

Получена: 05.02.2024/Принята: 01.03.2024/Опубликована online: 30.03.2024

УДК 616-021.4:616.94-07:615.777.9

DOI: [10.26212/2227-1937.2024.65.79.022](https://doi.org/10.26212/2227-1937.2024.65.79.022)

Токушева А.Н.¹, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1590-3021>
Балабекова М.К.¹, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3238-9893>
Sulev Kōks², ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6087-6643>

¹Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова, Алматы, Казахстан

²Институт будущего здоровья Университета Мердока, Перт, Австралия

АНАЛИЗ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ЛИМФООРГАНАХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ КРЫС

Резюме: работа выполнена с целью оценки экспрессионной активности тканеспецифичных генов-регуляторов воспаления, вызванного на фоне металлиндуцированной иммунодепрессии. В настоящей работе проведен транскриптомный анализ тканеспецифичных генов, проведен биоинформатический анализ полученных результатов. Эксперименты выполнены на 54 белых крысах-самцах массой 180-220 г., проведены 4 серии экспериментов. У опытных животных интоксикацию солями металлов вызывали введением ванадата аммония и бихроматом калия в дозе по 5 мг/кг м.т. перорально в течение двух недель. По окончании двухнедельной затравки ВА и БК у животных вызывали асептическое воспаление. Было установлено, что соединения металлов вызывают нарушения сигнальных и метаболических путей. Так, металлы активируют гены, вовлеченные в клеточный цикл, в сравниваемых группах: АВ против Ме/АВ и АВ против Ме. На основании проведенного биоинформатического анализа сделаны следующие выводы: наиболее значительные изменения дифференциальной экспрессии генов обнаружены в тимусе; металлы систематически повышают гены клеточного цикла в тимусе; метаболические пути, регулирующие иммунитет, подавляются под влиянием металлов и оцениваются как иммуносупрессивный эффект; В-клетки также подвержены иммуносупрессивному эффекту металлов.

Ключевые слова: тяжелые металлы, ванадий, хром, асептическое воспаление, эксперимент, экспрессия генов, транскриптомный анализ, крысы.

Токушева А.Н.¹, Балабекова М.К.¹, Sulev Kōks²

¹С.Ж. Асфендияров атындағы Қазақ ұлттық медицина университеті, Алматы, Қазақстан

²Мердок университетінің денсаулық болашағы институты, Перт, Австралия

ТӘЖІРИБЕЛІК ЕГЕУҚҰЙРЫҚТАРДЫҢ ЛИМФОМУШЕЛЕРІНДЕГІ ГЕНДЕРДІҢ ДИФФЕРЕНЦИАЛДЫ ЭКСПРЕССИЯСЫН ТАЛДАУ

Түйін: металлиндукциялық иммуносупрессиядан туындаған қабынудың реттегіш-гендердің экспрессиялық белсенділігін бағалау мақсатында жұмыс жүргізілді. Бұл жұмыста тінге тән гендердің транскриптомиалық талдауы жүргізіліп, нәтижелеріне биоинформатикалық талдау жүргізілді. Тәжірибелер салмағы 180-220 г. 54 ақ аталық егеуқұйрықтарға жүргізілді, 4 тәжірибе сериясы атқарылды. Тәжірибелік жануарларға металл тұздарымен улану екі апта бойы пероральді түрде аммоний ванадатын және калий бихроматын 5 мг/кг дозада енгізуден туындаған. Екі апталық улану соңында АВ және КБ жануарларда асептикалық қабынуды тудырды. Металл қосылыстары сигнал беру және метаболикалық жолдардағы бұзылыстарды тудыратыны анықталды. Осылайша, металдар салыстырмалы топтарда жасушалық циклге қатысатын гендерді белсендіреді: АҚ қарсы Ме/АҚ және АҚ қарсы Ме. Биоинформатикалық талдау негізінде келесі қорытындылар жасалды: гендердің дифференциалды экспрессиясының маңызды өзгерістері тимуста анықталды; металдар тимустағы жасушалық цикл гендерін жүйелі түрде арттырады; иммунитетті реттейтін метаболикалық жолдар металдармен басылады және иммуносупрессивті әсер ретінде бағаланады; В жасушалары металдардың иммуносупрессиялық әсеріне де сезімтал.

Түйінді сөздер: ауыр металдар, ванадий, хром, асептикалық қабыну, эксперимент, ген экспрессиясы, транскриптомдық талдау, егеуқұйрықтар.

A.N. Tokusheva¹, M.K. Balabekova¹, Sulev Kōks²

¹Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Almaty, Kazakhstan

²Murdoch University Health Futures Institute, Perth, Australia

ANALYSIS OF DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION IN LYMPH ORGANS OF EXPERIMENTAL RATS

Resume: the work was carried out to assess the expression activity of tissue-specific genes-regulators of inflammation caused by metal-induced immunosuppression. In this work, a transcriptomic analysis of tissue-specific genes was carried out, and a bioinformatics analysis of the results was carried out. The experiments were performed on 54 white male rats weighing 180-220 g., 4 series of experiments were conducted. In experimental animals, intoxication with metal salts was caused by the administration of ammonium vanadate and potassium bichromate at a dose of 5 mg/kg b.w. orally for two weeks. At the end of a two-week priming, AV and PB induced aseptic inflammation in the animals. Metal compounds have been found to cause disturbances in signaling and metabolic pathways. Thus, metals activate genes involved in the cell cycle in the compared groups: AI versus Me/AI and AI versus Me. Based on the bioinformatics analysis, the following conclusions were made: the most significant changes in differential gene expression were found in the thymus; metals systematically increase cell cycle genes in the thymus; metabolic pathways that regulate immunity are suppressed by metals and are assessed as an immunosuppressive effect; B-cells are also susceptible to the immunosuppressive effects of metals.

Key words: heavy metals, vanadium, chromium, aseptic inflammation, experiment, gene expression, transcriptomic analysis, rats.

Введение: Воздействие тяжелых металлов известно своей токсичностью, которая проявляется даже при низких концентрациях и может привести к изменению генной экспрессии. Эти изменения могут потенциально увеличить восприимчивость к различным заболеваниям [1,2]. Тяжелые металлы значительно изменяют экспрессионный профиль генов. Ученые обнаружили, что тяжелые металлы могут влиять не только на гены, прямо связанные с метаболизмом тяжелых металлов и репарацией ДНК, но также на гены, участвующие в процессе детоксикации.

Регуляция экспрессии генов является фундаментальным процессом, который подвержен динамическим изменениям под воздействием как внешних, так и внутренних факторов. Одной из ключевых особенностей всех живых организмов является способность модулировать экспрессию своих генов, что обусловлено необходимостью адаптации к постоянно меняющимся сигналам окружающей среды и регулирования состава белков в клетке [3-5].

В изменчивой окружающей среде адаптация организма к внешним стимулам может привести к изменениям в экспрессии многих генов. Длительность активации транскрипции зависит от силы стимула или стрессорного воздействия [6,7]. Недавние исследования указывают на дозозависимую динамику ответов при непрерывном увеличении стимуляции [8].

В наших исследованиях мы применили подход, основанный на изучении транскриптома клеток, специфичных для определенных тканей. Анализ транскриптома позволит выявить гены, ответственные за различные уровни активации иммунной системы. Для установления причинно-следственных связей между экспрессией мРНК соответствующих генов и изменением активации отдельных компонентов иммунитета необходимо изучение экспрессии генов на уровне функциональной активности всего генома, а не только отдельных групп генов.

Воспалительные процессы сопровождаются выработкой множества факторов, и изменения в экспрессии генов могут предсказывать их ход на различных стадиях воспалительных заболеваний [9-11].

Слияние биоинформатики с экспериментальной геномикой открывает путь к многочисленным прорывам, которые могут привести к радикальным изменениям. Эти изменения могут включать в себя увеличение устойчивости организма к определенным заболеваниям и патогенам, снижение расходов на лечение благодаря повышению эффективности терапии и предотвращению рецидивов заболеваний. Анализ транскриптома предоставляет возможность определить активные клеточные процессы в конкретный момент времени, выявив уровень экспрессии генов в изучаемом объекте, будь то культура клеток или ткань. В человеческом организме содержится примерно 20,000-25,000 генов, кодирующих белки. Профиль экспрессии генов может значительно различаться в различных тканях и в зависимости от физиологического состояния

организма. Результаты такого анализа позволяют наглядно идентифицировать гены, которые находятся в активном состоянии в изучаемой культуре клеток или ткани.

Поэтому исследования в этом направлении не ограничиваются только изучением иммунной системы, так как в развитии иммунных расстройств и вторичных иммунодефицитных состояний играет существенную роль дисбаланс экспрессии генов-регуляторов, управляющих врожденным и адаптивным иммунитетом. Это создает трудности при коррекции обнаруженных нарушений и выборе наиболее эффективной лекарственной терапии.

Цель исследования: На основе проведенного транскриптомного анализа установить экспрессионную активность тканеспецифичных генов-регуляторов воспаления, вызванного на фоне металл-индуцированной иммунодепрессии.

Методы исследования: Эксперименты выполнены на 54 белых крысах-самцах массой 180-220 г, содержавшихся в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе. Проведены 4 серии экспериментов: 1 серия – контрольные животные (К); 2 серия – асептическое воспаление у контрольных животных (АВ). Асептическое воспаление вызывали путем подкожного введения 0,3 мл скипидара на вазелиновом масле в межлопаточную область [12]; 3 серия – группа Ме: животные с интоксикацией металлами (Ме): ванадатом аммония (ВА) и бихроматом калия (БК); 4 серия – группа АВ/Ме: животные с воспалением на фоне интоксикации металлами (Ме): ванадатом аммония (ВА) и бихроматом калия (БК). У опытных животных интоксикацию солями металлов вызывали введением ВА и БК в дозе по 5 мг/кг м.т. перорально в течение двух недель. По окончании двухнедельной затравки ВА и БК у животных вызывали асептическое воспаление [13]. Контрольные животные получали равный объем 0,9% раствора NaCl.

Все исследования проводились после процедуры рассмотрения и заключения локального этического комитета Казахского национального медицинского университета им. С.Д. Асфендиярова (заявка, регистрационный №166, протокол № 3 от 01.04.2015). Животных выводили из эксперимента под анестезией Золетил-Ксилазином, производили забор органов.

Для проведения транскриптомного анализа были подготовлены следующие образцы тканей: тимус, селезенка, лимфатический узел, ткань воспаления, костный мозг.

Для каждого условия были проведены прогоны на платформе MiSeq. Всего было использовано 20 проб (по 5 проб для каждого из 5 органов и 4 групп условий), а также проведено 5 прогонов в целом.

Статистический анализ. Для выравнивания данных RNA-seq транскриптома ENCODE использовалось программное обеспечение Spliced Transcripts Alignment to Reference (STAR) [14].

Контроль качества необработанных данных последовательности, полученных с высокопроизводительных платформ, проводился с помощью программы FastQC, доступной по адресу

<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.

Для количественного определения транскриптов из данных RNA-seq применялся программный пакет RSEM [15].

Для визуализации результатов использовался интегративный геномный анализатор (IGV) – мощный инструмент визуализации, предназначенный для интерактивного анализа обширных наборов геномных данных. Он

поддерживает различные типы данных, включая массивы и последовательности, а также геномные аннотации [16].

Оценка дифференциальной экспрессии генов проводилась с использованием пакета DESeq2 [17].

Результаты и обсуждение: Были проанализированы 9 сравнений, и только в случае тимуса были обнаружены стабильные различия в экспрессии генов на уровне генома.

Таблица 1 - Различия экспрессии на геномном уровне между группами

Tissue	Condition 1	Condition 2	Upregulated genes (FDR 10%)	Downregulated genes (FDR 10%)
Thymus	inflammation	metal+inflammation	1181	937
Thymus	inflammation	metal	13	167

В результате проведенного биоинформатического анализа были идентифицированы 20 белкокодирующих генов: Tnfrsf14, Cr2, Sp3, Stag2, H3f3a, Dpp4, Anp32a, Prpf40a, Hsp90aa1, Tardbp, Dnaja1, Eef2k, Mfge8, Macf1, Arhgef11, Txndc5, Srrm2, Syk, Clu, Cd19.

Дальнейшая задача заключалась в исследовании полученных результатов в контексте сигнальных и

метаболических путей. Для этого анализа использовалась база данных MsigDB с помощью программного обеспечения GSEA. Чтобы присвоить генам аннотации геной онтологии (GO) и пути KEGG, файлы онтологии генов и аннотаций путей (.gaf2) были получены из баз данных KEGG. Количество генов с онтологией генов и аннотациями путей указано в таблице 2.

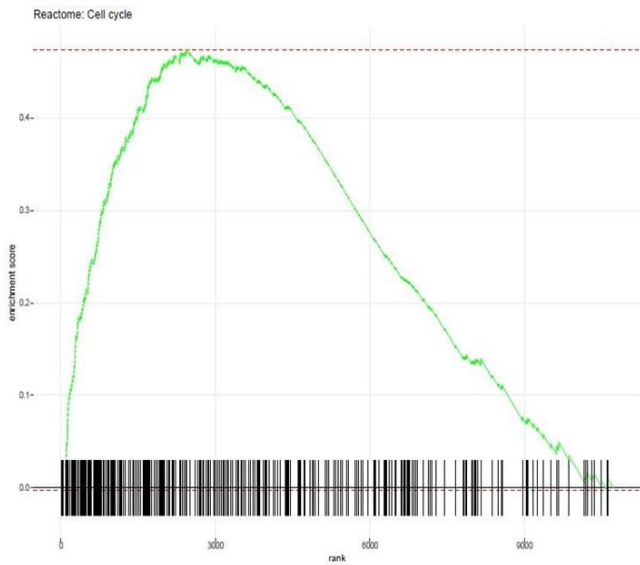
Таблица 2 - Общее количество генов с онтологией генов и аннотациями пути KEGG

Категория аннотации	Генная онтология			
	Биологический процесс	канонические пути	Hallmark	KEGG
Количество аннотированных генов	11875	4188	84	41

Благодаря анализу метаболических и сигнальных путей, в которых участвуют гены, обнаруженные в образцах тимуса крыс, были выявлены значительные изменения в функционировании врожденного и адаптивного иммунитета.

На основе проведенного анализа генных модулей с использованием базы данных MSigDB и анализа геномного обогащения (GSEA) было установлено, что соединения металлов вызывают нарушения сигнальных и метаболических путей. Так, металлы активируют гены, вовлеченные в клеточный цикл, в сравниваемых группах: АВ против Me/AB и АВ против Me (рисунок 1).

Inflammation vs Metal+Inflammation



Inflammation vs Metal

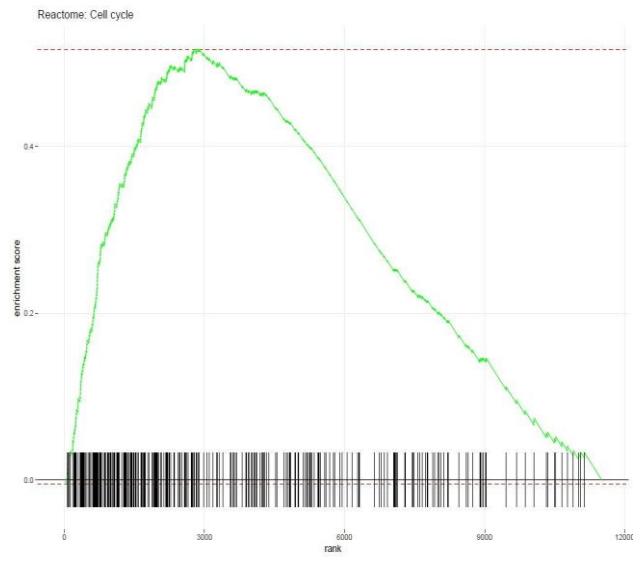


Рисунок 1 - Гены, вовлеченные в клеточный цикл, регулируемые металлами

В результате проведенных исследований были выявлены гены с дифференциальной экспрессией средней силы (как повышенной, так и пониженной) в тимусе, которые регулировались дифференциально. Среди всех исследованных тканей наиболее явные различия в ответе на различные стимулы (металл, воспаление или их комбинация) были выявлены именно в тимусе. Для анализа функциональных аннотаций, связанных с воспалением, мы использовали термины генных онтологий (GO) биологического процесса, пути KEGG и базу данных Hallmark. Только в кластере "Canonical pathways" собрались гены с увеличенной экспрессией, связанные с иммунной системой и адаптивным

иммунным ответом. Однако остальные кластеры, представленные выше, объединили значительно большее количество генов, которые характеризуют состояние иммунной системы как иммуносупрессивное. Как ожидалось, в ответ на воспаление активизировались иммунные и противовоспалительные реакции у животных из группы с АВ, в то время как чистая иммуносупрессия, вероятно, описывает функциональное состояние иммунной системы у животных группы Me/AB (рисунок 2). Статистически значимые различия сравниваемых групп АВ и Me/AB представлены на рисунке 2.

GSEA plots

- below are examples of 1) up- 2) down- 3) not regulated pathways

up-regulated

down-regulated

not regulated

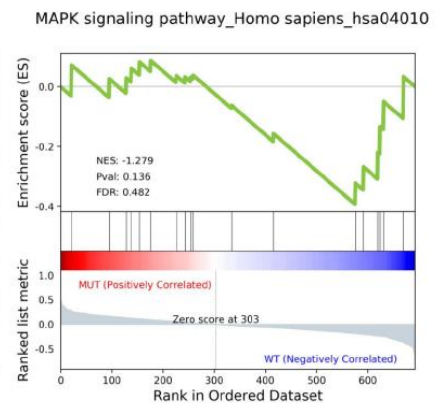
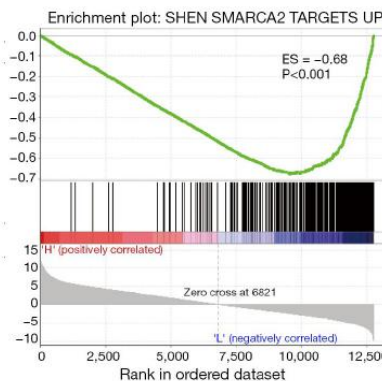
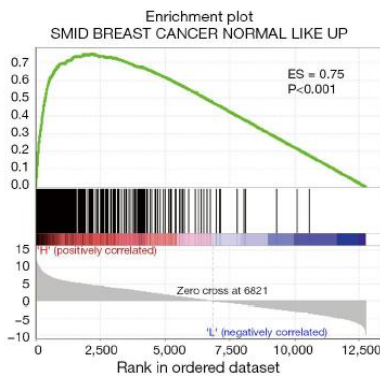


Рисунок 2 - Уровни значимости положительно и отрицательно регулируемых генных подмножеств.

Выводы:

На основании проведенного биоинформатического анализа можно сделать следующие выводы:

- наиболее значительные изменения дифференциальной экспрессии генов обнаружены в тимусе;
- металлы систематически повышают гены клеточного цикла в тимусе;
- метаболические пути, регулирующие иммунитет, подавляются под влиянием металлов и оцениваются как иммуносупрессивный эффект;
- В-клетки также подвержены иммуносупрессивному эффекту металлов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES:

1. Hodgson S., Nieuwenhuijsen M.J., Elliott P., Jarup L. Kidney disease mortality and environmental exposure to mercury. *American Journal of epidemiology*. 2007;165(1):72–77
2. Wang Z., Chai L., Yang Z., Wang Y., Wang H. Identifying sources and assessing potential risk of heavy metals in soils from direct exposure to children in a mine-impacted city, Changsha, China. *Journal of Environmental Quality*. 2010;39(5):1616–1623
3. Murray JI, Whitfield ML, Trinklein ND, Myers RM, Brown PO, Botstein D. Diverse and specific gene expression responses to stress in cultured human cells. *Mol. Biol. Cell*. 2004;15:2361–2374. doi: 10.1091/mbc.e03-11-0799.
4. Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O., Eisen MB, Storz G., Botstein D., Brown PO Genomic expression programs in yeast cell response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell*. 2000;11:4241–4257. doi: 10.1091/mbc.11.12.4241.
5. Ben-Tabu de-Leon S., Davidson E.H. Gene regulation: a gene control network in development. *Anna. Reverend Biophys. biomol. Structure* 2007; 36:191–212. doi: 10.1146/annurev.biophys.35.040405.102002.
6. Rienzo A., Pascual-Ahuir A., Proft M. The use of a real-time luciferase assay to quantify gene expression dynamics in the living yeast cell. *Yeast*. 2012;29:219–231. doi: 10.1002/yea.2905.
7. Dolz-Edo L., Rienzo A., Poveda-Huertes D., Pascual-Ahuir A., Proft M. Deciphering dynamic dose responses of natural promoters and single cis elements upon osmotic and oxidative stress in yeast. *Mol. Cell. Biol*. 2013;33:2228–2240. doi: 10.1128/MCB.00240-13.
8. Pascual-Ahuir A., González-Cantó E., Juyoux P., Pable J., Poveda-Huertes D., Saiz-Balbastre S., Squeo S., Ureña-Marco A., Vanacloig-Pedros E., Zaragoza-Infante L., et al. Dose dependent gene expression is dynamically modulated by the history, physiology and age of yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta Gene Reg. Mech*. 2019;1862 :457–471. doi: 10.1016/j.bbagr.2019.02.009.
9. van Baarsen LG, Wijbrandts CA, Timmer TC, van der Pouw Kraan TC, Tak PP, Verweij CL. Synovial tissue heterogeneity in rheumatoid arthritis in relation to disease activity and biomarkers in peripheral blood. *Arthritis Rheum*. 2010;62:1602–1607
10. Yun-Yong Park, Eun Sung Park, Sang Bae Kim et al. Development and Validation of a Prognostic Gene-Expression Signature for Lung Adenocarcinoma. *PLoS One*. 2012; 7(9): e44225
11. Ayca Cankorur-Cetinkaya, Elif Dereli, Serpil Eraslan et al. A Novel Strategy for Selection and Validation of Reference Genes in Dynamic Multidimensional Experimental Design in Yeast. *PLoS One*. 2012;7(6): e38351
12. Sutunkova, M.P., Ryabova, Y.V., Minigalieva, I.A. et al. Features of the response to subchronic low-dose exposure to copper oxide nanoparticles in rats. *Sci Rep* 2023;13:11890. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38976-z>.
13. Kalra R, Singh SP, Pena-Philippides JC, Langley RJ, Razani-Boroujerdi S, Sopor ML. Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of nicotine administered by patch in an animal model. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004 May;11(3):563-8. doi: 10.1128/CDLI.11.3.563-568.2004. PMID: 15138183; PMCID: PMC404586.
14. Alexander Dobin Carrie A. Davis Felix Schlesinger Jorg Drenkow Chris Zaleski Sonali Jha Philippe Batut Mark Chaisson Thomas R. Gingeras. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 2013;29(1):15–21, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
15. Bo Li and Colin N Dewey. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*. 2011;12:323. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>
16. James T Robinson, Helga Thorvaldsdóttir, Wendy Winckler. Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology*. 2011;29:24–26. doi:10.1038/nbt.1754
17. Michael I Love, Wolfgang Huber and Simon Anders. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*. 2014;15:550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.

Вклад авторов: Все авторы принимали равносильное участие при написании данной статьи

Конфликт интересов – не заявлен.

Данный материал не был заявлен ранее, для публикации в других изданиях и не находится на рассмотрении другими издательствами. При проведении данной работы не было финансирования сторонними организациями и медицинскими представительствами. Финансирование – не проводилось.

Авторлардың үлесі. Барлық авторлар осы мақаланы жазуға тең дәрежеде қатысты.

Мүдделер қақтығысы – мәлімделген жоқ. Бұл материал басқа басылымдарда жариялау үшін бұрын мәлімделмеген және басқа басылымдардың қарауына ұсынылмаған. Осы жұмысты жүргізу кезінде сыртқы ұйымдар мен медициналық өкілдіктердің қаржыландыруы жасалған жоқ. Қаржыландыру жүргізілмеді.

Authors' Contributions. All authors participated equally in the writing of this article.

No conflicts of interest have been declared. This material has not been previously submitted for publication in other publications and is not under consideration by other publishers. There was no third-party funding or medical representation in the conduct of this work. Funding - no funding was provided.

Сведения об авторах:

№	ФИО (полностью)	Должность, место работы	Телефон	Эл.почта
1	Токушева Алия Нурлановна	Докторант кафедры патологической физиологии Казахского Национального Медицинского Университета имени С.Д. Асфендиярова, автор-корреспондент	87019829242	aliyatokusheva88@gmail.com
2	Балабекова Марина Казыбаевна	Заведующий кафедрой патологической физиологии Казахского Национального Медицинского Университета имени С.Д. Асфендиярова	87074402502	balabekova.m@kaznmu.kz
3	Sulev Kōks	Профессор Центра молекулярной медицины и инновационной терапии Института будущего здоровья Университета Мердока	+61437022212	sulevkoks@me.com