



УДК 616.36-07.826

ОКРЕМІ БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ СИРОВАТКИ КРОВІ МИШЕЙ З НОКАУТОМ ГЕНА *pttg*

О. П. Канюка¹, Є. З. Філяк², С. В. Афанасьєв¹, Н. О. Сибірня¹

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

Ураження печінки будь-якої етіології супроводжується посиленням фіброгенезу. Одним із ключових генів, що може впливати на розвиток фіброзу печінки, є *pttg* (Pituitary tumor transforming gene). Цей ген кодує білок секурін, який відіграє важливу роль у підтриманні сестринських хроматид в асоційованому стані у S-фазі клітинного циклу. Завдяки цьому ген *pttg* бере участь у регуляції таких ключових для клітини подій, як мітоз, репарація ДНК і апоптоз. Досліджено вплив нокаутування гена *pttg* на окремі біохімічні показники сироватки крові мишей, які можуть бути серологічними маркерами функціонального стану печінки. Встановлено достовірне зростання активності аспартат- і аланінамінотрансфераз у сироватці крові мишей з нокаутом гена *pttg* у всіх вікових групах. Показано достовірне зростання активності лактатдегідрогенази у мишей із нокаутом гена *pttg* у чотиримісячному віці. На підставі виявлених змін зроблено висновок про те, що дефіцит гена *pttg* зумовлює порушення функціонального стану печінки у мишей.

Ключові слова: ген *pttg*, печінка, фіброз, білірубін, лактатдегідрогеназа.

ВСТУП

Фіброз печінки та його наслідки (цироз, портальна гіпертензія) є головною причиною захворюваності і смертності при хронічних хворобах печінки в більшості країн світу.

Ключова роль у процесі печінкового фіброгенезу належить активованим зірчастим клітинам печінки, оскільки вони є головним джерелом протеїнів позаклітинного матриксу і тканинних колагеназ. Головними колагенпродукуючими клітинами в печінці є зірчасті клітини печінки, відомі також як клітини Іто, а також портальні фібробласти [5,12]. Саме активація зірчастих клітин призводить до розвитку фіброзу. У нормі зірчасті клітини перебувають у стані спокою, проте низка патогенних факторів (віруси гепатиту, холестази, токсини, механічний стрес тощо) викликають їхнє перетворення в активну форму – міофібробласти. Найбільш істотними факторами активації зірчастих клітин печінки та портальних фібробластів є профіброгенні цитокіни,

в першу чергу, трансформуючий фактор росту- β (TGF β). TGF β секретується зірчастими, синусоїдальними ендотеліоцитами, клітинами Купфера та виділяється тромбоцитами і гепатоцитами. Він не тільки ініціює перетворення зірчастих клітин печінки в міофіброласти, а й підсилює синтез матриксних металопротеїназ (MMPs) і збільшує вироблення їхніх тканинних інгібіторів (TIMPs), а також індукує апоптоз гепатоцитів та інгібує їхню проліферацію.

У той же час роль багатьох сигнальних каскадів у патогенезі фіброзу печінки залишається нез'ясованою. Серед сигнальних факторів особливий інтерес становить недавно відкритий трансформуючий ген пухлини гіпофізу (Pituitary tumour transforming gene; *pttg*), що надекспресується у пухлинних клітинах гіпофізу щура [20]. Продукт цього гена, білок секурін, відіграє важливу роль у підтриманні сестринських хроматид в асоційованому стані у S-фазі клітинного циклу. Завдяки цьому ген *pttg* бере участь у регуляції таких ключових для клітини подій, як мітоз, репарація ДНК і апоптоз [14,18,19]. *Pttg* є геном-мішенню для індукованого TGF β раннього гена (TGF-beta-inducible early-response gene; *TIEG*) [17]. Транскрипційний фактор TIEG є інгібітором клітинного росту у диференційованих клітин різних типів. Проте ключовою здатністю TIEG є модуляція TGF β -індукованого апоптозу. Тому ген *pttg* може відігравати суттєву роль у розвитку фіброгенезу і його прогресуванні малігнізації. Оцінити наявність фіброзу печінки дають змогу тести, що відображають порушення функції печінки.

Метою даної роботи було дослідити вплив нокаутування гена *pttg* на окремі біохімічні показники сироватки крові мишей, які можуть бути серологічними маркерами функціонального стану печінки.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У дослідах використовували сироватку крові мишей лінії BL6/C57 дикого типу (*pttg*-WT) та мишей із нокаутом гена *pttg* (*pttg*-KO). Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Міжнародною конвенцією роботи з тваринами та Законом України „Про захист тварин від жорстокого поводження”. Усі тварини були розділені на 3 групи за віком, по 6 тварин у кожній: 1 група – тварини віком 2 місяці; 2 група – тварини віком 4 місяці; 3 група – тварини віком 6 місяців. Тварини перебували в однакових стандартних умовах утримання і годівлі.

Активність аланінамінотрансферази (АлАТ) і аспартатамінотрансферази (АсАТ) визначали динітрофенілгідразиним методом Райтмана-Френкеля [3].

Визначення загального та прямого білірубіну проводили реакцією діазотування білірубіну (за методом Ендрашека-Грофа) діазосульфаніловою кислотою в присутності каталізатора реакції кофеїн-бензоату натрію (загальний білірубін) і за відсутності даного каталізатора (прямий білірубін) [4]. Вміст загального білірубіну визначали на мікроспектрофотометрі Epoch (Biotek) при довжині хвилі 540 нм і температурі від +20 до +25°C.

Концентрацію альбуміну крові визначали за реакцією з бромкрезоловим зеленим [2]. Активність лактатдегідрогенази (ЛДГ) досліджували кінетичним методом за швидкістю зниження оптичної щільності НАДН при довжині хвилі 340 нм і температурі 37°C на спектрофотометрі Helios Epsilon (Thermo Scientific).

Статистичну обробку результатів проводили, використовуючи пакет комп'ютерних програм Statistica з урахуванням *t*-критерію Стьюдента.

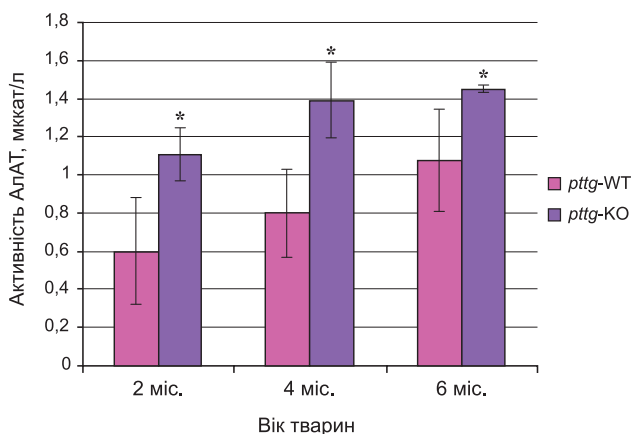
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

На першому етапі досліджень було проведено аналіз активності аланінаміно-трансферази (АлАТ) і аспаратаміно-трансферази (АсАТ) у сироватці крові мишей дикого типу та мишей із нокаутом гена *pttg*. Амінотрансферази (трансамінази) в нормі містяться у клітинах печінкової паренхіми (гепатоцитах) і потрапляють у системний кровоплин після пошкодження мембрани гепатоцита [8].

Під час дослідження активності АлАТ у сироватці крові виявлено, що у мишей *pttg*-KO відбувається зростання рівня активності цього фермента в усіх досліджуваних різновікових групах порівняно зі сироваткою мишей *pttg*-WT (у віці 2-х місяців на 26%, у 4 місяці – на 44% та у 6 місяців на 47%) (рис.1). Підвищення рівня активності АлАТ у сироватці крові відображає перебіг запальних процесів у печінці, що завжди супроводжується фіброгенезом [1].

Рис. 1. Активність аланінаміно-трансферази у різновікових групах мишей *pttg*-WT та *pttg*-KO; * – зміна статистично вірогідна щодо контролю з $P \leq 0,05$, $n=6$

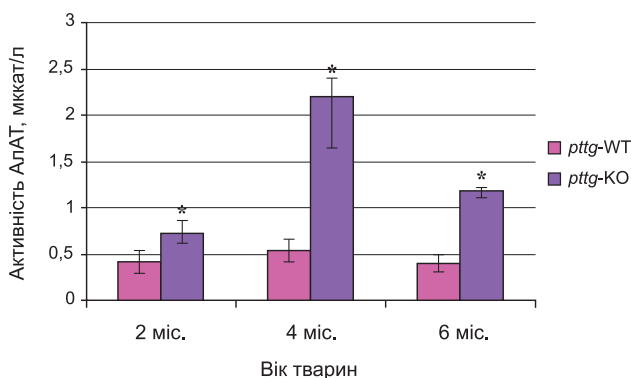
Fig. 1. The activity of alanineamino-transferase in blood serum of groups of different age of *pttg*-WT and *pttg*-KO mice; * – change is statistically significant relative to control with $P \leq 0,05$, $n=6$



Виявлено, що у сироватці крові мишей *pttg*-KO на всіх стадіях дослідження зростає активність АсАТ, порівняно з аналогічними показниками у мишей *pttg*-WT (у віці 2-х місяців на 47%, у 4 місяці – на 86% та у 6 місяців на 34%) (рис. 2). АсАТ міститься у скелетних м'язах, практично в усіх паренхіматозних органах – печінці, нирці, головному мозку, підшлунковій залозі, легені, у клітинах крові – еритроцитах і лейкоцитах [9].

Рис. 2. Активність аспаратаміно-трансферази у різновікових групах мишей *pttg*-WT та *pttg*-KO; * – зміна статистично вірогідна щодо контролю з $P \leq 0,05$, $n=6$

Fig. 2. The activity of aspartatamino-transferase in blood serum of groups of different age of *pttg*-WT and *pttg*-KO mice; * – change is statistically significant relative to control with $P \leq 0,05$, $n=6$



Незначні та помірні запальні процеси в печінці супроводжуються вивільненням АсАТ із цитозолу, мітохондріальні структури при цьому пошкоджуються мало,

тому загальна кількість ферменту в крові невелика, на відміну від рівня АлАТ, яка зосереджена в цитозолі та переходить у кров при пошкодженні клітин.

Ще одним непрямим серологічним маркером фізіологічного стану печінки є рівень білірубіну, що утворюється при розпаді гемоглобіну. За нормальних умов білірубін зв'язується печінкою, а потім виходить із неї з жовчю і виводиться з організму через шлунково-кишковий тракт. Рівень білірубіну в крові може бути підвищений при його надмірному утворенні, зниженому поглинанні та зв'язуванні з печінкою, а також зниженому виділенні його з печінки або при порушенні прохідності жовчних проток.

Результати дослідження показали, що нокаутування гена *pttg* не впливає на концентрацію загального білірубіну у сироватці крові мишей (рис. 3). Проте виявлено певні зміни у концентрації прямого білірубіну у сироватці крові мишей. Так, у сироватці крові мишей *pttg*-КО у віці двох місяців рівень цього метаболіту зростає на 47%. Можливим поясненням цього є виникнення гострого запального процесу.

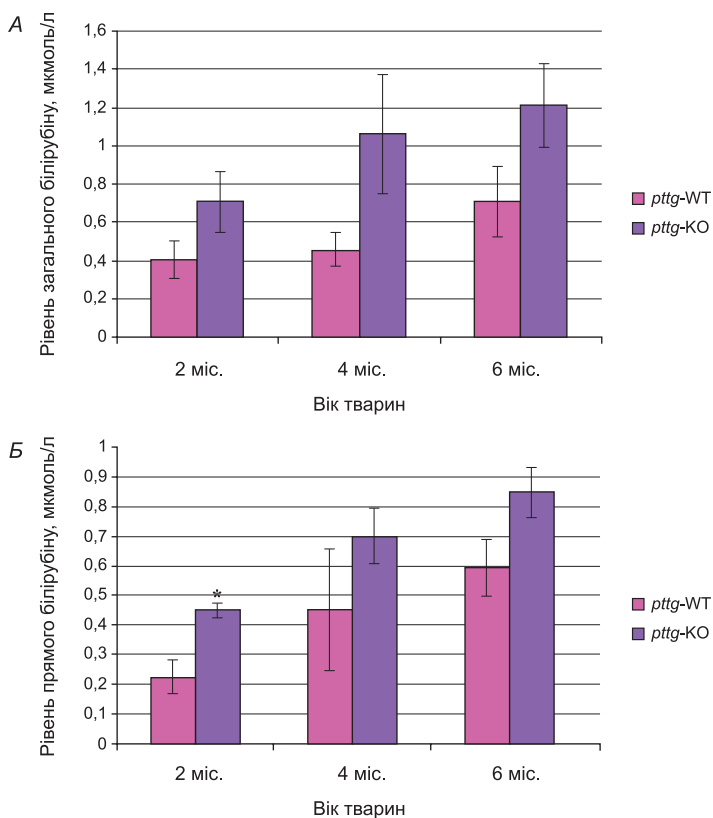


Рис. 3. Концентрація загального (А) та прямого (Б) білірубіну у різновікових групах мишей *pttg*-WT та *pttg*-КО; * – зміна статистично вірогідна щодо контролю з $P \leq 0,05$, $n=6$

Fig. 3. The level of total (A) and direct (B) bilirubin in blood serum of groups of different age of *pttg*-WT and *pttg*-KO mice; * – change is statistically significant relative to control with $P \leq 0,05$, $n=6$

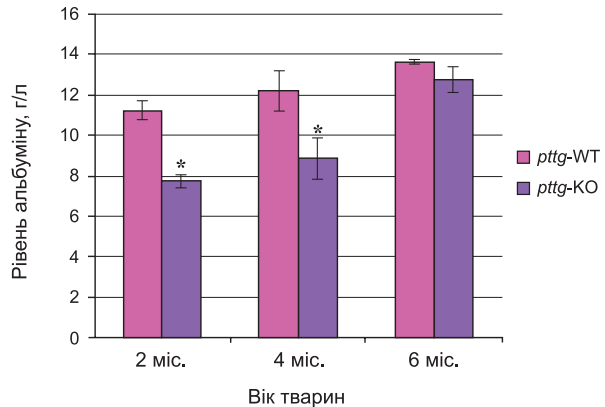
Основним із механізмів біологічної детоксикації організму є робота систем зв'язування і транспорту токсичних речовин. Серед групи білків, що забезпечують транспорт різноманітних ендогенних і екзогенних сполук у крові, важливим є сироватковий альбумін. У низці робіт розглядаються структурні та функціональні особливості останнього за різних патологічних станів організму [7, 11, 13].

Відомо, що вміст альбуміну в крові тварин залежить переважно від інтенсивності його синтезу в печінці [10]. Проведений біохімічний аналіз крові мишей *pttg*-КО усіх груп показав зниження рівня альбуміну (рис. 4). Так, у тварин віком 2 місяці

рівень альбуміну був нижчий на 30% порівняно з відповідним показником у мишей *pttg*-WT, у другій і третій групі зменшення цих показників становило 28% та 17% відповідно. Однак треба відзначити, що у всіх групах відбувалося зростання рівня альбуміну з віком: у мишей віком 4 місяці з нокаутом гена *pttg* концентрація даного білка зросла на 13% порівняно з показниками у двомісячних тварин, і на 31% у шестимісячних тварин порівняно з чотиримісячними мишами *pttg*-KO. Подібна тенденція спостерігалась і у групах мишей: концентрація альбуміну зростала з віком у кожній групі приблизно на 11%. Так, спостережувана гіпоальбумінемія свідчить про порушення білоксинтезуючої функції цього органа. У третій групі рівень альбуміну в сироватці крові мишей *pttg*-KO та *pttg*-WT не відрізнявся.

Рис. 4. Рівень альбуміну сироватки крові у різновікових групах мишей *pttg*-WT та *pttg*-KO; * – зміна статистично вірогідна щодо контролю з $P \leq 0,05$, $n=6$

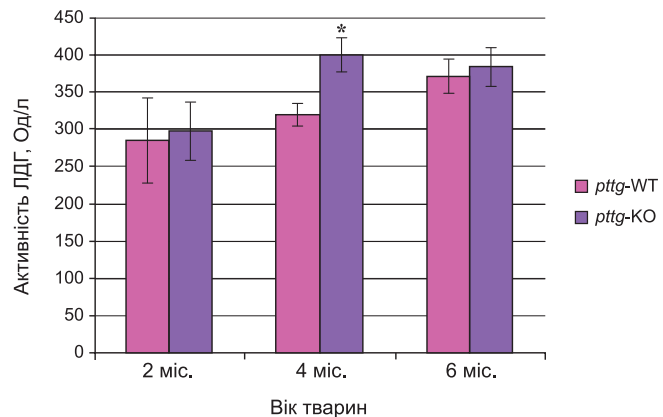
Fig. 4. The level of albumin in blood serum of groups of different age of *pttg*-WT and *pttg*-KO mice; * – change is statistically significant relative to control with $P \leq 0.05$, $n=6$



Печінка є одним із провідних органів регулювання вуглеводного та ліпідного обміну, депо глікогену. Зміна функціонального стану печінки обов'язково супроводжується порушенням обміну речовин [8]. Одним із ключових ферментів метаболізму вуглеводів є ЛДГ. Активність ферменту в сироватці крові мишей *pttg*-KO та *pttg*-WT у віці 2-х місяців становила $298,0 \pm 39,20$ Од/л і $285 \pm 57,20$. Результати дослідження активності ЛДГ сироватки крові показали, що у мишей з нокаутом гена *pttg* найбільше значення цього показника – $400,2 \pm 22,08$ Од/л (рис. 5), спостерігається у віці 4 місяці. Це на 20% вище, ніж в аналогічній групі дикого типу та може вказувати на загострення патологічного стану печінки, що і узгоджується з іншими показниками у другій групі мишей *pttg*-KO.

Рис. 5. Активність лактатдегідрогенази у різновікових групах мишей *pttg*-WT та *pttg*-KO; * – зміна статистично вірогідна щодо контролю з $P \leq 0,05$, $n=6$

Fig. 5. The activity of lactate dehydrogenase in blood serum of groups of different age of *pttg*-WT and *pttg*-KO mice; * – change is statistically significant relative to control with $P \leq 0.05$, $n=6$



Слід відзначити, що в сироватці крові мишей *pttg*-КО у третій групі спостерігається нормалізація активності ЛДГ. Цей фермент є менш специфічним маркером некрозу гепатоцитів, за винятком значного, але короткочасного підвищення її рівня за умов ішемії печінки або тривалого підвищення, що в поєднанні з високим рівнем лужної фосфатази дає підстави запідозрити інфільтрацію печінки злоякісними клітинами [16].

ВИСНОВКИ

Визначені біохімічні показники, які можуть виступати у ролі непрямих серологічних маркерів фіброзу печінки, свідчать про те, що з віком зростає вірогідність формування фіброзу печінки як у мишей із нокаутом гена *pttg*, так і у мишей дикого типу, що можна пояснити поглибленням дистрофічних змін не тільки у цьому органі, а й в організмі загалом. Підвищена активність амінотрансфераз і ЛДГ у сироватці крові мишей *pttg*-КО вказує на наявність ознак біохімічного синдрому цитолізу в печінці. Інтерпретація результатів дослідження окремих біохімічних показників сироватки крові допомагає лише оцінити функціональний стан печінки, проте виключає можливість встановлення діагнозу, базуючись лише на їхньому значенні. Отримані результати вказують на необхідність додаткових гістологічних досліджень печінки за умов відсутності гена *pttg*.

Робота виконана за підтримки Державного фонду фундаментальних досліджень України (проект № Ф41.4/043).

1. *Бабак О.Я., Колесникова Е.В., Кравченко Н.А.* Фиброз печени: современные представления о механизмах, способах диагностики и лечения. **Сучасна гастроентерологія**, 2009; 2: 5–17.
2. *Камышников В.С.* **Клинико-биохимическая лабораторная диагностика**. Справочник: В 2-х т. Москва: Интерпрессервис, 2003. Т. 1. 495 с.
3. **Лабораторные методы исследования в клинике**. Под ред. В. В. Меньшикова. Москва: Медицина, 1987. 365 с.
4. *Уикли Б.* **Электронная микроскопия**. Москва, 1975. 324 с.
5. *Afdhal N.H., Nunes D.* Evaluation of liver fibrosis: A concise review. **Am. J. Gastroenterol**, 2004; 27: 1704–1713.
6. *Balsano C., Alisi A.V.* Liver fibrosis and therapeutic strategies: the goal for improving metabolism. **Curr. Drug. Targets**, 2009; 10(6): 505–512.
7. *Bataller R., Brenner D.A.* Liver fibrosis. **J. Clin. Invest**, 2005; 115: 209–218.
8. *Cales P., Laine F., Boursier J. et al.* Comparison of blood tests for liver fibrosis specific or not to NAFLD. **J. of Hepatol**, 2007; 50: 165–17.
9. *Davern T.J., Scharschmidt B.F.* **Biochemical liver tests**. Feldman M., ed. *Gastrointestinal and Liver Disease*. V. 2. 7th ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2002. 1227–1239.
10. *De Ledinghen V., Le Bail B., Rebouissoux L. et al.* Liver stiffness measurement in children using FibroScan: feasibility study and comparison with Fibrotest, aspartate transaminase to platelets ratio index, and liver biopsy. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr**, 2007; 45: 443–450.
11. *Gianni E., Risso D., Botta F. et al.* Validity and clinical utility of the aspartate aminotransferase_ alanine aminotransferase ratio in assessing disease severity and prognosis in patients with hepatitis C virus_ related chronic liver disease. **Arch. Intern. Med**, 2003; 163: 218–224.
12. *Kim D.S., Franklyn J.A., Boelaert K. et al.* Pituitary tumor transforming gene (*pttg*) stimulates thyroid cell proliferation via a vascular endothelial growth factor /kinase insert domain

- receptor/ inhibitor of DNA binding-3 autocrine pathway. **J. of Clin. Endocrinol. and Metabolism**, 2006; 91: 4603–4611.
13. Laine F., Bendavid C., Moirand R. et al. Prediction of liver fibrosis in patients with features of the metabolic syndrome regardless of alcohol consumption. **Hepatology**, 2004; 39: 1639–1646.
 14. Lee U.E., Ghiassi-Nejad Z., Paris A.J. et al. Tumor suppressor activity of KLF6 mediated by downregulation of the PTTG1 oncogene. **FEBS Lett**, 2010; 584(5) :1006–10.
 15. Pei L., Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (*pttg*). **Molecular Endocrinol**, 1997; 11: 433–441.
 16. Pratt D.S., Kaplan M.M. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. **N. Engl. J. Med**, 2000; 342(17): 1266–1271.
 17. Rajamannan N.M., Subramaniam M., Abraham T.P. et al. TGF β inducible early gene-1 (TIEG1) and cardiac hypertrophy: discovery and characterization of a novel signaling pathway. **J. of Cell. Biochemistry**, 2007; 100: 315–325.
 18. Salehi F., Kovacs K., Scheithauer B.W. et al. Pituitary tumor-transforming gene in endocrine and other neoplasms: a review and update. **Endocrine-Related Cancer**, 2008; 15(3): 721–743.
 19. Stoika R., Melmed S. Expression and function of pituitary tumour transforming gene for T-lymphocyte activation. **Brit. J. of Haematology**, 2002; 119: 1070–1074.
 20. 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; 285: 418–422.

SOME BLOOD BIOCHEMICAL INDICES OF MICE WITH *pttg* GENE KNOCKOUT

O. P. Kanyuka¹, Ye. Z. Filyak², S. V. Afanasyev¹, N. O. Sybirna¹

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

²Institute of Cell Biology of NAS of Ukraine, 14–16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine

Liver injury of any etiology is accompanied by increased fibrogenesis. One of the key genes that may influence in the development of liver fibrosis, is *pttg* gene (Pituitary tumor transforming gene). This gene encodes a protein securin which plays an important role in the maintenance of sister chromatids in associated state in S-phase cell cycle. This *pttg* gene involved in regulation of such key events, as mitosis, reparation DNA, and apoptosis. The effect of *pttg* gene knockout on some biochemical parameters of blood serum of mice that can be serological markers of liver functional state, namely the activity of alanineaminotransferase, aspartateaminotransferase and lactate dehydrogenase, serum albumin concentration, total and direct bilirubin in blood serum of wild-type mice and mice with *pttg* gene knockout in different age groups of these animal.

Keywords: gene *pttg*, liver, fibrosis, bilirubin, lactate dehydrogenase.

ОТДЕЛЬНЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СЫВОРОТКИ КРОВИ МЫШЕЙ С НОКАУТОМ ГЕНА *pttg*

А. П. Канюка¹, Е. З. Филяк², С. В. Афанасьев¹, Н. А. 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

Поражение печени любой этиологии сопровождается усилением фиброгенеза. Одним из ключевых генов, которые могут влиять на развитие фиброза печени, является ген *pttg* (Pituitary tumor transforming gene). Этот ген кодирует белок секурин, который играет важную роль в поддержании сестринских хроматид в ассоциированном состоянии в S-фазе клеточного цикла. Благодаря этому ген *pttg* участвует в регуляции таких ключевых для клетки событий, как митоз, репарация ДНК и апоптоз. Исследовалось влияние нокаута гена *pttg* на отдельные биохимические показатели сыворотки крови мышей, которые могут быть серологическими маркерами функционального состояния печени, а именно: установлено достоверное возрастание активности аспартат- и аланинаминотрансфераз в сыворотке крови мышей с нокаутом гена *pttg* во всех возрастных группах. Показано достоверное повышение активности лактатдегидрогеназы у мышей с нокаутом гена *pttg* в четырехмесячном возрасте. На основании выявленных изменений сделан вывод о том, что дефицит гена *pttg* предопределяет нарушение функционального состояния печени у мышей.

Ключевые слова: ген *pttg*, печень, фиброз, билирубин, лактатдегидрогеназа.

Одержано: 12.12.2011