

УДК 612-438.018-091.8:575.23.084]-092.9

А. І. Довгалюк

ДВНЗ “Тернопільський державний  
медичний університет  
імені І.Я. Горбачевського”ГІСТОЛОГІЧНИЙ СТАН ТИМУСА МИШЕЙ  
З ВІДСУТНІСТЮ ГЕНА *PTTG1***Ключові слова:** тимус, гістологічні  
зміни, нокаут гена *pttg***Резюме.** Проведено порівняльний гістологічний аналіз тимусів ювенільних мишей дикого типу (з повним набором генів) та з нокаутом гена *pttg1*. Встановлено збільшення площі кіркової речовини та зменшення щільності тимоцитів у мозковій речовині часточок цього органа в особин з делецією *pttg1*. Гіперплазія кіркової речовини часточок тимуса у нокаутних мишей може пояснюватись затримкою і/чи порушенням антигеннезалежної диференціації Т-лімфоцитів.**Вступ**

Білок PTTG, кодований онкогеном *pttg1* (pituitary tumor transforming gene), вперше виявлено у пухлинних клітинах гіпофіза щура [1], а згодом у багатьох інших ендокринних і неендокринних неоплазіях тварин і людини [2]. У клітинах внутрішніх органів у нормі він експресується у великій кількості тільки в сім'яниках і в тимусі ссавців [3, 4].

Для з'ясування фізіологічної ролі білка PTTG1 у нетрансформованих клітинах ссавців у нормі американськими вченими Медичного Центру “Синайський Кедр” (Лос Анджелес, США) виведено лінію мишей з нокаутом гена *pttg1* [3]. Відсутність даного гена не позбавляла мишей фертильності, однак спричиняла низку патологічних змін в їхньому організмі, зокрема призводила до тромбоцитопенії з нормальним рівнем мегакаріоцитів у червоному кістковому мозку [3], еритроцитопенії з підвищеним рівнем ретикулоцитів в крові, гіпохромної анемії [5]; збільшення маси тимусу та зменшення маси сім'яників і селезінки [3]. Наступними дослідженнями виявлено, що білок PTTG залучений в процесах активації Т-лімфоцитів [6], а нокаут гена *pttg1* призводить до низки функціональних порушень Т-лімфоцитів, включаючи пригнічення бласттрансформації, затримку проходження S-періоду клітинного циклу та зміну експресії цими клітинами як мінімум 18 різноманітних білків [7, 8]. Такі факти вказують на пошкодження ключових ланок імунного захисту в тварин із делецією гена *pttg1*, і дають можливість припустити розвиток у них аутоімунного стану, що недавно і було підтверджено групою львівських дослідників [9].

Тимус (загрудинна залоза) – центральний орган лімфопоезу – є осередком антигеннезалежного дозрівання Т-лімфоцитів. Встановлено, що у мишей з нокаутом гена *pttg1* збільшується маса даного органу [3]. Однак гістологічні зміни, що можуть виникати в тимусі мишей з відсутністю гена *pttg1* не вивчені.

**Мета дослідження**

Встановити відмінності мікроскопічного стану тимусу у мишей з нормальним генотипом і з нокаутом гена *pttg1*.

**Матеріал і методи**

Первинне стадо мишей лінії BL6/C57 дикого типу та з нокаутом гена було надано професору Ростиславу Стойці (Інститут біології клітини НАН України, Львів) доктором Шломо Мелмедом (Медичний Центр “Синайський Кедр”, Лос Анджелес, США), а проф. Стойка Р.С. і к.б.н. Філяк Є.З. надали імунні органи цих мишей для поглибленого гістологічного вивчення на кафедрі гістології Тернопільського медичного університету.

Для досліджень використано тимус 24 мишей віком 6-7 тижнів. Групу контрольних особин становили 10 мишей дикого типу (з немодифікованим генотипом) домінантних гомозигот за геном *pttg1* (PTTG1 +/+). 14 тварин були із нокаутом гена *pttg1* (PTTG1 -/-).

Евтаназію мишей здійснювали через передозування діетилового ефіру згідно міжнародних нормативів гуманного ставлення до лабораторних тварин, поданих у Директиві МОЗ України № 281 від 01.11.2000 року. Матеріал для гістологічного дослідження забирали відразу після декапітації тварин. Шматочки тимуса фіксували в 10 %-му розчині нейтрального формаліну впродовж 2 діб із наступним зневодненням в етанолі зростаючої концентрації від 50<sup>0</sup> до абсолютного. Проводку матеріалу здійснювали через етанол/ксилол у рівних кількостях; ксилол; ксилол/парафін у рівних частинах і заключали в парафін згідно загальноприйнятої гістологічної методики. Отримані на санному мікротомі серійні зрізи завтовшки 5 – 6 мкм фарбували гематоксиліном-еозинном. Гістологічні препарати вивчали методом світлової мікроскопії та морфометрії.

У тимусі визначали площу кіркової та мозкової речовини, а також щільність тимоцитів на одини-

цю площі 50x50 мкм<sup>2</sup>. Вимірювання морфометричних характеристик лімфоїдної тканини даних органів проводили за допомогою комп'ютерної системи цифрового аналізу зображень ВидеоТест-Размер5 (Санкт-Петербург, Росія). Зображення на монітор комп'ютера виводили з мікроскопу ЛОМО Биолам И за допомогою відео-камери Vision CCD Camera і програми InterVideoWinDVR. Всі отримані числові дані оброблені методом варіаційної статистики. Достовірною вважали вірогідність похибки менше 5% ( $p < 0,05$ ) [10].

### Обговорення результатів дослідження

Проведені гістологічні дослідження встановили, що тимус мишей 6-7 тижневого віку полігональної форми та складається з двох часток, які з'єднані між собою. Орган вкритий сполучнотканиною капсулою, від якої всередину відгалужуються тонкі, слабо виражені сполучнотканинні прошарки. Характерно те, що у тимусі мишей даного віку сполучнотканинні перегородки між часточками сформовані недостатньо (рис. 1).

Часточки тимуса мишей утворені лімфоїдною тканиною, яка в центральній частині органу не розмежована. У центрі переважаючої за площею інтенсивно базофільної кіркової речовини наявні невеликі світлі ділянки мозкової речовини. Наші спостереження узгоджуються з даними інших авторів про ранній постнатальний розвиток загрудинної залози у дрібних ссавців. Так, наприклад, показано, що для 2-місячних щурів характерні великі часточки, розділені тонкими неповними перегородками, у яких кіркова речовина переважає над мозковою [11].

Процес утворення часточок, формування сполучнотканинних перегородок, диференціації лімфоїдної тканини на кіркову та мозкову речовину інтенсивніше відбувається в тварин дикого типу (PTTG1+/+) (рис. 2).

Проведені морфометричні дослідження показали, що середнє значення загальної площі кіркової речовини в контрольних тварин складає (72,4±4,8)% від площі тимуса; відповідно, загальна площа мозкової речовини становить (27,6±3,3)% (рис. 3). Співвідношення мозкової речовини до кіркової дорівнює 1:2,6. У мишей із нокаутом гена *pttg1* (PTTG1<sup>-/-</sup>) кіркова речовина має більший об'єм (складає 82,2±5,1 % від загальної площі тимуса). Більш показовим є співвідношення мозкової речовини до кіркової, яке у нокаутних мишей становить 1:4,6.

Гіпертрофія тимуса мишей PTTG1<sup>-/-</sup>, що попередньо встановлена іншими дослідниками [3], найвірогідніше пов'язана із зростанням об'єму (гіперплазією) кіркової речовини. Про це свідчать результати наших досліджень.

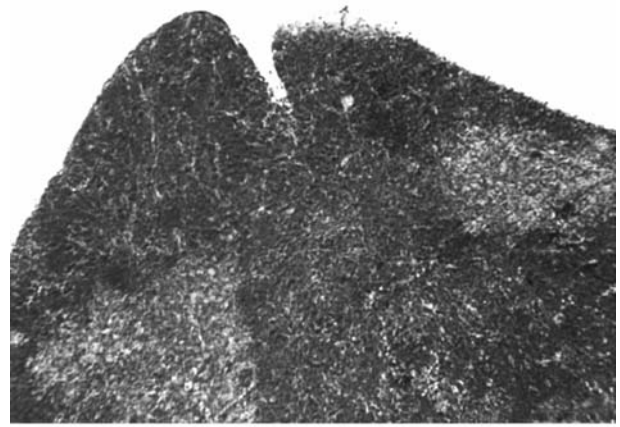


Рис. 1. Фрагмент двох часточок, що не розділені між собою сполучнотканинною перегородкою. Препарат тимуса миші з нокаутом гена *pttg1* (PTTG1<sup>-/-</sup>). Забарвлення гематоксилином-еозином. Збільшення x40

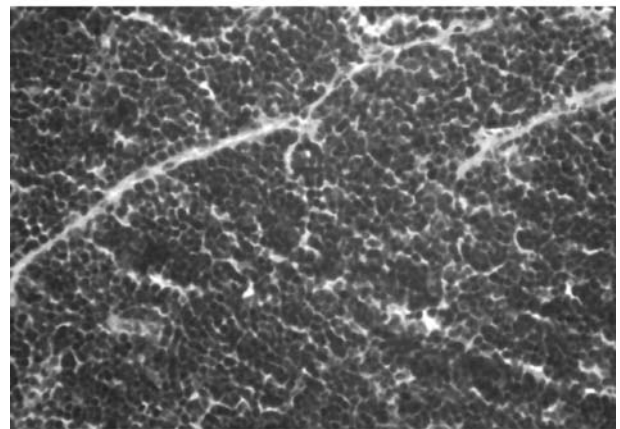
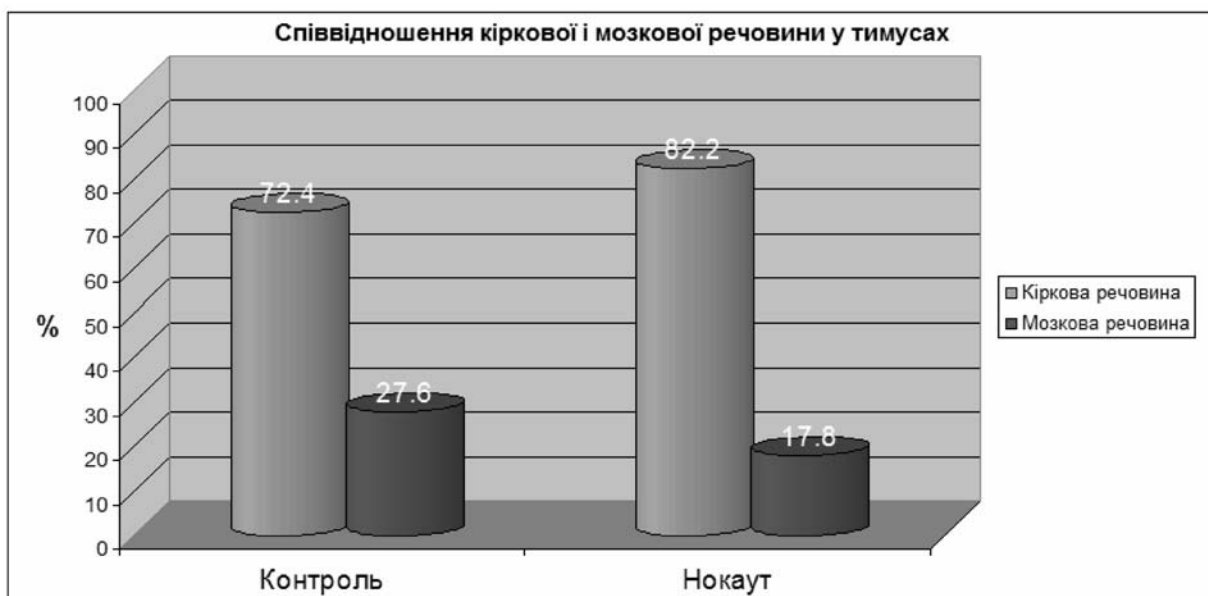


Рис. 2. Формування сполучнотканинних перегородок у паренхімі загрудинної залози. Препарат тимуса миші дикого типу (PTTG1<sup>+/+</sup>). Забарвлення гематоксилином-еозином. Збільшення x100

Значне переважання кіркової речовини над мозковою у тимусах особин PTTG1<sup>-/-</sup> може свідчити про затримку дозрівання Т-лімфоцитів, адже відомо, що у мозкову речовину виходять тільки зрілі тимоцити, що пройшли повну антигеннезалежну диференціацію та подвійну відбраковку макрофагами [12, 13].

Визначення щільності лімфоцитів у різних ділянках тимуса показало, що цей показник у кірковій речовині органу нокаутних і контрольних мишей відрізняється незначно і статистично недостовірно (рис. 4). У мозковій речовині встановлені певні відмінності. Так, у контрольній групі тварин середнє значення кількості тимоцитів на площі 2500 мкм<sup>2</sup> мозкової речовини становило 91,2 ± 2,1 (що на 28,2 % менше, ніж у кірковій речовині), тоді як у нокаутних організмів цей показник дорівнював 86,2 ± 1,8 (відповідно на 33,2 % менше за щільність лімфоцитів кіркової речовини). Така невелика, але статистично достовірна різниця ( $p = 0,044$ ) щільності Т-лімфоцитів у



**Рис. 3.** Співвідношення кіркової та мозкової речовини в тимусах мишей дикого типу (контроль) і з відсутністю гена *pttg1* (нокаут)



**Рис. 4.** Середня щільність лімфоцитів на площі 2500 мкм<sup>2</sup> кіркової та мозкової речовини в тимусах мишей дикого типу (контроль) і з відсутністю гена *pttg1* (нокаут)

мозковій речовині тимуса тварин із наявністю та відсутністю гена *pttg1* очевидно теж вказує на порушення дозрівання тимоцитів у периферійній частині часточок, і тому сповільнене їх надходження у мозкову, центральну, частину. Крім того і як наслідок цього, можливе зменшення інтенсивності рециркуляції Т-лімфоцитів в особин РТТG1-/-.

Тілець Гассала, які за класичними уявленнями накопичуються з віком і є критерієм інволюції тимусу, а за сучасними даними [11, 14] є індикаторами активності тимопоезу і, навпаки, чисельно зменшуються з віком, у більшості гістологічних препаратів нами не виявлено. Лише на окремих ділянках мозкової речовини загрудинної за-

лози нокаутних організмів спостерігаються скупчення великих стромальних клітин – епітеліоретикулоцитів (рис. 5), що може бути проявом раннього періоду формування тілець Гассала.

#### Висновки

Таким чином, проведені гістологічні та морфометричні дослідження тимуса ювенільних мишей нормального (дикого) генотипу та з нокаутом гена *pttg1* виявили морфологічні відмінності даного органу особин РТТG1-/- . Встановлено, що кількість кіркової речовини в таких мишей достовірно більша, ніж у контрольної групи, а щільність лімфоцитів у мозковій речовині –

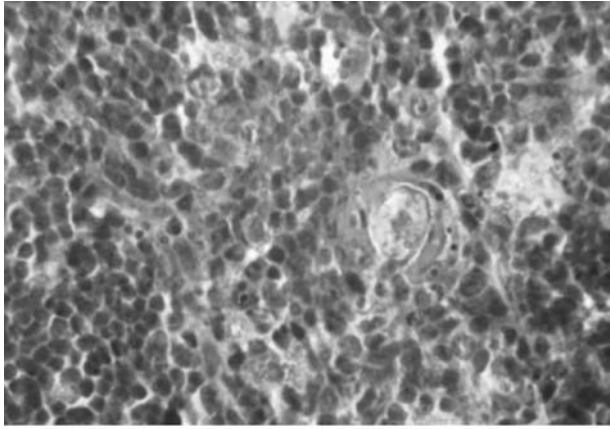


Рис. 5. Скупчення епітеліоретикулоцитів у мозковій речовині тимусу миші PTTG1<sup>-/-</sup>. Забарвлення гематоксилином-еозином. Збільшення  $\times 400$ .

менша. Це може свідчити як про затримку органогенезу тимусу, так і про порушення процесів дозрівання Т-лімфоцитів та/чи відбраковки їх макрофагами у кірковій речовині за відсутності генного продукту PTTG1.

#### Перспективи подальших досліджень

Наступний електронномікроскопічний аналіз часточок тимусу дозволить прояснити відмінності структурної організації паренхіми та строми органу за умови відсутності гена *pttg1*.

#### Подяки

Автор висловлює щирі вдячність професорові Стойці Ростиславу Степановичу та к.б.н. Філяку Євгену Зіновійовичу за надання мишей дикого і нокаутного типу з дефіцитом гена *pttg1*.

Роботу виконано за часткової підтримки Західно-Українського Біомедичного Дослідницького Центру.

**Література.** 1. Pei L. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG) / L. Pei, S. Melmed // *Mol. Endocrin.* – 1997. – Vol. 11. – P. 433–441. 2. Pituitary tumor-transforming gene in endocrine and other neoplasms: a review and update / F. Salehi, K. Kovacs, B.W. Scheithauer [et al.] // *Endocr. Relat. Cancer* – 2008. – Vol. 15, № 3. – P. 721 – 743. 3. Wang Z. Mice lacking pituitary tumor transforming gene show testicular and splenic hypoplasia, thymic hyperplasia, thrombocytopenia, aberrant cell cycle progression, and premature centromere division / Z. Wang, R. Yu, S. Melmed // *Mol. Endocrin.* – 2001. – Vol. 15. – P. 1870–1879. 4. Vlotides G. Pituitary tumor-transforming gene: physiology and implications for tumorigenesis / G. Vlotides, T. Eigler, S. Melmed // *Endocrine Reviews* – 2007. – Vol. 28, № 2. – P. 165–186. 5. Канюка О. Функціональний стан еритрону у мишей за умов нокауту гена *pttg* / О. Канюка, С. Філяк, Н. Сибірна // *Вісник Львівського університету. Серія біологічна* – 2011. Т. 56. – С. 22–27. 6. Stoika R. Expression and function of pituitary tumor transforming gene for T-lymphocyte activation / R. Stoika, R. Yu, S. Melmed // *British Journal of Hematology* – 2002. – Vol. 119. – P. 1070–1074. 7. Втрата гену білка секурину (PTTG) веде до пригнічення активації Т лімфоцитів / Є.З. Філяк, І.О. Держко, О.С. Філяк, Р.С. Стойка // *Медична хімія* – 2007. – Т. 1. – С. 101–104. 8. Протеоміка активації Т-лімфоцитів мишей, позбавлених гена *pttg* / Є.З. Філяк, О.С. Філяк, С.І. Сушельницький, Р.С. Стойка // *Доп. НАН України* – 2007. – Т. 5. – С. 172–179. 9. Афанасьєв С.В. Вплив дефіциту гена *pttg-1* на розвиток аутоімунних процесів у мишей / С.В. Афанасьєв, Є.З.

Філяк, Р.С. Стойка // *Біологічні студії*. – 2011. – Т. 5, № 2. – С. 29–36. 10. Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии / Г.Г. Автандилов – М. : Медицина, 2002. – 240 с. 11. Бутенко Г.М. Возрастные морфофункциональные изменения тимуса при пинеалектомии / Г.М. Бутенко, Т.Ю. Квитницкая-Рыжова, С.П. Мальшева // *Журнал АМН Украины* – 2005. – Т. 11, № 4. – С. 797–807. 12. Биби́к Е.Ю. Современные представления о морфогенезе первичного лимфоидного органа / Е.Ю. Биби́к, А.Ю. Берест // *Український морфологічний альманах*. – 2011. – Т. 9, № 3. – С. 43–46. 13. Pearse G. Normal Structure, Function and Histology of the Thymus / G. Pearse // *Toxicol Pathol.* – 2006. – Vol. 34, № 5. – P. 504–514. 14. Structural heterogeneity and immunohistochemical profile of Hassall corpuscles in normal human thymus / M. Raica, S. Encic, A. Motoc [et al.] // *Ann Anat.* – 2006. – Vol. 188 № 4. – P. 345–352.

#### ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ ТИМУСА МЫШЕЙ С ОТСУТСТВИЕМ ГЕНА *PTTG1*

А.И.Довгалюк

**Резюме.** Проведен сравнительный гистологический анализ тимуса ювенильных мышей дикого типа (с полным набором генов) и с нокаутом гена *pttg1*. Установлено увеличение площади коркового вещества и уменьшение плотности тимоцитов в мозговом веществе долек этого органа в особой из делеций *pttg1*. Гиперплазия коркового вещества долек тимуса в нокаутных мышей может объясняться задержкой и/или нарушением антигеннезависимой дифференциации Т-лимфоцитов.

**Ключевые слова:** тимус, гистологические изменения, нокаут гена *pttg*

#### HISTOLOGICAL STATE OF THYMUS IN MICE LACKING GENE *PTTG1*

A.I.Dovgalyuk

**Introduction.** Oncogene *pttg1* is overexpressed in most of mammalian tumor cells, and its protein product PTTG1 is abundant only in normal thymic and testicular cells. In mice with knockout of this gene, an increase in weight of the thymus, some functional impairment of T-lymphocytes and development of autoimmune state were revealed. **The aim** of this investigation - to establish microstructural changes that occur in the thymus of animals without the gene *pttg1*. **Material and methods.** 24 mice of BL6/C57 line were used for the research (10 animals – the dominant homozygotes for the gene *pttg1* – constituted the control group and 14 individuals with *pttg1* knockout formed test group). All animals were 7 weeks of age. Histological preparations of thymus were studied by light microscopic and morphometric methods. **Results.** *pttg1* gene deletion leads to changes in the medulla/cortex area ratio in the thymic lobules. Thus, this parameter was 1:2,6 in the control group and 1:4,6 in the knockout group. Also statistically significant decrease of the T-lymphocyte density in the thymic medulla in the mice without the *pttg1* gene was found. The cortex hyperplasia and reduction of thymocytes in the medulla could be explained by delayed and/or disturbed antigen-independent differentiation of T-lymphocytes in the knockout animals' thymus. **Conclusions.** Obtained data indirectly suggest the involvement of protein PTTG1, the product of *pttg1* gene expression, in the thymus organogenesis and maturation of T-lymphocytes. **Prospects for further research.** Next electron microscopic analysis of the thymic lobules will clarify the structural differences of the organ parenchyma and stroma in the *pttg1* gene knockout mice.

**Keywords:** thymus, histological changes, gene knockout *pttg1*.

SHEE “Ternopil State Medical University named after I. Gorbachevsky”

*Clin. and experim. pathol.* - 2013. - Vol. 12, №3 (45). - P.66-69.

Надійшла до редакції 03.09.2013

Рецензент – проф. С.С.Ткачук

© А. І. Довгалюк, 2013