

Изменение транскриптома гиппокампа неонатальных крыс после введения синтетического глюкокортикоида дексаметазона

Ланшаков Д.^{1, 2*}, Сборщикова А.^{1, 2}, Сухарева Е.¹, Булыгина В.¹, Калинина Т.^{1, 2}

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

* lanshakov@bionet.nsc.ru

Ключевые слова: глюкокортикоиды; гиппокамп; неонатальный период; транскриптом

Мотивация и цель: Глюкокортикоиды – гормоны стресса – являются одними из важнейших факторов, влияющих в перинатальный период на развитие головного мозга млекопитающих. В перинатальной медицине препараты глюкокортикоидов используются для предотвращения осложнений, связанных с преждевременными родами, для ускорения выработки сурфактанта легкими. Такая терапия, назначаемая по жизненным показаниям, имеет долговременные осложнения, связанные как с общим физиологическим развитием, так и развитием ЦНС, когнитивных способностей и памяти. Целью исследования было выявить возможные гены-мишени, вовлеченные в этот процесс.

Методы и алгоритмы: Для этого нами были исследованы изменения транскриптома гиппокампа неонатальных крыс через 6 ч после введения синтетического глюкокортикоида дексаметазона в дозе 0.2 мг/кг веса тела на второй день жизни P2, день родов считали нулевым днем P0. Контрольная группа получала инъекцию такого же объема физиологического раствора. Методом массового параллельного секвенирования транскриптома (100M парных прочтений на платформе Illumina) было выявлено изменение экспрессии основных генов-мишеней. Технические последовательности обрезались при помощи программы Триммоматик. Риды выравнивались на референсный геном крысы mRatBN7.2 при помощи картировщика hisat2. Для подсчета ридов, приходящихся на кодирующую часть генов, использовали программу Rsubread. Дифференциально экспрессированные гены определяли при помощи пакета edgeR. Функциональную аннотацию проводили при помощи пакета clusterProfiler.

Результаты: Так, выбрав дифференциально экспрессированные гены $|\log FC| > 1$ $p_{adj} < 0.05$ (с поправкой на множественность сравнений Бенджамини–Хохберга), изменили экспрессию 57 генов: 46 увеличили, 11 снизили экспрессию (рис. 1, А). Гены, чья экспрессия увеличилась, принадлежали к таким разделам «Биологические процессы» классификации Генной Онтологии (GO): клеточный ответ на глюкокортикоидный стимул, клеточный ответ на кортикостероидный стимул – что естественно при интенсификации глюкокортикоидного сигналинга (см. рис. 1, В). Также были выявлены следующие категории: эйкозаноид метаболитические процессы, детоксификация, стрессовый ответ на ионы металлов, клеточный ответ на ионы цинка (см. рис. 1, С). Гены, снизившие экспрессию, показали обогащение среди следующих категорий Генной Онтологии: клеточный ответ на липополисахарид, клеточный ответ на молекулы бактериальной природы,

клеточный ответ на биотические стимулы, позитивная регуляция пролиферации NK-клеток в ответ на LPS, дегрануляция NK-клеток.

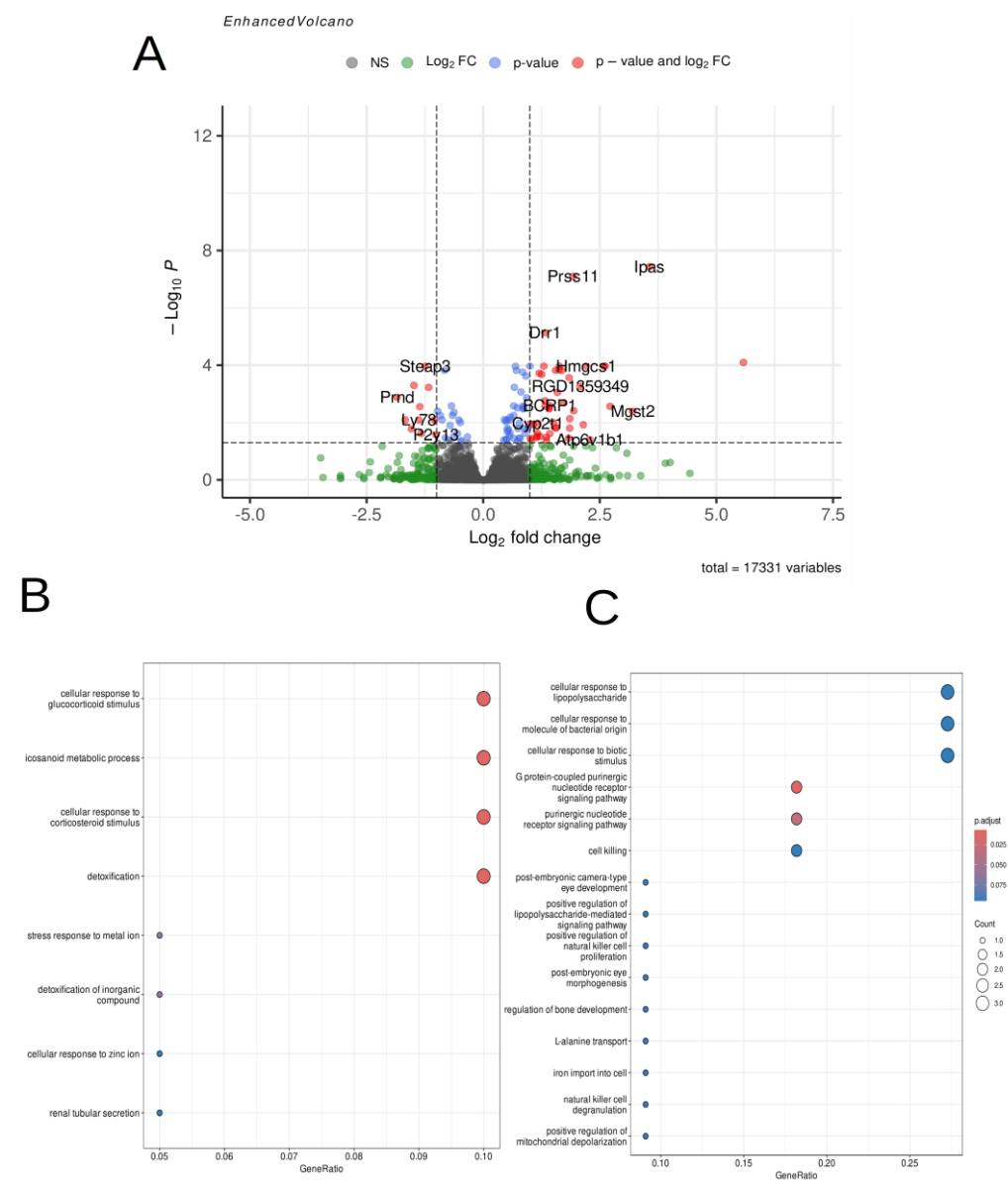


Рис. 1. Характеризация транскриптомных изменений в гиппокампе двухдневных крыс через 6 ч после введения дексаметазона 0.2 мг/кг подкожно. А – вулcano плот, показывающий дифференциально экспрессирующиеся гены, красным отмечены гены интереса $|\log_2FC| > 1$ & $p_{adj}(BH) < 0.05$; В – функциональная аннотация и обогащение по GO «Биологические процессы» генов, увеличивших экспрессию; С – функциональная аннотация и обогащение по GO «Биологические процессы» генов, снизивших экспрессию

Данные категории в первую очередь связаны с действием глюкокортикоидов на иммунные клетки и резидентные макрофаги мозга клетки микроглии. Стоит отметить, что среди ГО категорий также были: сигнальный путь пуриnergических нуклеотидных рецепторов, связанных с G-белками, транспорт L-аланина, импорт железа в клетку, позитивная регуляция деполяризации митохондрий. Среди генов, которые повысили свою экспрессию, были Фактор, Индуцируемый Гипоксией, 3A (Hif3a) $\log FC = 3.56$, который может регулировать плюрипотентность и пролиферацию эмбриональных стволовых клеток [1]. Также экспрессия серотонинового рецептора 1A (Htr1a) была повышена $\log FC = 1.93$. Это может быть компенсаторным эффектом снижения экспрессии Trh2 в среднем мозге и серотонина в передних отделах после введения дексаметазона [2]. Ранее нами было показано, что однократная инъекция на второй день жизни крыс приводит к уменьшению тревожного и депрессивно-подобного поведения на 60-й день жизни [3]. Это может объясняться одновременной интенсификацией норадренергической нейротрансмиссии [4] и снижением серотонинергической нейротрансмиссии [2], что приводит к данному поведенческому фенотипу. Схожие эффекты на поведение наблюдаются при снижении серотониновой нейротрансмиссии в неонатальный период [5]. Несмотря на выраженную супрессию иммунной функции, по результатам обогащения ГО, после введения дексаметазона, были повышены Интерлейкин-33 IL-33 $\log FC = 1.59$ и Маннозный рецептор C-типа 1 (Mrc1) $\log FC = 1.30$. Эти гены являются маркерами M2 микроглии, которая запускает тканевую реорганизацию и регенерацию, увеличивает фагоцитоз и играет нейропротективную роль [6]. Среди генов, снизивших свою экспрессию, стоит отметить второй рецептор васкулярного эндотелиального ростового фактора Kdr $\log FC = -1.04$, который ответственен за рост аксонов в ответ на Семафорин 3Е (Sema3E) [7].

Выводы: Таким образом, помимо выявленных классических эффектов дексаметазона на экспрессию генов иммунной системы, возможными генами-мишенями для изучения негативных эффектов глюкокортикоидов на развитие нервной системы являются Hif3a, Htr1a, Kdr. Показанное нами ранее снижение тревожного и депрессивно-подобного поведения на 60-й день жизни крыс после однократной инъекции дексаметазона на P2 может объясняться одновременной интенсификацией норадренергической нейротрансмиссии и снижением серотонинергической нейротрансмиссии.

Финансирование: Исследование поддержано бюджетным проектом FWNR-2023-0002.

Alteration of the hippocampal transcriptome in neonatal rats after administration of the synthetic glucocorticoid dexamethasone

Lanshakov D.^{1, 2*}, Sborshchikova A.^{1, 2}, Sukhareva E.¹, Bulygina V.¹, Kalinina T.^{1, 2}

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

* lanshakov@bionet.nsc.ru

Key words: glucocorticoids; hippocampus; neonatal period; transcriptome

Motivation and Aim: Glucocorticoids, stress hormones, are one of the most important factors affecting the development of the mammalian brain during the perinatal period. In perinatal medicine, Glucocorticoid medications are used to prevent complications associated with premature birth, to accelerate the production of surfactant by the lungs. Such therapy, prescribed based on vital signs, has long-term complications associated with both general physiological development and the development of the central nervous system, cognitive abilities and memory. The aim of the study was to identify possible target genes involved in this process.

Methods and Algorithms: To do this, we investigated transcriptomic changes in the hippocampal of neonatal rats 6 hours after administration of the synthetic glucocorticoid dexamethasone at a dose of 0.2 mg/kg body weight on the second day of life P2, the day of delivery was considered the zero day P0. The control group received an injection of the same volume of saline solution. The method of mass parallel sequencing of the transcriptome (100M paired reads on the Illumina platform) revealed a change in the expression of the main target genes. The technical sequences were cut using the Trimmomatic program. The reads were aligned to the reference rat genome mRatBN7.2 using the hisat2 aligner. The Rsubread program was used to calculate the reads aligned to the coding part of genes. Differentially expressed genes were determined using the edge R package. The functional annotation was carried out using the clusterprofiler R package.

Results: Thus, by selecting differentially expressed genes $|\log FC| > 1$ $p_{adj} < 0.05$ (adjusted for the Benjamin-Hochberg multiple comparison correction), 57 genes were changed in expression; 46 increased, 11 decreased expression (Fig. 1A). Genes whose expression increased belonged to such terms of the "Biological processes" classification of Gene Ontology (GO): cellular response to a glucocorticoid stimulus, cellular response to a corticosteroid stimulus – which is natural with the intensification of glucocorticoid signaling (Fig. 1B). The following categories were also identified: icosanoid metabolic processes, detoxification, stress response to metal ions, cellular response to zinc ions (Fig. 1C). Genes that reduced expression showed enrichment among the following categories of Gene Ontology: cellular response to lipopolysaccharide, cellular response to bacterial molecules, cellular response to biotic stimuli, positive regulation of NK cell proliferation in response to LPS, degranulation of NK cells. These categories are primarily related to the effect of glucocorticoids on immune cells and brain resident macrophages of microglial cells. It is worth noting that among the GO categories were also: the signaling pathway of purinergic nucleotide receptors associated with G proteins, L-alanine transport, iron import into the cell, positive regulation of mitochondrial depolarization.

It is worth noting that among the genes that increased their expression were Hypoxia-induced Factor 3A (Hif3a) $\log FC = 3.56$, which can regulate pluripotency and proliferation of embryonic stem cells [1]. Also, the expression of serotonin receptor 1A (Htr1a) was increased $\log FC = 1.93$. This may be a compensatory effect of a decrease in the expression of Tph2 in the midbrain and serotonin level in the anterior regions after administration of dexamethasone [2]. Previously, we showed that a single injection on the second day of rat life leads to a decrease in anxiety and depressive-like behavior on the 60th day of life [3]. This can be explained by the simultaneous intensification of noradrenergic neurotransmission [4] and a decrease in serotonergic neurotransmission

[2], which leads to this behavioral phenotype. Similar effects on behavior are observed with a decrease in serotonin neurotransmission in the neonatal period [5].

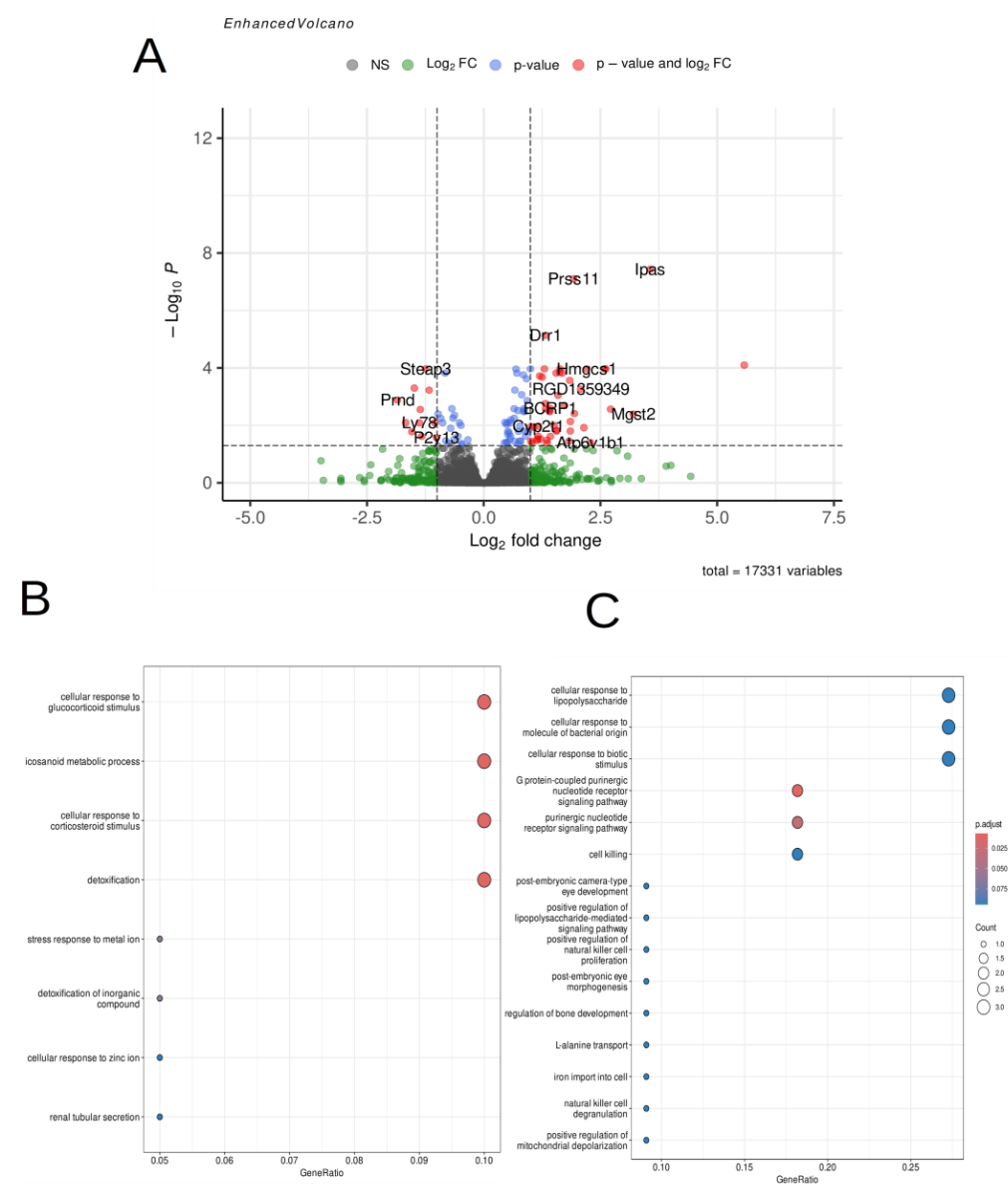


Fig. 1. Characterization of transcriptomic changes in the hippocampus of two-day-old rats 6 hours after administration of dexamethasone 0.2 mg/kg subcutaneously. A – volcano plot showing differentially expressed genes, the genes of interest are marked in red $|\log_2FC| > 1$ & $p_{adj}(BH) < 0.05$; B – functional annotation and GO terms "Biological processes" enrichment of genes that have increased expression; C – functional annotation and GO terms "Biological processes" enrichment of genes that have decreased expression

Despite the pronounced suppression of immune function, according to the results of GO enrichment, after administration of dexamethasone, Interleukin-33 IL-33 logFC = 1.59 and Mannose receptor C-type 1 (Mrc1) logFC = 1.30 were increased. These genes are markers of M2 microglia, which triggers tissue reorganization and regeneration, increases phagocytosis and plays a role neuroprotective role [6]. Among the genes that have decreased their expression, it is worth noting the second receptor of the vascular endothelial growth factor Kdr logFC = -1.04, which is responsible for the growth of axons in response to Semaphorin 3E (Sema3E) [7].

Conclusion: Thus, in addition to the identified classical effects of dexamethasone on the expression of immune system genes, possible target genes for studying the negative effects of glucocorticoids on the development of the nervous system are Hif3a, Htr1a, Kdr. The previously shown by us decrease in anxiety and depressive-like behavior on the 60th day of rat life after a single injection of dexamethasone on P2 may be explained by the simultaneous intensification of noradrenergic neurotransmission and a decrease in serotonergic neurotransmission.

Funding: The study is supported by Ministry of Education project FWNR-2023-0002.

Список литературы/References

1. Forristal C.E. et al. Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. *Reproduction*. 2010;139:85-97. doi 10.1530/REP-09-0300
2. Clark J.A. et al. Glucocorticoid modulation of tryptophan hydroxylase-2 protein in raphe nuclei and 5-hydroxytryptophan concentrations in frontal cortex of C57/Bl6 mice. *Mol Psychiatry*. 2008;13:498-506. doi 10.1038/sj.mp.4002041
3. Lanshakov D.A. et al. Single neonatal dexamethasone administration has long-lasting outcome on depressive-like behaviour, Bdnf, Nt-3, P75ngfr and sorting receptors (SorCS1-3) stress reactive expression. *Sci Rep*. 2021;11:8092. doi 10.1038/s41598-021-87652-7
4. Kalinina T.S., Shishkina G.T., Dygalo N.N. Induction of tyrosine hydroxylase gene expression by glucocorticoids in the perinatal rat brain is age-dependent. *Neurochem Res*. 2012;37:811-818. doi 10.1007/s11064-011-0676-y
5. Trujillo V. et al. Neonatal serotonin depletion induces hyperactivity and anxiolytic-like sex-dependent effects in adult rats. *Mol Neurobiol*. 2021;58:1036-1051. doi 10.1007/s12035-020-02181-0
6. Cherry J.D., Olschowka J.A., O'Banion M.K. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation*. 2014;11:98. doi 10.1186/1742-2094-11-98
7. Bellon A. et al. VEGFR2 (KDR/Flk1) Signaling mediates axon growth in response to semaphorin 3E in the developing brain. *Neuron*. 2010;66:205-219. doi 10.1016/j.neuron.2010.04.006