

ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ЕРИТРОНУ У МИШЕЙ ЗА УМОВ НОКАУТУ ГЕНА *PTTG*

О. Канюка¹, Є. Філяк², Н. Сибірна¹

¹Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail kanokaol@yahoo.com

²Інститут біології клітини НАН України
вул. Драгоманова, 14/16, Львів 79005, Україна

Було показано, що ген *pttg* має важливе значення для нормального еритропоезу у мишей. На підставі одержаних нами результатів можна зробити висновок, що нокаут гена *pttg* впливає на процеси еритропоезу у мишей, що викликає зменшення загальної кількості еритроцитів периферичної крові, зміну динаміки виходу ретикулоцитів у русло крові, перерозподіл вікового складу різних популяцій червоних клітин у циркуляторному руслі, а також варіацію характеристик фізико-хімічних властивостей мембран еритроцитів.

Ключові слова: еритропоез, еритроцити, гемоліз.

Онкоген *pttg* (Pituitary tumor transforming gene) кодує білок секурин, який переважно локалізується у цитоплазмі та частково у ядрі. Секурин інгібує фермент сепаразу, субстратом якого є когезин, що дає змогу зберегти з'єднаними дві сестринські хроматиди [1] у М-фазі мітозу [13]. Також у нуклеотидній послідовності цього гена було виявлено потенційні сайти для зв'язування білка Sp1, який, як відомо, є транскрипційним фактором, а також фактором регуляції фази G1 клітинного циклу [6]. Окрім того, Sp1 регулює експресію специфічних генів, які визначають напрямок комітації еритроїдного, моноцитарного та лімфоїдного ростків і є модулятором залежної від ретиноїдної кислоти та цАМФ транскрипції гена тканинного активатора плазміногену [8, 9, 12].

Було показано, що у мишей із нокаутом гена *pttg* (*pttg*-КО) наявні морфологічні зміни деяких внутрішніх органів (гіперплазія тимусу та гіпоплазія селезінки і яєчок), а також відхилення у перебігу клітинного циклу, хромосомна нестабільність і передчасне розходження центромер. Окрім того, у мишей *pttg*-КО виявлено тромбоцитопенію, незважаючи на збережену кількість мегакаріоцитів у кістковому мозку. Кількість тромбоцитів периферичної крові у мишей *pttg*-КО становила тільки 40–65% від кількості тромбоцитів крові у мишей дикого типу (*pttg*-WT) [10]. Оскільки попередніми дослідженнями [10] підтверджено вплив нокауту гена *pttg* на морфологію кровотворних органів, то можна припустити, що відсутність даного гена повинна значною мірою впливати на структурно-функціональний стан кістковомозкової гемопоетичної тканини, що має високу мітотичну активність, і на кінцеві продукти проліферації та диференціації у системі еритроцитів.

Метою нашої роботи було вивчення особливостей структурно-функціонального стану еритроцитів периферичної крові у *pttg*-WT та *pttg*-КО мишей.

Матеріали та методи

Дослідження проводили на мишах лінії BL6/C57 дикого типу (*pttg*-WT) та на мишах із нокаутом гена *pttg* (*pttg*-КО).

Кількість еритроцитів визначали уніфікованим методом підрахунку в камері Горяєва. Концентрацію гемоглобіну визначали за методом Драбкіна [4]. Для підрахунку ретикулоцитів мазки крові готували за методом Л. Гейльмейра у модифікації Н.О. Сибірної. Швидкість дозрівання ретикулоцитів визначали шляхом їх підрахунку на мазках крові до і після інкубації протягом 4 год при 37°C у 3,8%-ному розчині натрію цитрату [4]. Резистентність еритроцитів до кислотного гемолітика досліджували за методом Терскова і Гітельсона [5]. Різновікові популяції еритроцитів отримували методом фракціонування клітин у градієнті густини фіколу. Різновікові популяції еритроцитів виділяли методом фракціонування клітин у шестиступеневому градієнті густини фіколу. У колонку поміщали 0,5 мл еритроцитарної суспензії. Потім її нахиляли під кутом 60° і по стінці обережно почергово нашаровували по 2 мл розчину фіколу, починаючи з розчину із найбільшою густиною – 1,108 г/л, далі відповідно: 1,089; 1,072; 1,054; 1,038 та 1,02 г/л. Колонку знову закріплювали вертикально. Таким чином отримували шість клітинних фракцій. Для диференціації отриманих клітинних популяцій у віковому аспекті проводили цитологічний контроль на вміст ретикулоцитів [4].

Результати обробляли статистично з використанням t-критерію Стьюдента. Вірогідною вважалася різниця при $p < 0,05$.

Результати і їхнє обговорення

У циркуляторне русло еритроцити по синусах кісткового мозку переходять на стадії ретикулоцитів, які є перехідною формою від ядерних нормоцитів до без'ядерних еритроцитів. Еритроцитарний баланс – це показник гомеостазу, який забезпечує постійний рівень еритроцитів, що надходять у кров'яне русло та руйнуються за рівний проміжок часу. Різноманітні зрушення в системі еритрону, які виникають у фізіологічних умовах і при патологічних процесах, можуть супроводжуватися зміною кількості еритроцитів у крові.

У проведених дослідженнях виявлено зменшення кількості еритроцитів на 26% у периферичній крові мишей *pttg-KO* порівняно з мишами *pttg-WT* (рис. 1). Також було показано зменшення середнього вмісту гемоглобіну в одному еритроциті на 10%. Ці дані свідчать про розвиток гіпохромної анемії у мишей із нокаутом гена *pttg*.

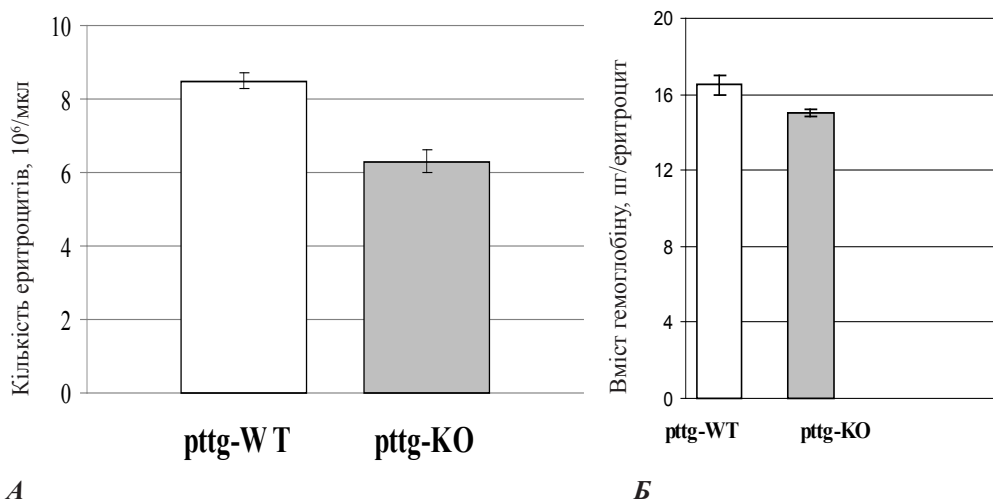


Рис. 1. Кількість еритроцитів (А) і середній вміст гемоглобіну в одному еритроциті (Б) у периферичній крові *pttg-WT* і *pttg-KO* мишей.

Кількість ретикулоцитів у периферичній крові є важливим показником інтенсифікації роботи еритрону в напрямі збільшення продукції еритроїдного ростка. Одержані результати засвідчують підвищений вміст ретикулоцитів у периферичній крові *pttg*-КО мишей на 14%. Але збільшення кількості ретикулоцитів не дає однозначної відповіді про посилення еритропоезу. Тому ми досліджували також добову продукцію ретикулоцитів, що є визначальним показником стану еритропоетичної функції кісткового мозку. З отриманих результатів видно, що добова продукція ретикулоцитів при нокауті гена *pttg* зростає у 4 рази (табл. 1). Підвищення надходження в периферичну кров молодих еритроцитів – ретикулоцитів, які зберігають у цитоплазмі ретикулум (залишки біосинтетичного апарату глобіну) свідчить про інтенсифікацію проліферативної активності еритроїдного ростка кісткового мозку. Це можна спостерігати як компенсаторні регенеративні явища після гемолізу або ж унаслідок посиленого еритродіарезу – фізіологічного процесу руйнування старих і дефектних еритроцитів.

Таблиця 1

Кількість ретикулоцитів у периферичній крові та їхня добова продукція у *pttg*-WT і *pttg*-КО мишей ($M \pm m$, $n=8-10$)

Група	Кількість ретикулоцитів у периферичній крові, ‰	Добова продукція ретикулоцитів, тисяч
<i>pttg</i> -WT	3,2±0,5	102±8,5
<i>pttg</i> -КО	3,7±0,2*	250±11,9*

Примітка. * – різниця вірогідна, порівняно з показниками в контролі, $p < 0,05$.

Стійкість клітини до дії пошкоджувальних факторів може виступати критерієм фізико-хімічного стану її мембрани та стану організму в цілому. Мірою стійкості еритроцита є час, протягом якого він не лізується. Стійкість еритроцитів є показником, який характеризує їхній функціональний стан. Вважається, що клітинна мембрана є критичною мішенню в механізмах рН-індукованого гемолізу [2]. Лізис еритроцитів у кислотному середовищі включає три основні стадії: проникнення йонів водню крізь плазматичну мембрану, протонування гемоглобіну і, як наслідок цього, осмотичне руйнування червоних клітин [3]. Лізис еритроцитів у кислотному середовищі багато в чому обумовлений денатурацією і подальшою агрегацією мембранних білків [11], де важливу роль відіграє олігомеризація білка смоги 3 цитоскелету, найбільш виражена у зрілих і старих еритроцитах [7].

Підтримка на достатньому рівні загальної кількості еритроцитів здійснюється системою еритрону – складного комплексу клітин, до складу якого входять ранні клітини-попередники; клітини еритроїдного ряду кісткового мозку, що мають ядра, на різних етапах диференціювання; ретикулоцити; еритроцити різного ступеня зрілості.

Для диференціації отриманих при фракціонуванні у градієнті фіколу еритроцитарних популяцій у віковому аспекті проводили цитологічний контроль на вміст ретикулоцитів. Це дало змогу виділити фракції, які були об'єднані у три популяції: перша популяція – „фізіологічно старі” еритроцити – містила 0–10‰ ретикулоцитів; друга популяція – „фізіологічно зрілі” – 13–16‰; третя популяція – „фізіологічно юні” – 20–35‰ ретикулоцитів.

У мишей дикого типу виокремлювалося чотири еритроцитарні фракції, а за умов нокауту гена *pttg* було отримано шість фракцій (табл. 2). Спостерігалось зростання відсоткового вмісту третьої популяції на 36% та зниження вмісту другої популяції на 46%. Також було виявлено зростання відсоткового вмісту 1-ї популяції на 20% за рахунок додаткової фракції. Одержані результати дають підстави стверджувати, що за умов

нокауту гена *pttg* відбувається перерозподіл різновікових популяцій еритроїдних клітин у периферичній крові із тенденцією зростання популяцій молодих та старих еритроцитів і зниження кількості „фізіологічно зрілих” еритроцитів.

Таблиця 2

Відсоткове співвідношення різновікових фракцій і популяцій еритроцитів мишей *pttg*-WT і *pttg*-KO ($M \pm m$, $n=8-10$)

Варіант		<i>pttg</i> -WT відсотковий вміст, %	<i>pttg</i> -KO відсотковий вміст, %
Перша популяція „фізіологічно стари”	Фракція №1	–	7±0,6*
	Фракція №2	10±1,54	26±2,35*
Друга популяція „фізіологічно зрілі”	Фракція №3	26±2,47	18±1,45
	Фракція №4	39±2,6	18±0,89*
Третя популяція „фізіологічно юні”	Фракція №5	25±2,4	17±1,2*
	Фракція №6	–	14±0,7*

Примітка. *– різниця вірогідна, порівняно з показниками в контролі, $p < 0,05$.

У результаті досліджень еритроцитів крові мишей *pttg*-WT і *pttg*-KO методом кислотних еритрограм отримано криві гемолізу, які відображають динаміку змін вікового складу популяцій еритроцитів. Аналіз одержаних даних засвідчив, що якісний склад еритроцитів крові *pttg*-KO мишей змінюється. Зміщення еритрограми праворуч свідчить про наявність більш резистентних до дії кислотного гемолітика молодих еритроцитів у *pttg*-KO мишей.

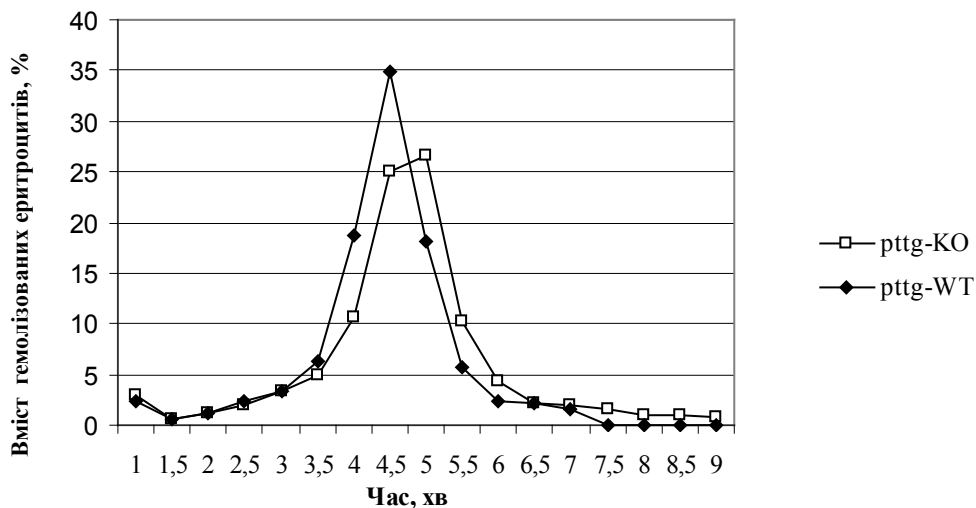


Рис. 2. Типові еритрограми еритроцитів у *pttg*-WT і *pttg*-KO мишей.

На підставі одержаних нами результатів можна зробити висновок, що нокаут гена *pttg* впливає на процеси еритропоезу у мишей, що викликає зменшення загальної кількості

еритроцитів периферичної крові, зміну динаміки виходу ретикулоцитів у русло крові, перерозподіл вікового складу різних популяцій червоних клітин у циркуляторному руслі, а також варіацію характеристик фізико-хімічних властивостей мембран еритроцитів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Богданов К. В.* Гены контрольной точки веретена деления и их значение при лейкозах // Цитология. 2009. Т. 51. С. 957–963.
2. *Иванов И. Т.* Сравнение механизмов кислотного и щелочного гемолиза эритроцитов человека // Биофизика. 2001. Т. 46. Вип. 2. С. 281–290.
3. *Поэтова В. Т., Гутельзон И. И., Терсков И. А.* Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов. М.: Наука, 1967. С. 81–85.
4. *Сибірна Н. О., Великий М. М.* Цитологічні та фізико-хімічні методи дослідження крові: Метод. посібник. Львів: ЛДУ, 1997. 69 с.
5. *Терсков И. А., Гутельзон М. И.* Эритрограммы как метод клинического исследования крови. Красноярск: Изд-во Сиб. отд. АН СССР, 1959. 246 с.
6. *Darrow A. L., Rickles R. J., Pecorino L. T., Strickland S.* Transcription factor Sp1 is important for retinoic acid-induced expression of the tissue plasminogen activator gene during F9 teratocarcinoma cell differentiation // Mol. Cell. Biol. 1990. Vol. 10(11). P. 5883–5893.
7. *Maeda N., Kon K., Imaizumi K. et al.* Alteration of rheological properties of human erythrocytes by crosslinking of membrane proteins // Biochim. Biophys. Acta. 1983. Vol. 735 (1). P. 104–112.
8. *Spanopoulo E., Giguere V., Grosveld F.* The functional domains of the murine Thy-1 gene promoter // Mol. Cell. Biol. 1991. Vol. 11(4). P. 2216–2228.
9. *Wang Z., Melmed S.* Characterization of the murine pituitary tumor transforming gene (PTTG) and its promoter // Endocrinol. 2000. Vol. 141(2). P. 763–771.
10. *Wang Z., Yu R., Melmed S.* Mice lacking Pituitary Tumor Transforming Gene Show Testicular and Splenic Hypoplasia, Thymic Hyperplasia, Trombocytopenia, Aberrant Cell Cycle Progression, and Premature Centromere Division // Mol. Endocrinol. 2001. Vol. 15(11). P. 1870–1879.
11. *Weight L. M., Byrne M. J., Jacobs P.* Haemolytic effects of exercise // Clin. Sci. (London). 1991. Vol. 81. P. 147–152.
12. *Yu C. Y., Motamed K., Chen J. et al.* The CACC box upstream of human embryonic epsilon globin gene binds Sp1 and is a functional promoter element in vitro and in vivo // J. Biol. Chem. 1991. Vol. 266(14). P. 8907–8915.
13. *Zou H., McGarry T. J., Bernal T., Kirschner M. W.* Identification of a vertebrate sister chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis // Science. 1999. Vol. 285. P. 418–422.

Стаття: надійшла до редакції 03.03.11

доопрацьована 05.05.11

прийнята до друку 10.05.11

**ERYTHRONE FUNCTIONAL STATE IN MICE WITH
THE OF KNOCKOUT *PTTG* GENE**

O. Kanyuka¹, YE. Filyak², N. Sybirna¹

*¹Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail kanokaol@yahoo.com*

*²Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine
14/16, Dragomanov St., Lviv 79005, Ukraine*

It was shown that *pttg* gene is essential for normal erythropoiesis in mice. The absence of this gene cause the changes of the total number of peripheral blood erythrocytes and the dynamics of release of reticulocytes in peripheral blood channel, distributed age structure of different populations of red cells in the circulation line, and recorded changes in physical and chemical properties of erythrocyte membranes.

Key words: erythropoiesis, erythron, hemolysis.

**ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЕРИТРОНА У МЫШЕЙ
ПРИ НОКАУТЕ ГЕНА *PTTG***

А. Канюка¹, Е. Филяк², Н. Сибирная¹

*¹Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов, 79005, Украина
e-mail kanokaol@yahoo.com*

*²Институт биологии клетки НАН Украины
ул. Драгоманова, 14/16, Львов 79005, Украина*

Было показано, что ген *pttg* имеет важное значение для нормального эритропоэза у мышей. При отсутствии данного гена меняется общее количество эритроцитов периферической крови, динамика выхода ретикулоцитов в русло периферической крови, перераспределяется состав разновозрастных популяций красных клеток в циркуляторном русле, а также регистрируются изменения физико-химических свойств мембран эритроцитов.

Ключевые слова: эритропоэз, эритрон, гемолиз.