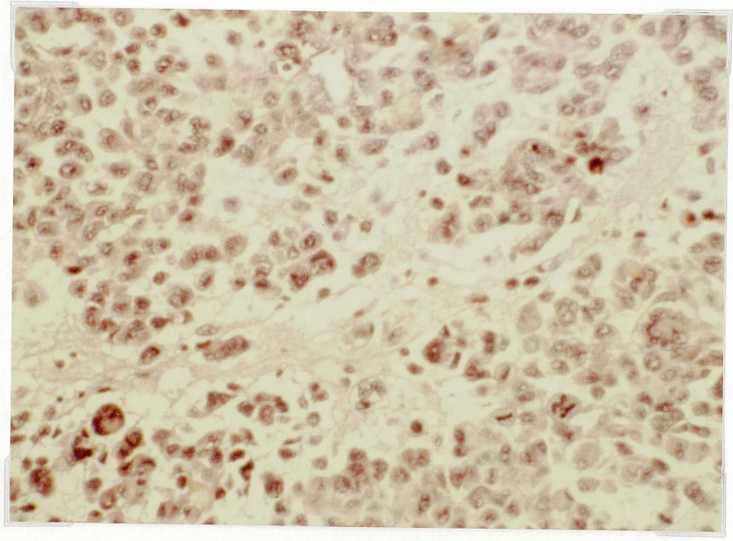
62.____ábra: ***Osteosarcoma, WGA jelölés, 1000 X,*** *Az osteoid környezetében elhelyezkedő osteoblastokban mag melletti kifejezetten gócos jellegű WGA kötése látható.*



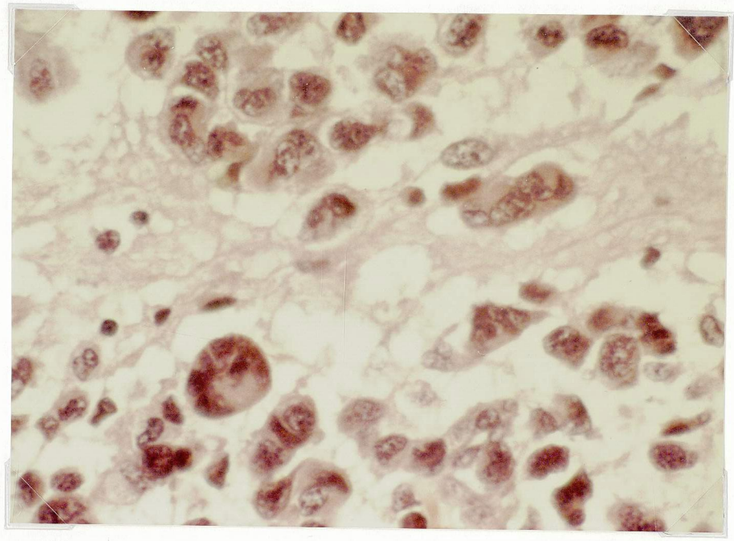
63.____ábra: ***Osteosarcoma, N-PNA jelölés, 1000 X,*** *A tumor és a normál csont határán levő osteoclastokban kifejezetten, a lebontandó csont felé néző membránon látható reakció.*



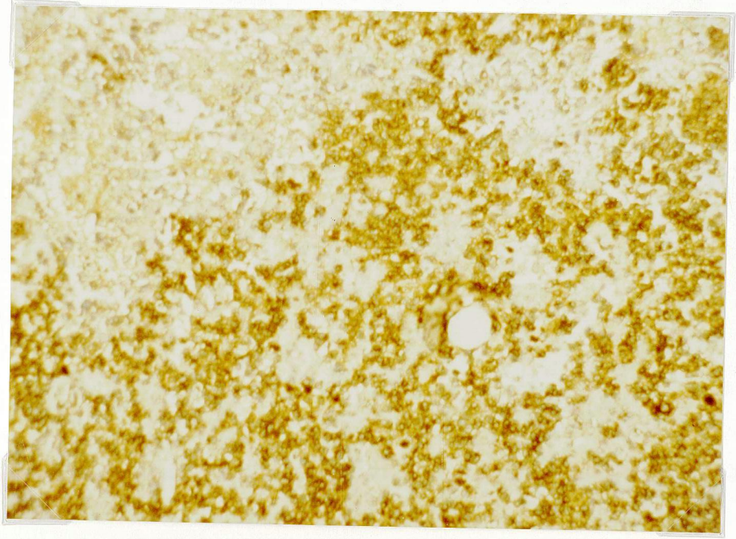
64. ábra ***Osteosarcoma, N-PNA jelölés, 1000 X,***
A tumorban előforduló óriássejtek nem kötötték a PNA lektint neuraminidáz emésztés után.



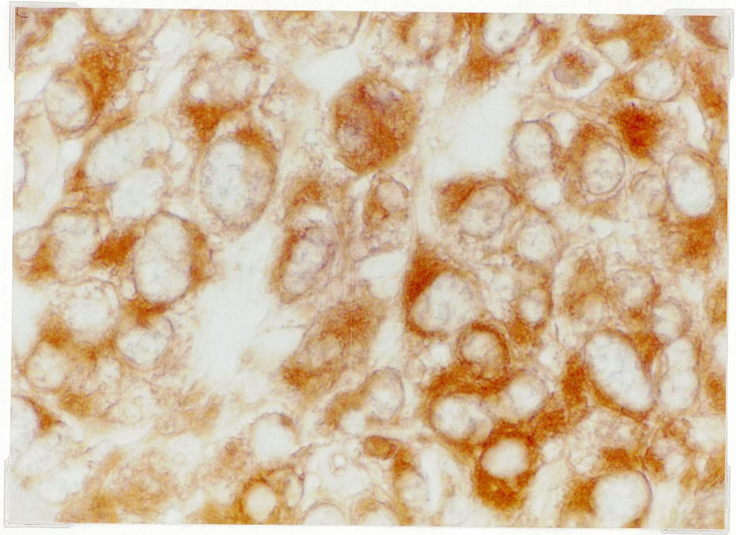
65. ábra: ***Osteosarcoma, Hematoxilin-eozin festés, 400 X,***
Bizarr , néhol atípusos mitózisokkal tarkított tumorszövet, mely kifejezetten anaplasias típusú.



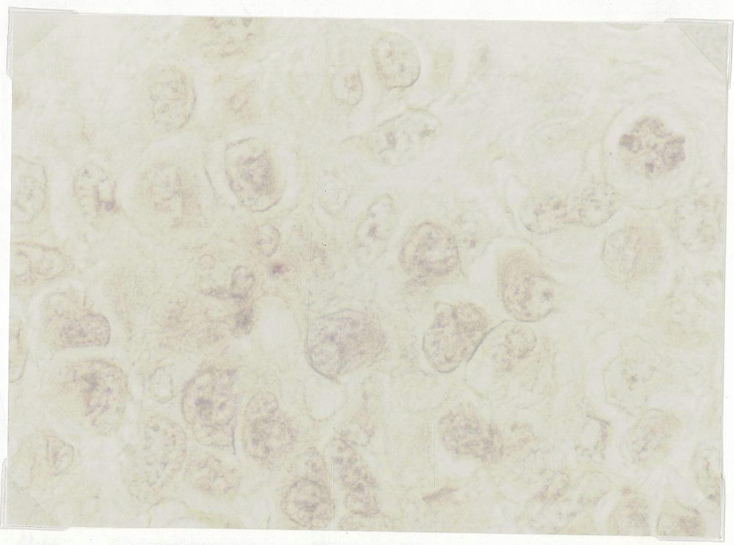
66. ábra: ***Osteosarcoma, Hematoxilin-eozin festés, 1000 X,*** *A bizarr tumorsejtek néhol óriássejtekké alakulnak tovább növelve a polimorfiát.*



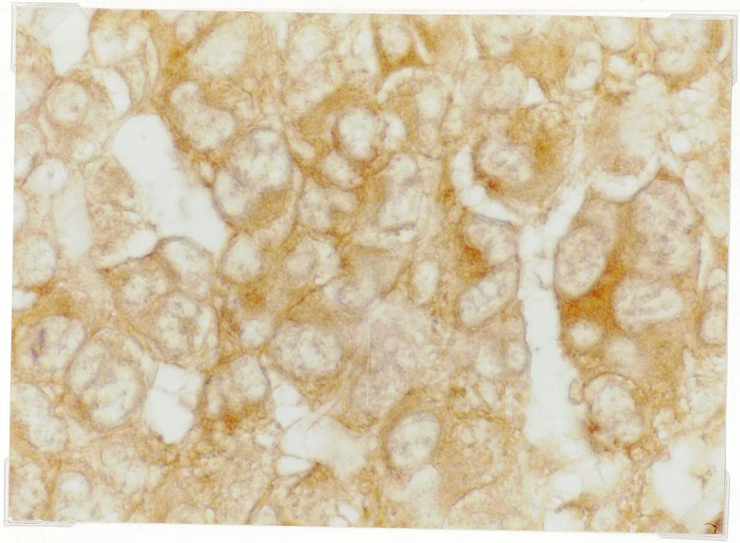
67. ábra: ***Osteosarcoma, Con A jelölés, 200 X,*** *A kifejezetten anaplasias tumorokban az osteoblastok jelentős számban és intenzitással kötötték a Con A lektint.*



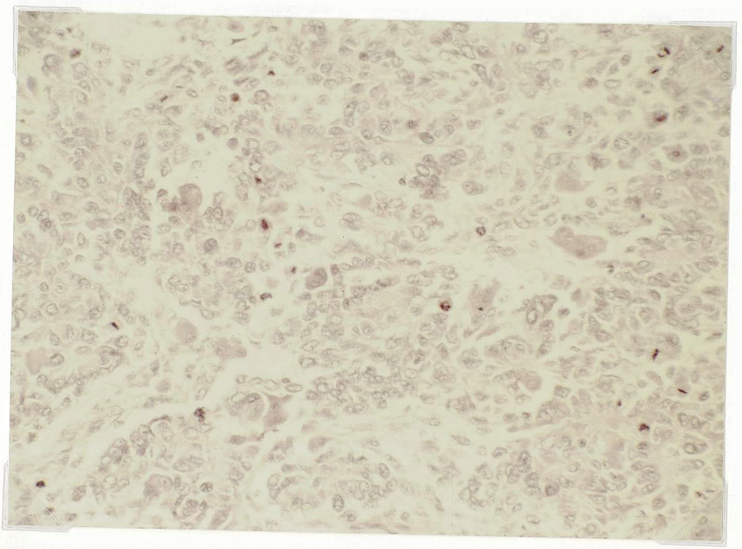
68. ábra: ***Osteosarcoma, Con A jelölés, 1000 X,*** *Nagyobb nagyítású képen jól látható a sejtekben diffúzan eloszló intracitoplazmatikus reakció.*



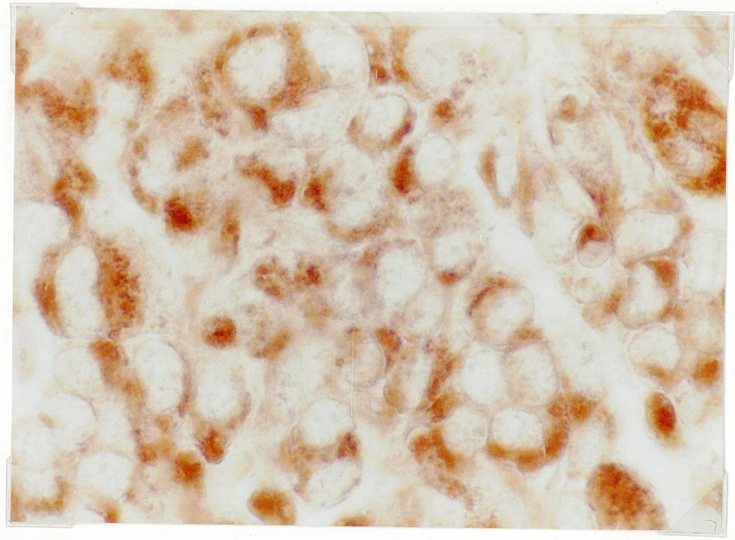
69. ábra: ***Osteosarcoma, DBA jelölés, 1000 X,*** *Negatív reakció az anaplasias tumor esetében.*



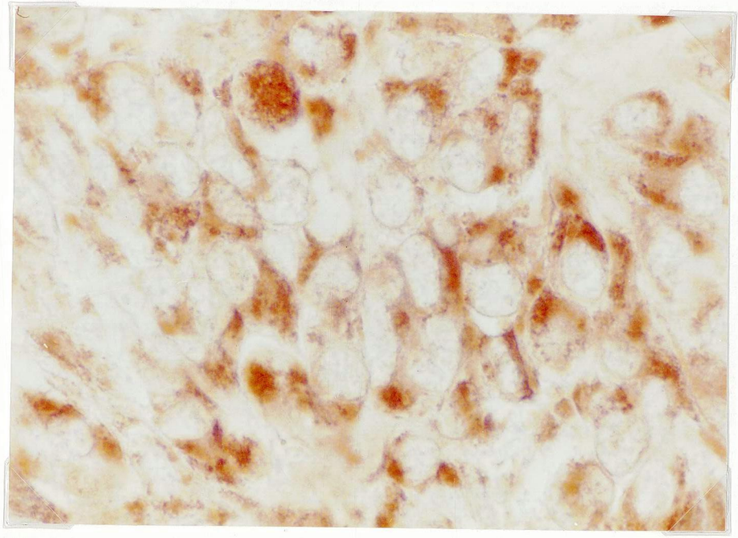
70. ábra: ***Osteosarcoma, WGA jelölés, 1000 X,***
A kifejezetten anaplasias tumorban a WGA lektin minden sejtben diffúzan, intracitoplazmárisan kötődik.



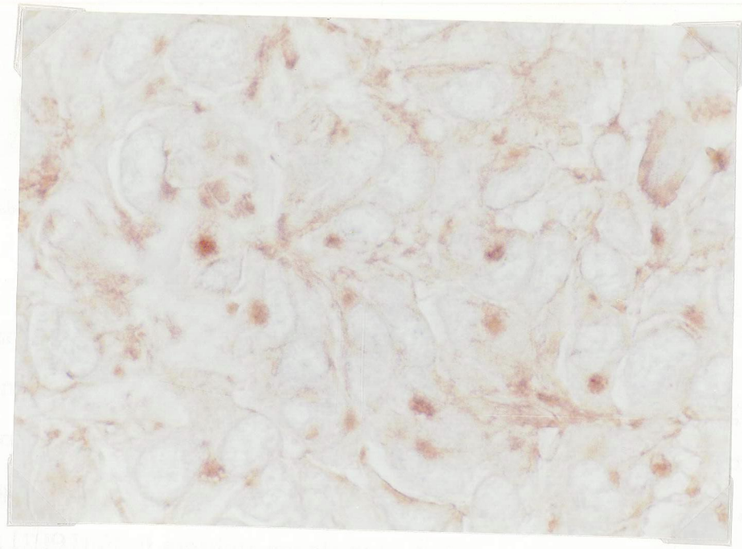
71. ábra: ***Osteosarcoma, Hematoxilin-eozin festés, 400 X,***
A tumoros sejtek kevés citoplazmával rendelkeznek, mirigyszerű képleteket alkotnak. Differenciál diagnosztikai nehézséget okoz elkülönítésük a mirigyhám eredetű tumor metasztázisától.



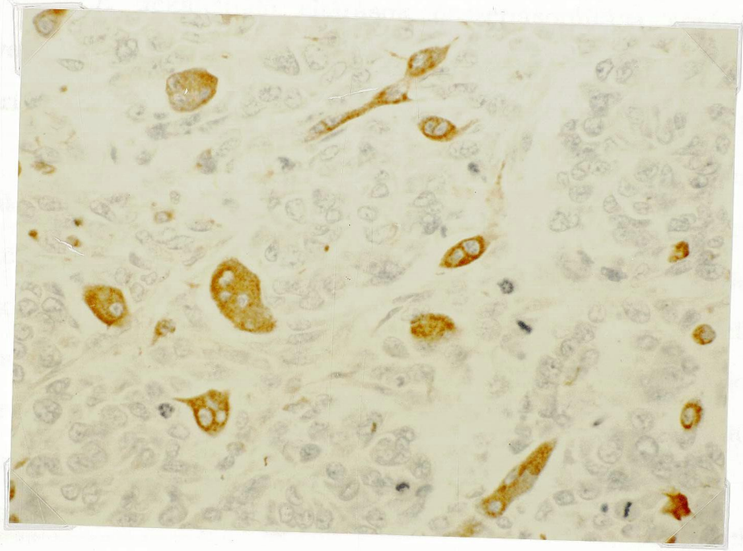
72. ábra: ***Osteosarcoma, Con A jelölés, 1000 X,*** *A tumorsejtekben igen intenzív, majd minden sejtre kiterjedő granularis citoplazmáris jelölődés látható.*



73. ábra: ***Osteosarcoma, DBA jelölés, 1000 X,*** *Hasonlóan a Con A lektinhez, anaplasias tumorban kifejezett szemcsés pozitivitás figyelhető meg a citoplazmában.*



74. ábra: ***Osteosarcoma, WGA jelölés, 1000 X,*** *A mag mellett elhelyezkedő intenzív reakciót észleltünk a mirigyes felépítésű tumorban.*



75. ábra: ***Osteosarcoma, N-PNA jelölés, 400 X,*** *Az osteoclastok intenzív citoplazmatikus reakciója látható PNA lektinnel neuraminidáz emésztés után. Az osteoclastok mellett feltehetően azok előalakjai és/vagy a monocyta macrophag rendszer sejtjei reagálnak a lektinnel.*

Megbeszélés

Dekalcináló eljárások értékelése a lektinkötés függvényében

Munkánk során háromféle dekalcináló eljárást használtunk (Kiszely, Barka 1958, Contesso 1989). Mind azt már eredményeink ismertetése során megállapítottuk, legjobb lektinkötési tulajdonságokkal az elektromosan dekalcinált anyagaink rendelkeztek. Jó eredményeket adott még 0,6 N HCl és a Luck (1991) által ajánlott savelegy is. Leggyengébb lektinkötések az etiléndiamin-tetraacetát dinátrium sójának oldatával (EDTA) történt dekalcinálás után adódtak.

A dekalcináló eljárások összehasonlítása során az alapvető különbség a hatásmechanizmusokban, a dekalcinálás időtartamában valamint a dekalcinálás reakció hőmérsékletében volt. Savas dekalcinálás során a mésztelenedés elektromos töltéskülönbségek alapján történik, melyet az elektromos áram még jelentősen fel is erősít. A savas dekalcinálás ideje jelentősen lecsökken, és a kalcium ionok oldatban maradnak, esetleg kiválnak a katódon (elektromos dekalcinálás esetén). A reakció hőmérséklete 2o Celsius fok. EDTA használata esetén a kalcium nem marad ionos formában oldatban, hisz az EDTA a csontok Ca tartalmával kelátot képez, így távolítva el azt a kötéséből. A kezelés 56 Celsius fokon történik.

A különböző dekalcináló oldatok használata után észlelt eltérő lektinkötés véleményem szerint több okra vezethető vissza. A legfőbb lektinkötődést csökkentő tényezőnek a

hőmérséklet emelkedett voltát tartjuk. A hosszú időn keresztül 56 fokon tartott anyagok esetében a glikokonjugátumok feltételezhetően olyan hőmérsékleti károsodást szenvednek, mely jelentősen befolyásolja lektinkötő kapacitásukat. Az emelkedett hőmérséklet hatására feltételezhetően a glikokonjugátumok tercier szerkezete megváltozik, mely maga után vonhatja a végálló helyzetben levő cukormolekulák térbeli elhelyezkedésének változását. Emellett feltételezhető az is, hogy az emelkedett hőmérséklet hatására a glikoproteinek jelentős része elveszti cukortartalmu oldalláncait is. A magasabb hőmérséklet expozíciós ideje növelheti a glikoprotein molekulák cukorláncainak károsodását. E tényezők, esetleges további faktorokkal együtt oda vezetnek, hogy a glikoprotein molekulák elvesztik lektinkötő képességüket. Ez magyarázhatja, hogy az EDTA-val dekalcinált eseteinkben mindig jelentősen csökkent számú lektinkötő helyet sikerült a sejtekben kimutatnunk.

Megállapíthatjuk tehát, hogy mésztartalmú anyagok lektin-hisztokémiai vizsgálatának előkészítésére a savas dekalcinálás ajánlható, elektromos árammal kiegészítve.

A glikoprotein szintézis egyes lépései:

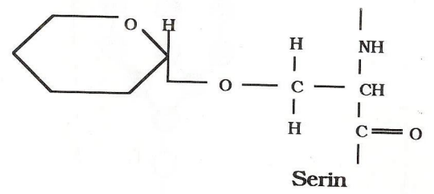
Vizsgálataink során észlelt eltérő lektinkötési tendencia magyarázata véleményem szerint a glikoprotein képzés egyes lépéseinek eltérő voltából adódik.

Az 8. embrionális héten még nem tudtunk különbséget tenni lektinkötés tekintetében sem az osteoblastok, sem az osteoclastok, sem pedig ezek prekurzorai között. Az észlelt kifejezett PAS pozitivitás a végtagbimbó kezdeményekben azt jelzi,

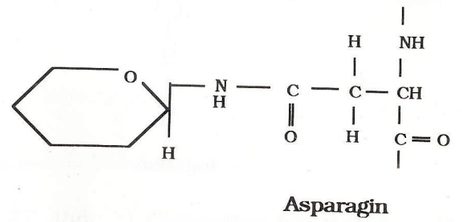
hogy a sejtek - akár közös eredetűek, akár nem - a fejlődésük egy stádiumában glikogént halmoznak fel citoplazmájukban, mely későbbiekben a glikoprotein szintézis alapjául szolgálhat. A PAS pozitivitás eltűnése a 13. hétre annak a folyamatnak lehet indikátora, mikor is a glikoprotein képzés megindul, a sejtekben már eltérő kötéstípusu, szubsztituált cukormolekulákkal rendelkező láncok jelennek meg, melyek nem adják a PAS reakciót.

A 13. embrionális héten észleltem első alkalommal az embrió femurok vizsgálata során pozitív lektinkötődést. Ekkor az osteoclastok mutattak diffúz intracitoplazmatikus reakciót a mannóz és glükóz specifikus Con A lektinnel. Ez egyértelműen bizonyítja, hogy a reagáló cukorláncokon végálló helyzetben mannóz és glükóz molekulák vannak.

A glikoprotein szintézis során a cukorláncok O - vagy N - glikozidos kötéssel kötődhetnek a fehérjékhez (76. ábra/A és B).



76. ábra/A:
O-glikozidos kötéstípus

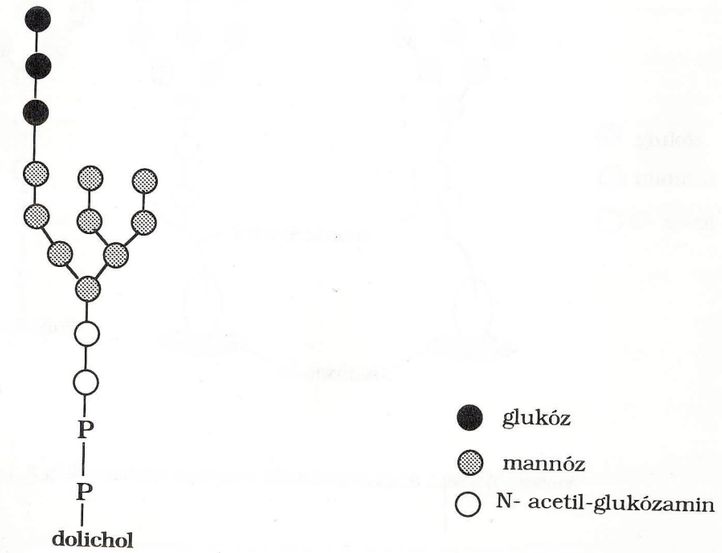


76. ábra/B:
N-glikozidos kötéstípus

O-glikozidos kötés alkalmával a fehérjékben található Szerinhez, vagy Treoninhoz kötődnek a cukormolekulák egyenként α-O-

glikozidos kötéssel. A kezdő cukor mindig egy N-acetil-galaktózamin molekula, majd ezután kötődhet egyenként további galaktóz, neuraminsav, N-acetil-glükózamin, vagy fukóz. A folyamatokat a különféle glikozil-transzferázok katalizálják.

Az N-glikozidos glikoprotein képzés kezdeti lépéseiben az oligoszacharid láncok egy lipidhez kötött állapotban találhatók az endoplazmatikus retikulumban. Ez a lipid természetű anyag az un. dolichol, egy hosszúláncú polyizoprenol, melynek alkotásában 17 - 21 izoprén molekula vesz részt. Ehhez kötődik difoszfát kötéssel egy oligoszacharid lánc, melynek alkotásában kettő N-acetil-glükózamin, kilenc mannóz, és három glukóz vesz részt (77. ábra) (Voet és Voet 1990).

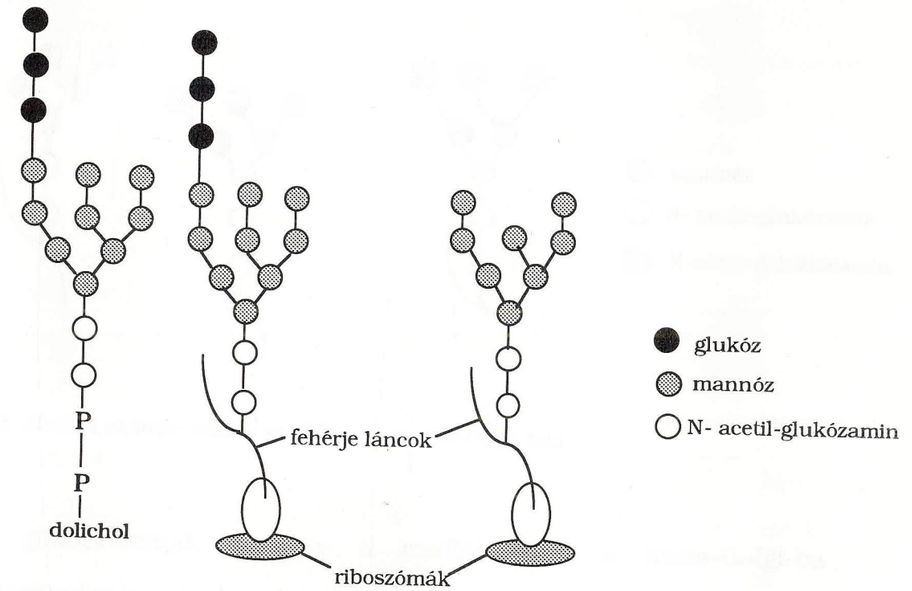


77. ábra: ***Dolicholhoz kötött oligoszaccharid prekurzor szerkezete***

Ez a Dolichol-P-P-oligoszacharid komplex a durva felszínű endoplazmatikus retikulumban, a riboszómák felszínén

képződött fehérjékhez kötődik N-glikozidos kötéssel, dolichol-P felszabadulásától kísérve. A fehérjékben a cukorlánc egy jól definiált aminosav szekvenciával rendelkező szakaszhoz képes kötődni, melyben egy Aszparagin és egy Szerin vagy Treonin zár közre egy harmadik tetszőleges aminosavat, mely azonban nem lehet Prolin és feltehetően Aszparaginsav.

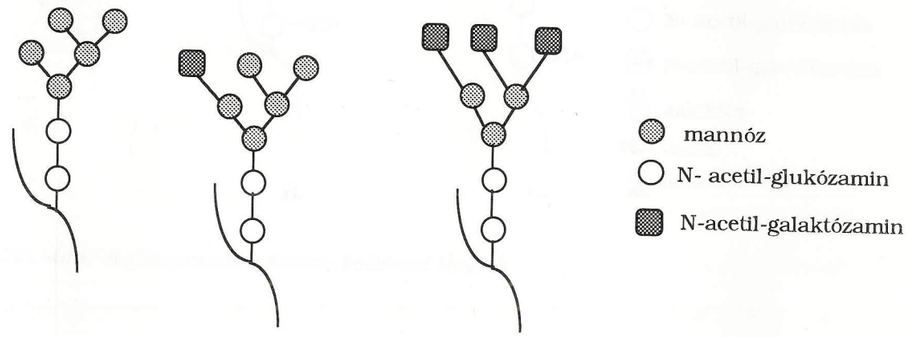
Még a durva felszínű endoplazmatikus retikulumban a fehérje-oligoszacharid komplex megkezdi átalakulását.



77. ábra: A glikoprotein komplex kialakulásának kezdeti lépései

A fehérjékhez kapcsolódott oligoszacharid láncokról kezdetben több lépésben leválnak a glükóz molekulák és egy mannóz molekula is. Ekkor végálló helyzetben 8 mannóz molekula helyezkedik el. A fehérje-oligoszacharid komplex ezután elhagyja a durva felszínű

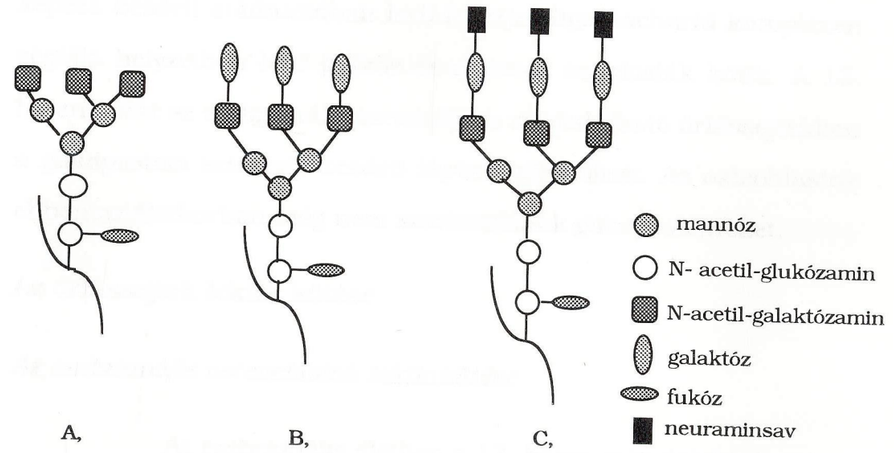
endoplazmatikus reticulumot és a citoplazmatikus hólyagocskákon keresztül a cis-Golgiba kerül. Itt tovább folytatódik az oligoszacharid láncának az átalakulása, melynek során további mannóz molekulákat veszít. A protein-oligoszacharid komplex a cis-Golgit elhagyva a mediál-Golgiba kerül, ahol az oligoszacharid lánc tovább veszti a mannóz molekuláit. Ebben a stádiumban azonban megkezdődik az oligoszacharid lánc újraépülése is, hisz itt a mannóz molekulákhoz vágálló helyzetben N-acetil-glükózamin és/vagy N-acetil-galaktózamin molekulák kötődnek (78. ábra).



78. ábra: A gkikoproteinek szerkezete a mediál-Golgi-ban

A glikoproteinek elhagyva a mediál-Golgit, a trans-Golgi-ba vándorolnak, ahol folytatódik, majd befejeződik a fehérjék glikozilációja. A fehérjéhez közvetlenül kapcsolódó N-acetil-glükózaminhoz fukóz molekula (79. ábra/A) míg az N-acetil-galaktózamin és/vagy N-acetil-glükózamin molekulákhoz galaktóz kötődik (79. ábra/B). A glikoziláció utolsó lépéseként neuraminsav molekula kapcsolódik végálló helyzetben a cukorlánchoz. A neuraminsav kötődése után a glikoprotein szintézis befejeződik, a cukorlánc nem épül tovább (79. ábra/C). Az így elkészült

glikoprotein aztán a Golgi vesiculumokon keresztül kijut a citoplazmába és/vagy sejtmembránra, ahol mint kész glikoprotein megkezdi működését (Kornfeld és Kornfeld 1985, Voet és Voet 1990).



79. ábra: A glikoprotein szintézis befelyező lépései

A 13. héten észlelt pozitív Con A reakció nemcsak annak a bizonyítéka, hogy a reagáló cukorláncon végálló helyzetben mannóz ill. glükóz molekulák vannak, hanem azt is bizonyítja, hogy az óriássejtekben a glikoprotein szintézis N-glikozidos kötéseken keresztül valósul meg. O-glikozidos kötésnél ugyanis nem fordul elő a cukorláncokban sem mannóz, sem glükóz.

A pozitív Con A reakciót adó cukor elhelyezkedésére is következtethetünk. A glikoprotein képzés során elmondottakból következik, hogy a reagáló oligoszacharid lehetne egyrészről a dolicholhoz kötött cukorlánc, mely aztán fehérjéhez kapcsolódik, vagy az endoplazmatikus retikulumban képződő fehérje-

poliszacharid komplex. A dolicholhoz kötődő oligoszacharid lánc lektin kötése nem valószínű, hisz a dolichol egy lipid természetű agyag, s mint ilyen a normál szövettani procedúra során kioldódik a szövetekből. Így joggal feltételezhető, hogy a Con A lektint a durva endoplazmatikus reticulum felszínén elhelyezkedő, a glikoprotein képzés kezdeti stádiumában levő fehérje-oligoszacharid komplexen végálló helyzetben levő glükóz és mannóz molekulák kötik. A 13. héten tehát az embrionális csontokban megtalálható óriássejtekben a glikoprotein szintézis kezdeti lépései elindultak. Az osteoblastok ebben az életkorban még nem szintetizálnak glikoproteineket.

Az óriássejtek lektin kötése

Az embrionális osteoclastok lektinkötése

Az embrionális életben a 13. héten már detektálható az osteoclastokban különféle glikoproteinek képződésének megindulása. Ez a glikoprotein szintézis N-glikozidos kötéseken keresztül valósul meg, melyet az észlelt Con A pozitivitás jól demonstrál. A 15. héten kimutatható PNA reakció azt mutatja, hogy a szintetizálódó glikoproteinen végálló helyzetben β-D-galaktóz(1-3)-N-acetil-D-galaktózamin diszacharidok vannak. A PNA lektin azonos intenzitású kötődése neuraminidáz emésztés előtt ill után azt jelentheti, hogy a végálló helyzetű β-D-galaktóz(1-3)-N-acetil-D-galaktózamin diszacharidhoz ebben az embrionális korban még nem kapcsolódik neuraminsav molekula. A 17. embrionális héten azonban megkezdődik a neuraminsav molekulák kötődése a glikoprotein láncokhoz. Ennek indikátora, hogy neuraminidáz emésztés nélkül a PNA lektinkötés intenzitása jelentősen csökkent. Neuraminidáz emésztést követően azonban a

PNA kötő helyek jelentős része szabadul fel, melyre a neuraminidáz emésztést követő PNA lektinkötés intenzitásának a növekedéséből következtethetünk. Az a tény, hogy a 17. hét után neuraminidáz emésztés nélkül nem sikerült PNA reakciót kimutatnunk annak a bizonyítéka, hogy a 17. hét után teljessé válik a β-D-galaktóz(1-3)-N-acetil-D-galaktózamin diszacharidok neuraminsavval történő szubsztitúciója, így a PNA lektin csak előemésztés után tud a cukormolekulákhoz kötődni. Mivel a neuraminsav minden glikoprotein láncon az utolsó lépésben kötődik, feltételezhető, hogy a neuraminsavval szubsztituált glikoprotein már funkció képes, tovább nem alakul.

Érett osteoclastok lektinkötése

Az kiérett, ill. felnőtt csontokban megtalálható osteoclastok vizsgálata során neuraminidáz emésztés nélkül egyetlen esetben sem kaptunk pozitív reakciót. Neuraminidáz emésztés azonban jelentős mértékben szabadította fel a PNA receptorokat. Ez azt bizonyítja, hogy a kiérett osteoclastokban jelen van az embrionális életkorban is már kimutatható glikoprotein, mely végálló helyzetben neuraminsavval burkolt β - D - galaktóz (1-3) - N - acetil - D - galaktózamin diszacharidot tartalmaz.

Osteoclastok szerepe a csontlebontásban

A csontlebontásban legfontosabb szerepet az osteoclastok játszanak, lebontva a mineralizált csontfragmentumokat. Leegyszerűsítve a fenti megállapítás igaznak vehető. Azonban az osteoclastok csak olyan csontokat képesek lebontani melyeknek felszínére ki tudnak tapadni, majd aktiválódnak (Göthlin és Ericsson 1976). Az osteoclastok azonban

csak olyan, mineralizált felszínekre képesek kitapadni, melyeket nem fed intakt osteoid réteg (Chambers 1980, 1985). Ahhoz, hogy az osteoclastok a csontfelszínre kitapadjanak, az osteoblastok előzetesen az általuk termelt kollagenáz enzimekkel lebontják a csontgerendák felszínén normálisan mindig jelenlevő osteoid réteget (Chambers és Fuller 1985, Chambers és mtsai 1985). A szabad mésztartalmú csontfelszínre aztán az osteoclastok kitapadnak. A mésztartalmú csontokhoz való kitapadás után, a hidroxiapatit hatására az osteoclastok aktiválódnak. Ennek az aktivációnak a morfológiai jele, hogy a csontfelszinnel határos membrán régióban egy mebrán redőzet az un. ruffled border alakul ki. Baron és mtsai. (1985) bizonyították, hogy a ruffled border igen fontos szerepet játszik a csontlebontásban, hisz ennek a membrán redőzetnek a kialakulásával párhuzamosan kezdődik meg a csontlebontás (Göthlin és Ericsson 1976, Chambers 1980, 1985). Az osteoclastok lokális környezetük pH-jának csökkentésével játszanának szerepet a csontlebontásban, mely egyrészről elősegíti a mész kioldódását a csontból, másrészről a proteinázok savas pH mellett a legaktívabbak, mely lehetővé teszi a kollagén degradációt (Chambers 1980, Anderson és mtsai 1986, Blair és mtsai 1986). Az osteoclastok acidifikáló képességét sokáig a bennük is megtalálható karboanhidráz enzimnek tulajdonították (Spicer és mtsai. 1984, Vaananen 1984,)

Az osteoclastok kettős megjelenésű lektinkötése

Mint már említettük, az osteoclastok neuraminidáz emésztést követően mindig kötötték a PNA lektint. Amíg az osteoclastok inaktív formában, szöveti kötelékben voltak, a PNA kötődést granularis jellegűnek, a sejtek citoplazmájában diffúzan

eloszlónak, a lizoszómákra lokalizáltan észleltük. Azokban az osteoclastokban amelyek a lebontandó csonttrabekulák felszínére tapadtak, az intracitoplazmatikus PNA lektinkötődés eltűnt és a resorpciós zóna citomembránja vált erősen pozitívvá. Fénymikroszkópos észleleteink alapján úgy gondoljuk, hogy az aktivált osteoclastok PNA-pozitív membrán szegmentuma megegyezik az osteoclastokon az aktiválódással párhuzamosan kialakuló ruffled border-el (Göthlin és Ericsson 1976, Chambers 1980, 1985). Feltételezzük, hogy az osteoclastokban a földimogyoró lektin kötéséért felelős glikoprotein a sejtek citoplazmájában képződik és a sejtek aktiválódása során a resorpciós zóna citomembránjára kerülve szerepet játszik a csontlebontásban (Illés 1989). Észleletünket Takagi és munkatársai (1986) által végzett ultrastrukturális vizsgálatok messzemenően alátámasztják.

Az osteoclastok PNA-kötő glikoproteinjének jellemzése

Mint ismeretes a lizoszómák tartalmaznak egy H/K ATPáz enzimet, mely az emésztő vakuólumok savi pH-jának biztosítását szolgálja. Mivel a lizoszóma membránok ellen termelt ellenanyag keresztreagál a gyomornyálkahártyából izolált tiszta H/K ATPáz enzimmel (Reggio és mtsai 1984) feltehető, hogy a lizoszómális savszekréció hasonló mechanizmussal történik, mint a gyomorsav szekréciója.

A normál csontok vizsgálata során az osteoclastokban neuraminidáz emésztést követően észlelt erős PNA lektinkötés szövetkötelékben lévő osteoclastok esetén diffúz intracitoplazmatikus jellegű, a lizoszómákra lokalizált. A lebontandó csontfelszínre történt kitapadás után az un. ruffled border vált igen erősen PNA pozitívvá, utalva arra, hogy az

osteoclastok citoplazmájában képződött glikoprotein az aktiválódás során a sejtmembrán egy bizonyos területén accumulálódik. Baron és mtsai. (1985) bizonyították, hogy a ruffled border igen fontos szerepet játszik a csontlebontásban. Egyúttal azt is sikerült kimutatniuk, hogy a Reggio és mtsai által termelt ellenanyag e területben pozitív reakciót ad. A lektinkötő glikoprotein és a H/K ATPáz mindig együttes jelenléte alapján feltételeztük, hogy a lektin kötő glikoprotein megegyezik a H/K ATPáz enzimmel. Úgy tűnik, hogy az osteoclastok savszekréciójáért ugyanaz az enzimrendszer tehető felelőssé, mint a gyomor fedősejtekben (Fischer, Illés és Röchlich 1988).

A H/K ATPáz glikoprotein mivoltát igazolandó Callaghan és mtsai. (1992) lektin affinitás kromatográfiával izolálták a H/K ATPáz enzimet. Az osteoclastokban jelenlevő H/K ATPáz omeprazollal - mely szelektív H/K ATPáz blokkoló - történő gátlásával meg lehet akadályozni az osteoclastos csontlebontást in vitro (Tukkanen és Vaananen 1986). Ennek a felfedezésnek klinikailag igen nagy jelentősége van, hiszen a gyomor fedősejtek sav szekréciójának a korlátozására kidolgozott gyógyszeres eljárások több kevesebb módosítással a csontlebontás gátlására is felhasználhatók lehetnek.

A csontképző sejtek lektinkötése

Az embrionális osteoblastok jellemzése

Az irodalommal összhangban (Zimmermann és Thies 1984, Milaire 1991), az egyes fejlődési stádiumokban mi is eltérő lektinkötést észleltünk. A 13. héten az osteoblastok nem kötöttek egyetlen általunk vizsgált lektint sem. A 15. héttől azonban az

osteoblastokban is megindul a glikoprotein képzés. Ez a folyamat szintén N-glikozidos kötéseken keresztül valósul meg, amit az észlelt Con A reakció bizonyít (Rawn 1989). A 15. héten észlelt igen kifejezett perinuclearis WGA pozitivitás magyarázatára több lehetőség kínálkozik. Mivel a WGA lektin az N-acetil-β-D-glükózaminra specifikus és a láncközi cukormolekulákat is felismeri, feltételezhető lenne, hogy a lektin a glikoprotein képződés kezdeti lépésében kialakult dolichol-P-P-oligoszacharid komplexen az oligoszacharid lánc kezdetén elhelyezkedő N-acetil-glükózamin molekulákkal reagál. Mivel a WGA kötődést a Golgi-komplexre lokalizáltan láttuk, ez kizárja annak a lehetőségét, hogy a dolichol-P-P-oligiszaccharid komplexben található N-acetil-glükózamin molekulák reagálnak a lektinnel. A dolichol ugyanis csak a durvafelszínű endoplazmatikus retikulumban található meg, s esetleges lektinkötésének jellege diffúz intracitoplazmatikus jellegű kellene legyen. A másik tény, mely a dolichol-P-P-oligiszaccharid komplex reakciója ellen szól az, hogy a dolichol lipid természetű anyag lévén kioldódik a szokásos szövettani procedúra során. A WGA lektin neuraminsav specificitása folytán a Golgi-komplexre lokalizált lektinkötés eredhetne a teljesen felépült, a Golgi-komplexet éppen elhagyni készülő glikoproteintől, melyen végálló helyzetben neuraminsav molekulák vannak. Ezt a tényt sem tudtuk bizonyítani, mivel a neuraminidáz emésztés osteoblastok esetében nem változtatta meg a lektinkötés intenzitását, tehát a WGA kötés egyértelműen a végálló helyzetű N-acetil-β-D-glükózamin molekuláknak tulajdonítható. A mediál Golgi-ban megtalálható glikoprotein láncokon végálló helyzetben N-acetil-β-D-glükózamin molekulák, és/vagy N-acetil-α-D-galaktózamin

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA KÖNYVTÁRA

molekulák vannak. Attól függően, hogy mely molekulatípus van túlsúlyban található a sejtekben WGA és/vagy DBA lektinkötődés.

A 15. héten észlelt igen kifejezett DBA lektinkötés bizonyítéka tehát az, hogy a glikoprotein képzés során számos N-acetil-α-D-galaktózamin molekula van végálló helyzetben. Az a tény azonban, hogy a 15. héten a DBA reakció intenzitása igen kifejezett, s hogy a jelölődés a citoplazma egészére kiterjed felveti annak a lehetőségét is, hogy nem egy képződő glikoprotein, hanem nagy mennyiségben termelődő egyéb cukormolekula okozza az intenzív jelölődést.

A kondroitin-szulfát a glükóz-amino-glikánok (GAG) csoportjába tartozó, ismétlődő diszacharida egységekből álló molekula. Felépítésében D-glükuronsav és N-acetil–a-D-galaktózamin molekulák vesznek részt periodikusan ismétlődve (Iozzo 1985, Móczár 1987). A kondroitin-szulfát legnagyobb mennyiségben a porc - és csontszövetben található meg. A 15. héten észlelt kifejezett DBA reakció N-acetil–a-D-galaktózamin molekulának tulajdonítható. Az igen erős, a citoplazma egészét kitöltő jelölődés felveti annak lehetőségét, hogy az osteoblastok ebben az embrionális életkorban a kondroitin-szulfát molekulák alkotásában résztvevő N-acetil–a-D-galaktózamin molekulát termelik nagy mennyiségben, majd a molekulák kijutva a sejtekből a kondroitin-szulfát felépítésében vesznek részt. Ezt a nézetünket azonban további a GAG felépülését és szerkezetét vizsgáló eljárásokkal bizonyítani kell.

Kiérett osteoblastok jellemzése

A normál csontmintáinkon végzett lektinkötődés vizsgálatok általában negatív eredményei azt bizonyíthatják, hogy a kiérett sejtek glikoprotein képzése az embrionális állapothoz viszonyítva jelentősen csökkent. A lektinkötő kapacitás esetleges ismételt növekedése a sejtek funkcionális állapotában bekövetkezett változására hívja fel a figyelmet.

Patológiás folyamatok lektinkötése

Óriássejtek és eredetük

Annak ellenére, hogy az osteoclastok évtizedek óta állnak a kutatók érdeklődésének előterében, eredetük máig nem tisztázott. Korábbi nézetek szerint a csontsejtek - így az osteoclastok is - egy közös progenitor sejtből származnak (Friedenstein 1976). Feltételezik, hogy létezik egy eddig még nem identifikált, keringő mononukleáris sejt, mely preosteoclastnak felel meg (Chambers 1985, Horton és mtsai. 1984, 1985). Más vélemények szerint az osteoclastok hemopoetikus őssejt eredetűek, a monocyta-macrophag sejtvonalhoz tartoznak (Lasser 1983, Brecher és Franklin 1985, Bouropoulou és mtsai 1985, Athanasou és mtsai. 1986, Brecher és mtsai. 1986).

A magunk részéről lektin-hisztokémiai vizsgálatokkal kívántunk adalékokkal szolgálni a kérdés eldöntéséhez.

A teljesen kiérett osteoclastokon észlelt neuraminidáz emésztést követő PNA reakció megegyezik más szerzők által a monocyta - macrophag rendszeren korábban leírt észleletekkel (Lasser 1983, Ree és mtsai. 1983). A monocyta - makrophag rendszer sejtjei valamint a kiérett osteoclastok között több

markáns morfológiai különbség van. Ezek közül az egyik legszembeötlőbb, hogy míg az osteoclastok tartalmaznak tartarát rezisztens savi foszfatáz enzimet, addig a mononuclearis phagocyta sejtek nem (Göthlin és Ericsson 1976, Chambers 1980, 1985). Ugyancsak feltűnő különbség, hogy az osteoclastok citomembránjának aktivált állapotban jellegzetes polaritása van (un: ruffled border), mely nem található meg sem mononuclearis, sem multinucleáris macrophagokon. (Lasser 1983).

Annak ellenére, hogy a monocyta - makrophag rendszer sejtjei valamint a kiérett osteoclastok között számos különbség van, az idegentest granuloma óriássejtjein, az epulis histiocyter eredetű óriássejtjein valamint a kiérett osteoclastokon észlelt hasonló lektinkötés alapján nyert adataink is alátámasztják azt a nézetet (Lasser 1983, Brecher és Franklin 1985, Bouropoulou és mtsai 1985, Athanasou és mtsai. 1986, Brecher és mtsai. 1986), miszerint az osteoclastok a monocyta - macrophag sejtvonal elemei közé tartoznak (Illés 1988).

Oteoclastomák

Az óriássejtes csonttumorok klinikai, radiológiai és szövettani megjelenésében három stádium különíthető el, mely stádiumok pontos meghatározása a terápiás beavatkozás minőségét tekintve igen fontos hisz míg a Gr I-es és Gr II-es stádium benignusnak tekinthető, addig a Gr III-as stádiumú tumort malignusnak kell tartani és e szerint kell kezelni. A radiológiai stádium meghatározására Campanacci (1975, 1987) módszere ajánlható, mely beosztás a tumor radiológiailag meghatározható agresszivitását jellemzi, de egy pillanatnyi állapotot jelölve nincs összefüggésben a tumorok biológiai

malignitásával. Eseteinkben a latens, aktív és agresszív esetek előfordulási aránya eltér az általában szokásos előfordulási arányoktól (latens: 4 %, aktív: 74 %, agresszív: 22 %), mivel mi az esetek kiválasztásánál elsődlegesnek a szövettani megjelenést tartottuk. Eseteink átlagéletkorát és lokalizációját tekintve azok megegyeznek az irodalmi adatokkal (Murphy és Ackerman 1956, Dahlin 1985).

A szövettani stádiumokat tekintve mindhárom stádiumú anyagunkból 6 - 6 esetet vizsgáltunk. BSA, DBA, LTA és RCA lektinekkel sem a stromális sejtekben sem pedig az osteoclastokban nem észleltünk reakciót.

A stroma-sejtekben észlelt pozitív Con A reakció magyarázatára több lehetőség is adódik. Mint az ultrastrukturális vizsgálatok alapján megállapítást nyert, az óriássejtes csonttumorok felépítésében három féle sejtpopuláció vesz részt. Ezek közül 2 a stroma alkotásában vesz részt, míg a harmadik az osteoclastok csoportja. Az egyes típusú stromális sejt melyet ultrastrukturális megjelenése alapján Aparasi (1977) mint fibroblast-szerű sejtet identifikált, in vitro körülmények között kifejezett proliferációs képességgel bír. A II-es típusú stromális sejt mely megjelenésében macrophagokhoz hasonlít (Aparasi 1977, Roessner és mtsai. 1984, 1987), in vitro nem mutat proliferációs képességet (Goldring 1986). Con A lektin kötődés vizsgálata során észlelt pozitív stromális reakció az I-es típusú stromális sejtnek tulajdonítható, hiszen fénymikroszkópos megjelenésük alapján a Con A pozitív sejtek fibroblastokra emlékeztetnek. Ezen állításunkat Lis és Sharon (1986) észleletei is alátámasztják miszerint a fibroblastok in vitro kifejezett Con A kötő képességgel

bírnak. Számos szerző az óriássejtes csonttumorok kialakításában és esetleges malignus transzformációjában az in vitro észlelt proliferációs képessége alapján elsődleges szerepet tulajdonít a fibroblast szerű I-es típusú stromális sejtnek (Roessner és mtsai.1984, Dahlin 1985, Goldring és mtsai. 1986).

Az I-es típusú stromális sejtek mellett az óriássejtek és a reaktívnak tartott (Roessner és mtsai 1984, 1987) II-es típusú stromális sejtek viselkedése sem elhanyagolható.

Osteoclastomákon PNA lektinnel végzett saját vizsgálataink alapján azt mondhatjuk, hogy Gr I-es szövettani stádiumu osteoclastomákban az óriássejtek a normál csontokon megfigyelt PNA-kötési megoszlást mutatják. Normál csontokon a PNA lektinkötő helyet viselő glikoproteinek az osteoclastok citoplazmájában képződnek, s az osteoclastok csontfelszínre való kitapadása után accumulálódnak a resorpciós zóna membrán szegmentumán, ahol szerepet játszanak a csontlebontásban (Illés és Fischer 1987, Illés és mtsai. 1989). Gr I-es stádiumban ugyanis még megfigyelhető az osteoclastok egy jól körülhatárolt membrán szegmentumára lokalizált erős PNA reakció, mely membrán rész a csontresorpcióban aktív szerepet játszó ruffled border-nek felel meg. Ellentétben más szerzőkkel (Vaananen 1986) azt is megfigyeltük, hogy nem minden osteoclast reagál a PNA lektinnel és a reagáló sejtekben is stádium függő intenzitásbeli differencia volt észlelhető. Hisz míg Gr I-es stádiumú osteoclastomákban az osteoclastok 32 %-a nem reagál a PNA lektinnel, addig a GR III-as tumorokban a PNA-reakciót nem mutató sejtek aránya mindössze 1 % körül van, az erős reakciót adó sejtek aránya pedig 67 % körül mozgott. Gr I-es osteoclastomákban még megfigyelhető a

membránra lokalizált PNA reakció. Gr II-es és különösen Gr III-as stádiumú tumorokban az osteoclastok intracitoplazmatikus PNA jelölődése jelentősen megnőtt, azonban a citoplazma membránján nem láttunk pozitív reakciót. Jelen ismereteink birtokában nehézségekbe ütközik annak eldöntése, hogy a PNA-kötés igen jelentős mérvű növekedése, mely kifejezett stádium függést mutat, vajon az osteoclastok saját regulációjában bekövetkező változás következménye-e, vagy pedig a megváltozott stroma hatása nyilvánul meg ily módon. Az irodalmi adatokkal összefüggésben (Dahlin 1985) inkább a stroma hatására létrejövő aktivitás változásról van szó.

Az osteoclastomák lektinkötésének vizsgálata segítséget nyújt a tumort alkotó sejtek aktivitásának meghatározásához. A malignus (Gr III stádiumú) tumorok sejtjeiben észlelt lektinkötés igen kifejezett fokozódása pedig támpontot szolgáltat a sejtek anyagcseréjének változásán keresztül azok szerepére a malignizálódás folyamatában.

Nem ossificalo fibroma

Nem ossificalo csont-fibromában a fibrosus szövetben előforduló és a széli csontrészek közelében található óriássejtek morfológiai különbözőségük mellett (Spjut és mtsai. 1983, Glauber és mtsai 1980) lektin kötésükben is eltérnek egymástól Ennek a lektin kötésbeli differenciának a nem ossificalo csont fibroma elkülönítő diagnózisában lehet jelentősége. Mint ismeretes, nem típusos megjelenés esetén, a nem ossificalo fibroma differenciál diagnosztikájában legnagyobb problémát az óriássejtes csonttumoroktól (osteoclastoma) való elkülönítése jelenti. Az osteoclastomák neuraminidáz emésztést követően mindig mutattak

az óriássejtekben pozitív reakciót. Nem ossificalo fibroma esetében pozitív reakció csak akkor figyelhető meg, ha az óriássejtek csontfelszínnel érintkeznek, azt lebontják, tehát egyértelműen osteoclastok. A tumor fibrosus területében található óriássejtek soha nem adtak pozitív reakciót. Így a lektinkötés különbözősége segíthet a nem ossificalo csont fibroma osteoclastomáktól történő elkülönítésében.

A stromában észlelt pozitív Con A reakció a fibroblastok és a kiérett fibrocyták jellemző tulajdonsága, s mint ilyen megegyezik az irodalmi adatokkal (Lis és Sharon 1986), bizonyítékot szolgáltatva a nem ossificalo fibroma kollagenetikus szöveti eredetére (Spjut és mtsai. 1983, Glauber és mtsai 1980, Damjanov 1987).

Osteoid osteoma

Osteoid osteomában érdekes eredményt kaptunk neuraminidáz emésztést követő PNA reakció során. Az elváltozás gócában elhelyezkedő osteoclastokban - annak ellenére, hogy azok a szabálytalan csontgerendák és osteoid környezetében találhatók - elmarad a resorpciós zóna citomembránján a PNA akkumuláció. Ez két teóriával magyarázható. Az osteoclastoknak ahhoz, hogy aktiválódásuk bekövetkezzen, olyan mineralizált felszínekkel kell érintkezniük, melyet nem borít osteoid réteg. Osteoiddal fedett csontgerendákat az osteoclastok képtelenek lebontani (Rodan és Martin 1981, Chambers és Fuller 1985, Chambers és mtsai. 1985). Feltételezhető lehetne tehát, hogy osteoid osteomában a szabálytalan csontgerendákat vékony osteoid réteg fedi mely miatt az osteoclastok aktiválódása zavart szenvedhet. Az osteoclastok azonban ott sem mutattak e betegségben membrán jelölődést, ahol

a csontgerenda szélén nem tudtunk kimutatni osteoidot, pedig a lektinek minden vizsgált esetünkben aspecifikus módon megfestették az osteoidot is. A fentieket figyelembe véve sokkal valószínűbb az a teória miszerint osteoid osteomában az osteoclastok kitapadnak ugyan a lebontandó csontfelszinhez de valamilyen működési zavar folytán nem következik be a kitapadás utáni aktiválódás és így elmarad a PNA kötő glikoprotein kiürülése a resorpciós zóna citomembránjára. Ezt látszik bizonyítani az osteoclastok igen intenzív intracitoplazmatikus jelölődése is, mely egyúttal annak is bizonyítéka, hogy a glikoprotein szekréció zavartalan, csak a kiürülés gátolt. A folyamat eredményeként azonban az osteoclastok csontlebontó képességgel nem rendelkeznek.

Mivel az osteoid osteoma patogenezise nem tisztázott (Lichtenstein 1965, Jaffe 1968, Spjut és mtsai. 1983, Glauber és mtsai 1980), munkánk során egy lehetséges addicionális patogenetikai faktort feltételeztünk melyet a lektin-hisztokémiai észleleteink látszanak bizonyítani. A feltételezésünk alapján az osteoid osteoma patogenezisében a hypervascularizált stromába ágyazott osteoblastok csontképzése mellett jelentős szerepet játszik az osteoclastok csontbontó képességének elmaradása. Neuraminidáz emésztést követő PNA reakcióink során észlelt differencia miszerint az osteoclastok akkor sem bontják a csontot, ha a lebontandó felszínhez tapadtak, felveti a sejtek valamely kóros állapotát. Mint már említettük, véleményünk szerint a sejtek glikoprotein képzése normális, de a glikoprotein membránon való kiürülése blokkolt. Ennek oka lehet egyrészt a membrán szerkezetében bekövetkezett változás lehet. Ez nem valószínű, hisz

ugyanazon tumorban a normális csont határán levő osteoclastok bontják a csontot, amit jelez, hogy a membrán szegmentumuk kifejezetten pozitív PNA lektinnel. A másik ok a csontfelszín ill. az osteoid szerkezetében bekövetkezett változás lehet. Mi ezt a verziót tudjuk inkább elfogadni, hisz osteoid osteoma esetén mindig kifejezett aspecifikus osteoid reakciót is láttunk a különféle lektinekkel. Az osteoid reakció nem volt blokkolható a lektinekre specifikus cukrokkal. Az osteoid lektinkötése tehát nem a lektinek cukorkötő helyein keresztül történik. Feltételezzük, hogy eme lektin kötődés vagy a lektinek hidrofób kötőhelyén keresztül történik, vagy a cukormolekulákon és a lektineken meglévő szabad karboxil-, amino-, vagy szulfát-csoportok között létrejövő kémiai reakciókon alapul. Az, hogy más csontos elváltozásokban az osteoid reakciója jóval kisebb mértékű volt, talán az osteoid szerkezetében bekövetkezett változás jele lehet, mely az osteoblastok patológiás csontképzését is felveti (Illés és mtsai. közlés alatt). Az osteoid szerkezeti változásának meghatározására további, elsősorban a glükóz-amino-glikánok mennyiségi, minőségi és szerkezeti vizsgálatát kellene más módszerekkel elvégezni (Módis 1991), normál osteoiddal összehasonlítva.

A lektin hisztokémiai vizsgálataink alapján az osteoid osteoma patogenezisére vonatkozóan új patogenetikai faktort tételeztünk fel, miszerint az elváltozás kialakulásában jelentős szerepe lehet a patológiás osteoid miatt elmaradó osteoclastos csontlebontásnak.

Fibrosus dysplasia

Mint ismeretes fibrosus dysplasia patogenezisében elsődlegesnek tartják a tumor alapállományát képező fibrosus

szövet metapláziás talajon történő elcsontosodását. E folyamat eredményeként alakul ki az elváltozásra jellemző, polarizációs fényben kiválóan látható un. fonatos csontszerkezet (Lichenstein és Jaffe 1942, Jaffe 1946, Stewart és mtsai. 1962, Spjut és mtsai. 1983).

Fibrosus dysplasiában a neuraminidáz emésztést követő PNA reakció mindenben megegyezik normál csontokban az óriássejteken észlelt eredményeinkkel. Ez azt látszik bizonyítani, hogy az osteoclastok aktiválódásához valóban csak mineralizált csontfelszínekre van szükség, a kollagén struktúrák szabálytalan szerkezete azt nem befolyásolja. Con A lektinnel végzett vizsgálatainkban észlelt diffúz intracitoplazmatikus reakció pontosabb citoplazmáris lokalizációja fénymikroszkópos szinten a reakció erőssége miatt nem ítélhető meg. A Con A pozitivitás magyarázatára számos lehetőség áll rendelkezésünkre. A legvalószínűbb feltevés az, hogy Con A lektinkötésért felelős sejtek az alapállomány alkotásában résztvevő fibroblastok. Ezen állításunkat Lis és Sharon (1986) észleletei is alátámasztják miszerint a fibroblastok in vitro Con A kötő képességgel bírnak. A reakció erőssége, eloszlása azonban felveti annak a lehetőségét is, hogy a sejtek nagy mennyiségben szekretálják a Con A kötő cukormolekulákat melyek beépülnének a metapláziás elcsontosodás során kialalakuló csontszövet glükóz-amino-glikánjaiba, megakadályozva a kollagén struktúrák normális orientálódását és ezzel együtt a lamelláris csontszerkezet kialakulását (Illés és Fischer, közlés alatt). Feltételezésünk megmagyarázná az un. fonatos csontszerkezet megjelenését,

azonban további, elsősorban a GAG esetleges eltérő összetételére vonatkozó további, kiterjedt vizsgálatokat igényel.

Myositis ossificans

A myositis ossificans a harántcsíkolt izmokban vagy a kötőszövetben előforduló ektopiás csontképzés. Az elváltozás valamilyen mechanikus traumát követően, elsősorban a végtagi izmokban fordul elő. (Fay 1914, Gechicter és Maseritz 1938, Ackermann 1985). A betegségre szövettanilag rapidan proliferáló differenciálatlan kötőszövet jellemző, mely kötőszövet kiérett csontot képez (Ackermann 1985). A csontképző sejtek eredete az elváltozásban nem ismert (Ackermann 1985). Biotinnal jelölt WGA lektint használva sikerült egy sejtpopulációt elkülöníteni, mely sejtekben feltehetően a Golgi-komplexben nagy mennyiségű N-acetil-D-glükózamin tartalmú glikoprotein található. Teoretikusan ez a glikoprotein lehetne az alkálikus foszfatáz is, hisz ez az enzim az osteoblastok egyik jellemző markere (Nijweide és mtsai. 1986). Kimutatták, hogy WGA lektinnel a csont eredetű alkálikus foszfatáz izoenzimet el lehet különíteni a májból illetve egyéb szövetekből származó alkálikus foszfatáz izoenzimtől (Rosalki és Foo 1984, Sorensen 1988). Mivel, azonban a kiérett csont felszínén található osteblastok eseteinkben nem kötötték a WGA lektint nem valószínű, hogy ezen sejtekben az alkálikus foszfatáz enzim volna felelős a WGA kötésért, hisz az alkálikus foszfatáz enzim tartalom nemcsak a fejlődő, hanem az érett osteoblastok jellemző tulajdonsága is (Nijweide és mtsai. 1986).

Az általunk vizsgált összes patológiás elváltozás közül csak myositis ossificansban mutatkozott a csontképző sejteken WGA-val

pozitív reakció. Ez a festődés igen erős, egygócú, perinuclearis elhelyezkedésű, a Golgi komplexumra lokalizálódó volt és nem függött a neuraminidáz emésztéstől sem. A reakció jellegét tekintve teljesen megegyezett az embrionális korban a 15. héttől meglévő a növekedés előrehaladtával fokozatosan csökkenő reakcióval, azonban inetenzítása erősebb volt. Myositis ossificansban - hasonlóan az embrionális csontokhoz - a csontképző sejtek egy végálló helyzetű N-acetil-D-glükózamint tartalmazó glikoproteint bírnak. Mivel sem normál, kiérett sem patológiás környezetben lévő osteoblastok esetében sem észleltük a WGA kötődését, a jelenségnek számos magyarázata lehet. Mivel a WGA kötést is a monocyta-macrophag sejtvonal jellemző tulajdonságának tartják feltételezhető lenne, hogy myositis ossificansban a csontképző sejtek a monocyta-macrophag sejtvonal speciálisan differenciált ágához tartoznának. A másik elképzelés az lehetne, hogy myositisben az osteoblastok valamilyen alternatív úton képeznék a csontot amihez N-acetil-D-glükózamin diszacharid tartalmú glikoproteinre van szükség.

Pena és mtsai.(1981) valamint Damjanov (1987) megelőző vizsgálatai során kimutatta, hogy egyes kötőszöveti sejtekben, valamint a normál izomszövet járulékos sejtjeiben WGA pozitivitás figyelhető meg. Povysil és mtsai (1979) ultrastrukturális vizsgálatai bizonyították az izomszövet járulékos sejtjeiről, hogy azok myofibroblastok. Saját vizsgálataink arra utalnak, hogy a myositis ossificansban a csontképző sejtek precursorai szintén rendelkeznek WGA-kötő képességgel. Az irodalmi adatok valamint saját vizsgálataink alapján feltételezhető, hogy a WGA-kötő képességgel rendelkező kötőszöveti sejtpopuláció jelen van

a normál izomszövetben is, ahol mechanikus traumát követően csontképző sejtté alakul, s mint ilyen felelős lehet az ossifikacioért. A fibroblastok, az izomszövetben jelen levő járulékos sejtek, valamint myositis ossificansban a csontképző sejtek WGA-kötő képességüket tekintve teljesen hasonló tulajdonságokkal rendelkeznek, melynek alapján azt mondhatjuk, hogy myositis ossificansban a csontképző sejtek myofibroblast eredetűek. A fenti megállapításokat összevetve Owen (1978, 1985) nézetével, - miszerint a hematopoesis analógiájára a kötőszöveti sejtek, (fibroblastok, osteoblastok, chondroblastok) a csontvelői stroma őssejtből erednek - azt is feltételezhetjük, hogy a WGA-kötő képesség a csontvelői stromális őssejt valamelyik fejlődési stádiumának jellemző tulajdonsága. Az, hogy a kiérett csontképző sejtek elvesztik WGA-kötő képességüket talán azzal magyarázható, hogy ezen őssejtek elvesztik N-acetil-D-glükózamin tartalmú glikoproteinjüket is, vagy a glikoprotein glikozilációja változik (Illés és mtsai. 1992, 1993).

Osteosarcomák

Az osteosarcoma szöveti képe igen változatos. A szöveti kép alapján megkülönböztethetünk osteoblastos, chondroblastos, fibroblastos, óriássejtes, teleangiectaticus, kissejtes és kevert típusú formákat, attól függően, hogy a primitív támasztószöveti mesenchymalis sejtek milyen irányba differenciálódnak. Az esetek többségében mégis az un. osteoblastos osteosarcomák fordulnak elő (Spjut és mtsai. 1983, Vízkelety és Szendrői 1990). Így saját vizsgált anyagunk jelentős része is ebbe a csoportba tartozott. Az egyéb altípusba tartozó osteogen sarcomák közül csak elvétve

vizsgáltunk egy-egy esetet, mely messzemenő következtetések levonását nem teszik lehetővé.

Az osteogen sarcomák tumorsejtjei minden vizsgált esetünkben igen intenzív Con A kötő képességgel rendelkeztek. A Con A reakció jellege és intenzitása mindenben megegyezett az embrionális korban a 15-17. héten, az osteoblastokon észlelt lektinkötéssel.

DBA lektinnel egyes esetekben igen kifejezett reakciót kaptunk hasonlóan a 15. és 17. héten megfigyeltekhez. Más esetekben egyáltalán nem észleltük a DBA lektinkötődését az osteoblast sejtekhez.

PNA lektinnel a csontképző sejtekben soha nem észleltünk pozitivitást. A tumoros óriássejtek negatívak maradtak a PNA lektinnel, míg az osteoclastok diffúz intracitoplazmáris reakcióját észleltük.

WGA lektinkötését elemezve egyes esetekben a mag mellé lokalizált kifejezett pozitivitás volt látható, mely lokalizációját tekintve megegyezett az embrió femurok vizsgálata során a 15. héten észlelt reakcióval. Némely esetben azonban a perinukleáris lokalizáció nem volt megfigyelhető, s a sejtekben a citoplazma egészére lokalizált diffúz reakció volt észlelhető. Egy harmadik csoportban a sejtek negatívak maradtak, nem kötötték a WGA lektint.

Az osteogen sarcomák lektinkötő sajátságainak magyarázata kifejezetten nehéz. A tumorok mindegyikében meglevő kifejezett Con A pozitivitás megegyezik az embrionális életkorban észlelt reakcióval. Így elmondhatjuk, hogy az osteogen sarcoma

sejtjei is nagy mennyiségben tartalmaznak végálló helyzetben elhelyezkedő mannóz és glükóz molekulákat a glikoprotein láncokon. Ez az állapot a glikoprotein szintézis kezdeti lépéseiben található, az endoplazmatikus retikulum felszínén. Ez magyarázza a diffúz intracitoplazmatikus jelölődést. Mivel Con A reakciót az embrionális életkoron kívül osteoblast sejtekben nem tudtunk kimutatni, felvetődik annak a lehetősége, hogy az osteogen sarcoma sejtek glikoprotein szintézisük minőségét tekintve az embrionális életkori sajátságokat mutatják. Az egyéb lektinekkel észlelt reakciók egyrészről azt mutathatják, hogy a sarcoma sejtekben a glikoproteinek oligoszacharid láncain a szintézisnek megfelelően más és más cukormolekulák vannak végálló helyzetben, másrészről, hogy a sejtek esetlegesen eltérő cukormolekulák felhasználásával képeznék proteinjeik oligoszacharid láncait. Ez utóbbi nézet ellen szól az az észleletünk, hogy a tumorsejtekben is csak olyan lektinekkel sikerült kötődést kimutatni, mely lektinek az embrionális életkor egyes szakaszaiban reagáltak az osteoblastokkal, a glikoprotein szintézis egyes lépéseinek megfelelően. Az osteogen sarcoma sejtjeinek eltérő lektinkötő tulajdonságait összehasonlítva az embrionális csontokon észlelt lektinreakciókkal arra a következtetésre jutottunk, hogy az osteogen sarcoma osteoblastjaiban a glikoprotein képzés eltérő szinteken blokkolt és az embrionális korra jellemző érési stádiumot mutat. Úgy gondoljuk, hogy a tumorok malignitási potenciálja esetlegesen összefüggésben lehet a sejtek fejlődési stádiumával (Illés és mtsai. közlés alatt).

A vizsgált esetek alacsony száma a statisztikai kiértékelést nem teszi lehetővé, ezért e téren további vizsgálatok

szükségesek meghatározandó a tumorsejtek fejlődési stádiumának és malignitási potenciáljának kapcsolatát, feltételezve, hogy az így nyert ismeretek segítségünkre lehetnek az osteogen sarcomák pontosabb prognózisának meghatározásához.

Összefoglalás

Új eredmények és gyakorlati alkalmazhatóságuk

Vizsgálataink fő célkitűzése annak a kérdésnek elemzése volt, hogy a lektin-hisztokémia milyen mértékben hasznosítható a csontpatológiai kutatásokban. Eredményeink rámutattak arra hogy:

1. a csontszövet egyenfeszültségű elektromos árammal kiegészített savelegyben végzett dekalcinálás után a legalkalmasabb lektin-hisztokémiai vizsgálatokra.

2. a lektin-hisztokémia alkalmazásával jellemezhetők a csontsejtek glikoprotein szintézisének egyes lépései összhangban az embrionális korral, s hogy a glikoprotein szintézis a csontsejtekben N-glikozidos kötéseken keresztül valósul meg.

3. az osteoclastokban jelenlevő lektinkötő glikoprotein feltehetően azonos a H/K ATPáz enzimmel, és a sejtek citoplazmájában képződik, majd az aktiválódás után a resorpciós zóna citomembránjára kerül, ahol résztvesz a csontlebontásban. Így a H/K ATPáz enzim gyógyszeres gátlása révén lehetőség nyílik az osteoclastos csontlebontás gyógyszeres befolyásolására is.

4. Bizonyítottuk, hogy az osteoclastomák egyes stádiumai lektinkötésbeli különbségeik alapján jól meghatározhatók. Ezzel lehetővé vált a malignus osteoclastomák egyértelmű elkülönítése a benignus és intermedier formáktól, melyek differenciál diagnózisa terápiás beavatkozásaink megtervezésénél elsődleges jelentőségű.

5. A fenti megállapítások mellett a lektin-hisztokémia további adatokat szolgáltatott arra, hogy az osteoclastok a monocyta-macrophag sejtvonal elemeihez tartozhatnak.

6. Észleleteink felhívták a figyelmünket arra, hogy osteoid osteoma patogenezisében a kóros csont ill. osteoid képzés mellett jelentős szerepe lehet az osteoclastos csontlebontás elmaradásának is.

7. Lektin-hisztokémiai vizsgálataink alapján bizonyítottnak vehetjük, hogy myositis ossifikansban a csontképző sejtek a károsodott izomrostok pericytáiból származnak és myofibroblast eredetűek

8. A lektinek alkalmazása során észlelt eredményeink hívták fel a figyelmünket arra a tényre, hogy osteogen sarcomák tumorsejtjeiben a glikoprotein képzés eltérő szinteken blokkolt, és az embrionális korra jellemző érési stádiumot mutat. Mivel a tumorok malignitási potenciálja összefüggésben lehet a sejtek fejlődési stádiumával, a lektin-hisztokémia alkalmazása segítségünkre lehet az osteogen sarcomák pontosabb prognózisának meghatározásához.

Köszönetnyilvánítás

Munkám létrejöttéhez nyújtott támogatásáért köszönettel tartozom mindenekelőtt Dr. Fischer János egyetemi tanár Úrnak, aki a lektin-hisztokémia világát előttem felfedte, s aki mellett az új problémák iránti fogékonyságra, a kutató munkához nélkülözhetetlen kritikai szemléletre szert tehettem. Köszönöm egyúttal az állandó konzultációs lehetőséget és egy-egy eredmény, észlelet értelmezéséhez nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom Dr. Horváth Anna docens Asszonynak és Dr. Németh Árpád professzor Úrnak, akik a hisztológia és patohisztológia megismertetésével közvetlenül is munkám elindítói voltak.

Köszönöm volt és jelenlegi professzoraimnak névszerint: Dr. Kelényi Gábor, Dr. Bellyei Árpád, Dr. Kránicz János és Dr. Jean Dubousset professzoroknak, hogy klinikai munkám mellett lehetővé tették számomra a lektin-hisztokémiai kutatásokat.

Végül köszönetet mondok mindazoknak a kollégáknak és munkatársaknak, akikkel tudományos munkám során kapcsolatba kerültem, akiknek hasznos ötletei, tanácsai és jószándéku együttműködése nélkül jelen munka aligha készülhetett volna el.

Irodalom

Ackerman, L.V., (1985)
Extra-osseous localized non-neoplastic bone and cartilage formation (so-called myositis osiificans.
J. Bone Joint Surg. **40A:** 279 - 298 ;

Allen, A.K., Neuberger, A., Sharon, N., (1973)
The purification, composition and specificity of Wheat germ agglutinin.
Biochem J. **131:** 155 - 162;

Aparasi T., Arborg B., Ericsson J.L.E., (1977a,)
Giant-cell tumor of bone. Detailed fine structural analysis of different cell components.
Virchiws Archiv A Path. Anat. 376: 273-298;

Aub, J.C., Tieslau, C., Lancester,A., (1963)
Reaction of normal and tumor cell surface enzymes I. Wheat germ lipase and associated mucopolysaccharides.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **50:** 613 -619

Baenziger, J.U., (1985)
The role of glycosilation in protein recognition
Am. J. Pathol. **121:** 382-391;

Barondes, S.H., (1981)
Lectins: their multiple endogenous cellular functions.
Ann. Rav. Biochem. **50:** 207-231;

Barondes, S.H., (1984)
Soluble lectins: a new class of extracellular proteins.
Science **223:** 1259-1264;

Boyd W.C., Reguera R.M., (1949)
Hemagglutinating Substances for Human Cells in Various Plants.
J. Immunol., , **62,** 333-339;

Boyd W.C., Shaplegh E., (1954)
Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins)
Science, **119:** 419;

Brooks J.P., Pascal R.R., (1984)
Malignant giant cell tumor of bone: ultrastructural and immunhistologic evidence of histiocytic origin
Hum. Pathol., ,**15:** 1098-1100;

Callaghan, J.M., Toh, B.H., Simpson, R.J., Baldwin, G.S., Gleeson, P.A., (1992)
Rapid purification of the gastric H/K ATPase complex by tomato-lectin affinity Chromatografphy
Biochemical Journal **283:** 63 - 68;

Campanacci M., Baldini N., Boriani S., Sudanese A., (1987)
Giant-cell tumor of bone
J. Bone and Joint Surg., **69-A:** 106 -114;

Campanacci M., Guinti A., Olmi R., (1975)
Giant-cell tumours of bone. A study of 209 cases with long-term follow-up in 130
Italin J. Orthop. and Traumat., **1:** 249-247;

Contesso, G., (1989)
Institut Gustave Roussi, Villejuif, személyes közlés;

Dahlin D.C., (1985)
Giant cell tumor of bone: highlights of 407 cases
AJR., **144:** 955-960;

Damjanov I., (1987)
Biology of disease. Lectin cytochemistry and histochemistry
Lab. Invest., **57:** 5-20;

Enneking W.F., Spanier S.S., Goodman M.A., (1980)
A system for the surgical staging of mucosceletal sarcoma
Clin. Orthop. **153:** 106-102;

Etzler, M., (1974)
Horse gram (Dolichus biflorus) lectin.
Ann. N. Y. Acad. Sci. **234:** 340 - 344;

Etzler, M.E., Gupta, S., Borrebaeck, C., (1980)
Carbohydrate binding propeties of the Dolichus biflorus lectin and its subunits.
J. Biol. Chem. **256:** 2367 - 2370;

Farnum, C.E., (1985)
Binding of lectin-fluorescein conjugates to intracellular compartments of growth-plate chondrocytes in situ.
Am. J. Anat. **174:** 419 - 435;

Farnum, C.E., Wilsman, N.J., (1986)
In situ localization of Lectin-binding glycoconjugates in the matrix of growth-plate cartilage.
Am. J. Anat. **176:** 65 - 82;

Fay, O.J., (1914)
Traumatic parosteal bone and callus formation The so-called traumatic ossifying myositis.
Surg. Gynec. and Obst. **19:** 174 - 190;

Fischer, J., (1987)
Alternative ultrstructural localization of Dolichus biflorus lectin binding sites in proton secreting parietal cells of mice
Histochemistry **87:** 479-482;

Fischer, J., (1987)
Szöveti glycoconjugátumok lektinkötése és szerkezete
Doktori Értekezés

Friedenstein, A.J., (1976)
Precorsor cells of mechanocytes.
Int. Rev. Cytol. **47;** 327-357;

Gechicter, C.F., Maseritz, I.H., (1938)
Myositis ossificans.
J. Bone Joint Surg. **20:** 661 - 674;

Glaeber A., Csató Zs., Juhász J., (1980)
Csontdaganatok Medicina Budapest

Goldring S.R., Schiller A.L., Mankin H.J., Dayer J-M., KraneS.M., (1986)
Characterization of cells from human giant cell tumors of bone
Clin. Orthop. **204:** 59-75;

Goldstein, I.J., Hughes, R.C., Monsigny, M., Osawa, T., Sharon, N., (1980)
What should be called a lectin?
Nature **285:** 66-;

Goldstein, L.J., Hammerstrom, S., Sundblad, G., (1975)
Precipitation and carbohydrate- binding specificity studies on Wheat ggerm agglutinin.
BBA. **405:** 53 - 61;

Göthlin G., Ericsson L.E., (1976)
The osteoclast. Review of ultrastructure, origin, and structure-function relationship
Clin. Orthop., **120:** 201-231;

Heinegard, D., Oldberg, A., (1990)
Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollegenous macromolecules
FASEB J. **3:** 2042 - 2051;

Hsu, S-M., Ree, H.J., (1983)
Histochemical studies on lectin binding in reactive lymphoid tissues.
J. Histochem Cytochem **31:**538-;

Illés T, Fischer J.,
Possibilities of Lectin Histochemistry in Bone Pathological Investigations
The Bulletin of the Hospital of Joint Diseases (közlés alatt);

Illés T., Fiscer J., (1987)
Lectin Histochemistry for the Characterization of Osteoclasts and Other Giant Cell Types
Path. Res. Pract., **182:** 500;

Illés, T., Fischer, J., (1987)
Lektin hisztokémiai vizsgálatok osteoclastómákban és egyéb óriássejtes folyamatokban
Morph. Ig. Orv. Szle **28:** 39-44;

Illés, T., (1988)
Csontsejtek és csonttumorok lektin-hisztokémiája
Magyar Orthopéd Társaság **Zinner Nándor** Pályamunka ;

Illés T., Fiscer J., (1989)
Distribution of Lectin Binding Glycoprotein in Osteoclasts
Histochemistry, **91:** 55-59;

Illés, T., Fischer, J., (1990)
Characterization of Bone Cells and Bone Tumors by Lectins
Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry Vol.**7:**399-404
Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri USA;

Illés, T., Szendrõi, M., Fischer, J., (1990)
Csontsejtek és csonttumorok lektin-hisztokémiája
Morphológiai és Igazságügyi Orvosi Szemle **30:** 117-124;

Illés, T., Dubousset, J., Szendrõi, M., Fischer, J.,(1992)
Characterization of Bone Forming Cells in Posttraumatic Myositis Ossificans by Lectins
Path. Res. Prac. **188:** 172-176;

Illés, T., Dubousset, J., Szendrõi, M., Fischer, J.,(1993)
A csontképző sejtek vizsgálata myositis ossificansban
Magyar Traumatológia, Orthopédia Kézsebészet, Plasztikai Sebészet
5: 459 - 465;

Illés,T., Dubousset, J., Szendrõi, M., Fischer, J.,
Csonttumorok lektin-hisztokémiai jellemzése I. Az osteoclastok stádium függő lektin kötés változása benignus és malignus osteoclastomákban
Magyar Traumatológia, Orthopédia Kézsebészet, Plasztikai Sebészet (közlésre elfogadva);

Illés, T., Dubousset, J., Szendrõi M.,
Le comportement des cellules géantes dans les tumeur à cellules géantes
Une étude lectin-histochimique
Archives d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques (közlésre elfogadva);

Illés, T., Fischer, J.,
Csonttumorok lektin-hisztokémiai jellemzése II. Lektin kötő glikoproteinek az osteogén sarcoma sejtekben
Magyar Traumatológia, Orthopédia Kézsebészet, Plasztikai Sebészet (közlés alatt);

Illés, T., Fischer, J.,
Csonttumorok lektin-hisztokémiai jellemzése III. Az óriássejtek eredetének és funkciójának vizsgálata benignus csonttumorokban
Magyar Traumatológia, Orthopédia Kézsebészet, Plasztikai Sebészet (közlés alatt);

Illés, T., Fischer, J., Lovász, Gy., Luck, J.V.Jr.,
Lectin Binding Pattern in Osteosarcoma Cells Depending on the Maturing Stade
Orthopedics (közlés alatt);

Iozzo, R.V., (1985)
Biology of Disease. Proteoglycans:structure, function, and role in neoplasia
Lab. Invest. **53:** 373 - 396;

Jaffe H.L., Lichtentsein L., Portis R.B., (1940)
Giant Cell Tumor of Bone. Its Pathologic Appearance, Grading, Supposed Variants and Treatment
Arch. Pathol., **30:** 993-1031;

Jaffe, H.L., (1946)
Fibrous dysplasia of bone.
Bull. N. Y. Acad. Med. **22:** 588 - 604;

Johnson, C., (1948)
Histogenesis of myositis ossificans.
Am. J. Pathol. **24:** 681 - 682;

Kiszely, J., Barka, T., (1958)
Gyakorlati mikrotechnika és hisztokémia
Medicina Kiadó, Budapest;

Lichtenstein, L., Jaffe, H.L., (1942)
Fibrous dysplasia of bone.
Arch. Path. **33:** 777 - 816;

Lis, H., Sharon, N., (1986)
Lectins as molecules and as tools
Ann. Rev. Biochem. **55:** 33-67;

Lotan, R., Skutelsky, E., Danon, D., Sharon, N., (1975)
The purification, composition and specificity of the anti-T lektin from peanut (Arachis hypogaea)
J. Biol. Chem. **250:** 8518 - 8523;

Luck, J.V., (1992)
Orthopaedic Hospital, Los Angeles, személyes közlés;

Lusitig, S., Pluznik, D.H., (1983)
Rearrangement of Con A and WGA receptors on murine mastocytoma cell membranes: Relationship to cell cycle.
J.Cell Physiol. **115:** 87 - 92;

Marcus, R., (1987)
Normal and abnormal bone remodeling in man
Ann. Rev. Med. **38:** 129-141;

Matsumoto, I., Osawa, T., (1970)
purification and characterization of a Cytisus-type anti-H(O) Phytohemagglutinin from Ulex europeus seeds.
Arch. Biochem. Biophys. **140:** 481 - 491;

Mc Manus, J.E.A., (1946)
Histiligical Demonstration of Mucin after Periodic Acid
Nature **158:** 202;

Menghi, G., Accili, D., Bondi, A.M., Materazzi, G., (1986)
Lectins as indicators of cell surface and cytoplasmic sugar changes in the oviduct of the postovulatory and pregnant rabbit.
Basic Appl. Histochem. **30:**69-;

Milaire, J., (1991)
Lectin binding sites in developing mouse limb buds.
Anat. Embriol. **184:** 479 - 488;

Milaire, J., (1991)
Lectin histochemistry in normal and abnormal limb morphogenesis in the mouse.
Progr. Histo - and Cytochem. **23:** 132 - 140;

Minor, R.R., (1980)
Collagen Metabolism
American Journal of Pathology **98:** 225-280;

Móczár, E., (1987)
Nagy molekulájú glikokonjugátok kémiája és élettani szerepe
Biokémia **11:** 157-168;

Módis, L., (1991)
Organization of the Extracellular Matrix: a Polarization Microscopic Approach
CRC Press, Boca Raton;

Monsigny, M., Roche, A.C., Sene, C., Maget-Dana, R., Delmotte, F., (1980)
Sugar-lectin interactions: how does Wheat-germ agglutinin bind sialoglycoconjugates
Eur. J. Biochem. **104:** 147-153;

Muphy, L.A., Goldstein, I.J., (1977)
Five a-D-galactopyranosyl-binding isolectins from Bandeira simplicifolia seeds.
J. Biol. Chem. **252:** 4739-4747;

Murphy W.R., Ackerman L.V., (1956)
Benign and maliganant giant-cell tumors of bone. A clinical-pathological evaluation of thirty-one cases
Cancer, **9:** 317-339;

Murphy, L.A., Goldstein, I.J., (1977)
Five a-D-Galactopyranosyl-binding Isolectin from Bandeira simplicifolia seeds.
J. Biol. Chem. **252:** 4739 - 4742;

Nakamura, M., Akita, H., Mizoguchi, I., Kagayama, M., (1989)
A histochemical localization on Maclura pomifera lectin during osteogenesis.
Histochemistry **92:** 225 - 230;

Nicolson, G.L., Blaustein, J., (1972)
The interaction of Ricinus communis agglutinin with normal and tumor cell surfaces
BBA. **266:** 543 - 547;

Nicolson, G.L., Blaustein, J., Etzler, M.E., (1974)
Caracterization of two plant lectins from Ricinus communis and their quantitative interaction with a murine lymphoma.
Biochemistry **13:** 196 - 204;

Nijweidw P.J., Burger, E.H., Feyen, J.H., (1986)
Cells of bone: proliferation, differentiation and hormonal regulation.
Physiological Reviews **66:** 855 - 886;

Nowell, P.C., (1960)
Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes
Cancer Res. **20:** 462-466;

Owen, M., (1978)
Histogenesis of bone cells.
Calcif. Tissue Res. **25:** 205 - 207;

Owen, M., (1985)
Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system.
in:Peck, W.A., (ed) Bone and Mineral Research, Vol **3:** 1 - 23. Elsevier, Amsterdam;

Paralkar, V.M., Nandedkar, A.K.N., Reddi, A.H., (1989)
Affinity of osteogenin, an extracellular bone matrix associated protein initiating bone differentiation, for Concanavalin A.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **160:** 419 - 424;

Parsons, J., (1983)
Bone tissue: An overview of structure and function
Clinical and Investigative Medecine, **5:** 141-146;

Pearse, E.G.A. (1968)
Histochemistry: theoretical and applied
Churchill Ltd. London;

Pena, S.D.J., Gordon, B.B., Kárpáti, G., Carpenter, S., (1981)
Lectin histochemistry of human sceletal muscle.
J. Histochem. Cytochem. **29:** 542 - 546;

Pereira, M.E.A., Kabat, E.A., (1974)
Discussion paper: Blood group specificity of the lectin from Lotus tetragonolobus
Ann. N. Y. Acad. Sci. **234:** 301 - 304;

Pereira, M.E.A., Kabat, E.A., Lotan, R., Sharon, N., (1976)
Immunochemical studies on the specificity of the peanut (Arachis hypogaea) agglutinin.
Carbohydr. Res. **51:** 107-118;

Pereira, M.E.A., Kabat,E.A., (1979)
Immunochemical studies on lectins and their application to the fractional of blood substances and cells.
CRC Critical Rev. Immunol. 33-78;

Petryniak, J., Goldstein, I.J., (1986)
Immunochemical studies on the interaction between synthetic glycoconjugates and a-L-fucosyl binding lectins.
Biochemistry **25:**2829-;

Povysil, C., Matejovsky, Z., (1979)
Ultrastructural evidence of myofibroblasts in pseudomalignant myositis ossificans.
Virchows Arch. A. Path. Anat. and Histol. **381:** 189 - 203;

Pusztai, A., (1987)
Plant lectins - Biological functions
Acta Biochim. Biophys. Hung. **22:**355-375;

Raisz, L.G., (1983)
Bone metabolism and its hormonal regulation
Triangel **22:** 81-89;

Raisz, L.G., Kream, B.E., (1983)
Regulation of bone formation (First of two parts)
The New England Journal of Medicine **309:** 29-35;

Raisz, L.G., Kream, B.E., (1983)
Regulation of bone formation (Second of two parts)
The New England Journal of Medicine **309:** 83-89;

Rawn, J.D., (1989)
Biochemistry
Neil Patterson Publishers, Buelington: 878 -880;

Reeke, G.N., Becker, J.W., Cunningham, B.A., Gunther, G.R., Wang, J.L., Edelman, G.M., (1974)
Relationships between the structure and activities of Concanavalin A
Ann. N.Y. Acad. Sci. **234:** 369 - 382;

Reggio, H., Bainton, D., Harms, E., Coudrier, E., Louvard, D., (1984)
Antibodies against lysosomal membranes reveal a 100000-mol-wt protein that cross-reacts with purified H-K-ATPase from gastric mucosa.
J. Cell Biol. **99:** 1511 - 1526;

Renkonen, K.O., (1948)
Studien on hemagglutinins presnt in seeds of same representatives of family of leguminoseae
Ann. Med. Exp. Biol. Fenn. **26:** 66-72;

Rodan, G.A., Martin,T.J., (1984)
Role of osteoblasta in Hormonal Control of Bone Resorption - A Hypothesis
Calcif. Tissue Int. **33:** 349-351;

Roessner A., v. Bassewitz D.B., Schlake W., Thorwesten G., Grundmann E., (1984)
Biologic characterization of human bone tumours. III. Giant cell tumor of bone. A combined electron microscopical, histochemical, and autoradiographical study
Path. Res. Pract.,**178:** 431-440;

Roessner A., Vasallo J., Vollner E., Zwadlo G., Sorg C., Grundmann E., (1987)
Biologic characterization of human bone tumours. X. The proliferation behavior of macrophages as compared to fibroblastc cells in malignant fibrous histiocytoma and giant cell tumor of bone
J. Cancer Res. Clin. Oncol., **113:** 559-562;

Rosalki, S.B., Foo, Y.A., (1984)
Two new methods for separating and quantifiing bone and liver alkaline phosphatase isoenzyme in plasma.
Clin Chem. **300:** 1182 - 1186;

Ruoslahti, E., (1988)
Structure and biology of proteoglicans
Annu. Rev. Cell Biol. **4:** 229;

Sandberg, M.M., Aro, H.T., Vuorio, E.I., (1993)
Gene expression during bone repair
Clin. Orthop. **289:** 292 - 312;

Santer, U.V., Gilbert, F., Glick,M.C., (1984)
Change in glycosilation of membrane glycoproteins after transfection of NH3T3 with human tumor DNA.
Cancer Res. **44:** 3730 - 3735;

Sato, A., Spicer, S.S., (1982)
Ultrastructural visualisation of galactose in the glycoprotein of gastric surface cells with peanut lectin conjugate
Histochem. J. **14:** 125-138;

Sato, A., Spicer, S.S., (1982)
Ultrastructural visualisation of galactosyl residues in various alimentary epithelial cells with the peanut lectin-horseradish peroxidase procedure histochemistry **73:** 607 - 624;

Schwartz, D.T., Alpert, M., (1964)
The malignant transformation of fibrous dysplasis
Amer. J. Med. Sci. **247:** 1 - 20;

Sharon, N., (1974)
Glycoproteins
Scientific American **230:** 78 -86;

Sharon, N., (1977)
Lectins
Scientific American **236:** 108 - 119;

Sharon, N., (1980)
Carbohydrates
Scientific American **243:** 80 - 97;

Sharon, N., Lis, H., (1993)
Carbohydrates in Cell Recognition
Scientific American **268:** 74 - 81;

Sorensen, S., (1988)
Wheat-gwerm agglutinin method for measuring bone and liver isoenzymes of alkaline phosphatase assessed in postmenopausal osteoporosis
Clin. Chem. **34:** 1636 - 1640;

Spicer, S.S., Schulte, B.A., Thomopoulos, G.N., Parmley, R.T., Takagi, M., (1983)
Cytochemistry of complex carbohydrates by light and electron microscopy: available mthods and their application.
In: Connective Tissue Disorders; Ed: Wagner, M., Fleischmajer, R., Kaufman, N., Williams and Wilkins, Baltimore, London, 163 -178;

Spicer, S.S., Sens, M.A., Hennigar, R.A., Stoward, P.J., (1984)
Implication of the immunhistochemical localization ot carbonic anhydrase isoenzymes for their function in normal and pathologic cells
Ann. N. Y. Acad. Scie. **429:** 382 - 398;

Spjut, H.J., Dorfman, H.D., Fechner, R.E., Ackerman, L.V., (1983)
Atlas of tumor pathology. Tumors of bone and cartilage
Armed Forces Institute of Pathology, Washington D. C.;

Stevart, M.J., Gilmer, W.S., Edmondson, A.S., (1962)
Fibrous dysplasia of bone.
J. Bone Joint Surg. **44B:** 302 - 318;

Stillmark, H., (1888)
Über Rizin, ein giftiges Ferment aus dem Samen von Ricinus communis
Inaug. Diss. Dorpat;

Takagi, M., Parmley, R.T., Toda, Y., Denys, F.R., (1983)
Ultrastructural cytochemistry of complex carbohydrates in osteoblasts, osteoid, and bone matrix.
Calcif. Tissue Int. 35: 309 - 319;

Takagi, M., Saito, I., Kuwata, F., Otsuka, K., (1988)
Specific binding of peanut agglutini and soybean agglutini to chondroitinase ABC-digested cartilage proteoglycans: histochemical, ultrastructural cytochemical, and biochemical characterization
Histochemical Journal **20:** 88 - 98;

Tettorroo, P.A.T., Mulder, A., Lansdorp, P.M., Zola, H., Baker, D., Visser, F.J., von dem Borne, A.E.G., (1984)
Myeloid-essiciated antigen 3- fucosyl-N-acetyllactosamine (FAL): location on various granulocyte membrane glycoproteins and masking upon monocytic differentiation.
Eur. J. Immunol. **14:** 1089 - 1095;

Uhlenbruck, G., (1971)
Immunbiologie. Eine Einführung.
Goldmann Verl. München;

Vaananen, H.K., (1984)
Immunohistochemical lacalization of carbonic anhydrase isoenzymes I and II in human bone, cartilage and giant cell tumor.
Histochemistry **81:** 485 - 487;

Vaananen, K.K., Malmi, R., Tuukkanen, J., Sundquist, K., Hrkonen, P., (1986)
Identification of osteoclasts by rhoamine-conjugated peanut agglutinin.
Calcif. Tissue Int. **39:** 161 -165;

Vaughan, J.M., (1970)
The Physiology of Bone
Oxford University Press, Ely House, London W.1;

Vízkelety, T., Szendrõi, M., (1990)
Csont-ízületi daganatok és daganatszerű elváltozások
Medicina, Budapest;

Voet, D., Voet, J.G., (1990)
Biochemistry
John Wiley and Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. 571 - 577;

Vuorio, E.I., de Crombrugghe, B., (1990)
The family of collagen genes
Annu, Rev, Biochem. **59:** 837- 872;

Watkins, W.M., Morgan, W.T.J., (1952)
Neutralization of the anti-H agglutinin in EEL serum by simple sugars
Nature **169:** 825-826;

Wick, M.R., Siegal, G.P., Mills,S.E., Thompson, R.C., Sawhney, D., Fechner, R.E., (1987)
Dedifferentiated chondrosarcoma of bone. An immunohistochemical and lectin-histochemical study.
Virchows Arch. A **411:** 23 - 32;

Wood, C., Kabat, E.A., Murphy, L.A., Goldstein, I.J., (1979)
Immunochemical studies of the combining sites of the two isolectins A4 B4, isolated from Bandeira simplicifolia.
Arch. Biochem. Biophys. **198:** 1 - 11;

Wum A.M., (1984)
Differencial binding characteristic and application of D-Gal.b1-3 GalNAc. specific lectins.
Mol. Cell. Biochem. **61:** 131-143;

Yamamoto, K., Tsuji, T., Osawa, T., (1982)
Requirementof the core structure of a complex-type glycopeptide for the binding to immobilized lentil - and pea - lectins
Carbohydr. Res. **110:** 283-289;

Zimmermann, B., Thies, M., (1984)
Alterations of lectin binding during chondrogenesis of mouse limb buds.
Histochemistry **81:** 353 - 361;

MAGYAR
TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
KÖNYVTÁRA

0016115