

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-30

ОСТРАЯ КРОВОПОТЕРЯ ВЫЗЫВАЕТ ПОВЫШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ РАМП-ГЕНА *CLEC5A* В ЭРИТРОИДНЫХ ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА МЫШИ***ACUTE BLOOD LOSS INDUCES INCREASED EXPRESSION OF THE PAMP GENE *CLEC5A* IN MURINE BONE MARROW ERYTHROID CELLS**

К. В. Назаров, Ю. А. Шевченко, Р. Ю. Перик-Заводский,
О. Ю. Перик-Заводская, С. Алрхмун, М. О. Волынец, С. В. Сенников

НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск

K. V. Nazarov, Y. A. Shevchenko, R. Y. Perik-Zavodskii,
O. Y. Perik-Zavodskaja, S. Alrhoun, M. O. Volynets, S. V. Sennikov

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk

✉ kirill.lacriminator@mail.ru

Аннотация

Острая кровопотеря — состояние, сопровождающее большинство случаев физической травмы, оказывающее влияние на все ростки костного мозга, в том числе и на эритроидные ядросодержащие клетки. Мы изучили транскриптом генов иммунного ответа мышинных эритроидных ядросодержащих клеток на острую кровопотерю с помощью профилирования на платформе NanoString и обнаружили, что в эритроидных клетках костного мозга мыши после острой кровопотери наблюдается значительное повышение экспрессии гена *Clec5a*, белковый продукт этого гена реагирует на патоген-ассоциированные молекулярные паттерны. Мы предполагаем, что это может помочь эритроидным ядросодержащим клеткам костного мозга обнаруживать и уничтожать патогены антимикробными белками кальпротектина и кателицидина, гены которых (*S100a8*, *S100a9* и *Camp*) доминируют по экспрессии в эритроидных клетках костного мозга мышей.

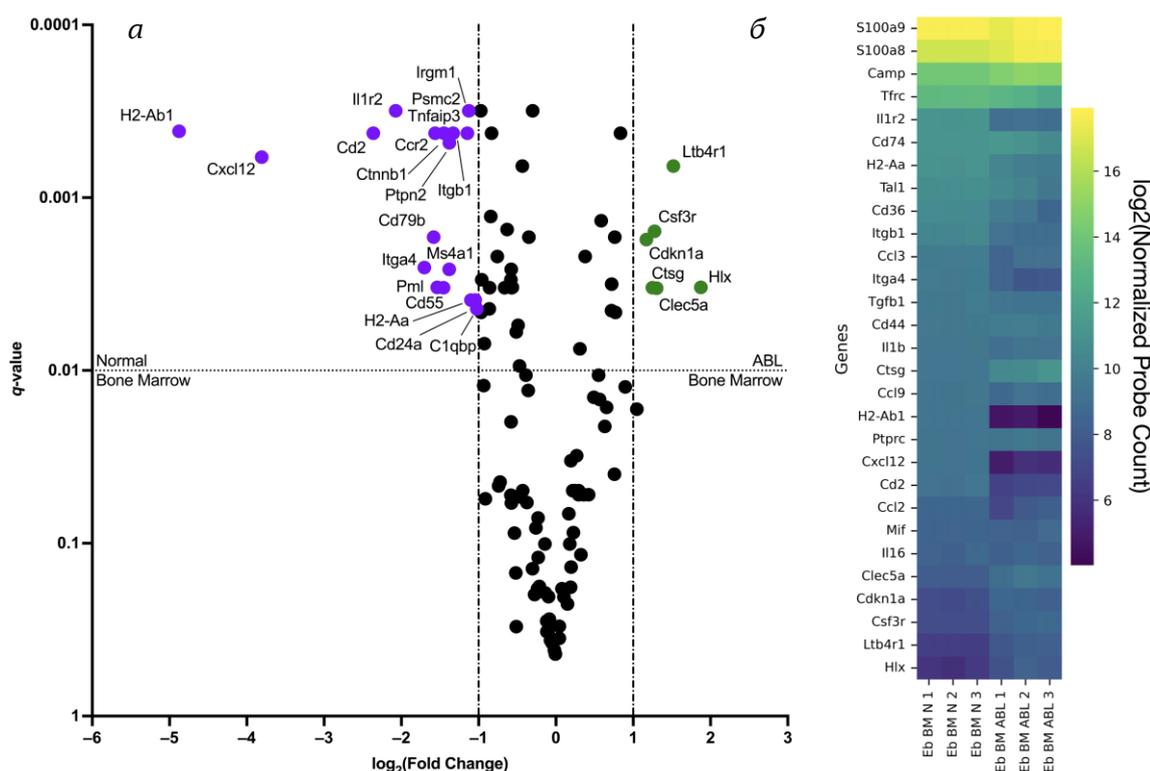
Abstract

Hemorrhage, a condition that accompanies most physical trauma cases, affects all bone marrow lineages, including erythroid nucleated cells. In this study, we studied the immune response genes transcriptome of murine erythroid cells to acute blood loss using NanoString immune transcriptome profiling. We observed that acute blood loss up-regulate pathogen-associated molecular pattern sensing gene *Clec5a* in post-acute blood loss murine bone marrow erythroid cells. We believe that the up-regulation of the *Clec5a* gene in bone marrow erythroid cells could help bone marrow erythroid cells detect and eliminate pathogens with the help of reactive oxygen species and antimicrobial proteins calprotectin and cathelicidin, the genes of which (*S100a8*, *S100a9*, and *Camp*) dominate the expression in bone marrow erythroid cells of mice.

Цель — определение иммунотранскриптомного профиля эритроидных ядросодержащих клеток костного мозга в норме ($n = 3$) и после острой кровопотери ($n = 3$).

Материалы и методы. Мы получали самцов мышей ♂F1 CBA×C57Bl6 в возрасте 3–5 месяцев из вивария Института цитологии и генетики и использовали их во всех экспериментах. Все эксперименты с использованием мышей были одобрены локальным этическим комитетом НИИФКИ. Острую кровопотерю проводили следующим образом: у мышей под изофлурановым наркозом собирали ~0,5–0,8 мл крови из ретроорбитального синуса с помощью стеклянного капилляра с заостренным кончиком. На третьи сутки после начала эксперимента мышей подвергали эвтаназии, асептически собирали бедренные кости (нормальный костный мозг ($n = 4$), костный мозг после острой кровопотери ($n = 4$)) и селезенки (нормальная селезенка ($n = 4$), селезенка после острой кровопотери ($n = 4$)). Клетки костного мозга получали путем промывания костномозгового канала фосфатно-солевым буфером. Спленоциты получали путем гомогенизации всей селезенки в фосфатно-солевом буфере в стеклянном гомогенизаторе. Спленоциты центрифугировали в градиенте плотности фикола-урографина. Мы проводили магнитное разделение мононуклеарных клеток селезенки и клеток костного мозга с использованием анти-Ter-119-биотинилированных антител и магнитных бусин, связанных стрептавидином, согласно протоколам производителя для получения Ter-119+ эритроидных ядросодержащих клеток. Мы выделили тотальную РНК из 500 000 Ter-119+ эритроидных ядросодержащих клеток с помощью набора Total RNA Purification Plus Kit и измерили концен-

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (№ 0415-2024-0012).



Анализ дифференциальной экспрессии генов: *a* — Volcano-график ДЭГ, *b* — тепловая карта ДЭГ и ключевых генов эритроидных ядросодержащих клеток мыши

трацию тотальной РНК в каждом образце на приборе Qubit 4. Мы проводили профилирование экспрессии генов с помощью аналитической системы NanoString nCounter SPRINT Profiler, используя панель nCounter Mouse Immunology v1 (561 ген, связанный с иммунитетом, 15 генов домашнего хозяйства, 6 положительных и 8 отрицательных контролей). Нормализация экспрессии генов и контроль качества образцов проводились в программе nSolver 4 с использованием синтетических положительных контролей и включенных в панель генов-домохозяев *Gapdh*, *Rpl19*, *Ppia*, *Oaz1*, *Eef1g*, *Polr2a*, *G6pdx*, *Gusb*, *Sdha* и *Alas1*. Данные о количестве экспрессии генов были преобразованы при помощи лог₂-трансформации. Затем мы провели анализ дифференциальной экспрессии генов с помощью множественных t-тестов (считали Fold Change > 2 или Fold Change < -2 и *q*-значения < 0,01 статистически значимыми) и построили Volcano-график в GraphPad Prism 10.2.3. С помощью программы Bioinfokit мы построили тепловую карту, на которой были показаны ключевые гены эритроидных клеток с повышенным уровнем экспрессии.

Результаты. Мы обнаружили, что после острой кровопотери Ter-119+ эритроидные ядросодержащие клетки из костного мозга имели более высокую экспрессию генов: *Csf3r*, *Cdkn1a*, *Ctsg*, *Hlx*, *Clec5a* и *Ltb4r1*; и значительно более низкую экспрессию генов: *Cxcl12*, *Il1r2*, *Ccr2*, *Psmc2*, *Tnfaip3*, *Cd2*, *Cd79b*, *Cd55*, *Cd24a*, *C1qbp*, *Pml*, *Ms4a1*, *Itga4*, *Itgb1*, *Ptpn2*, *Ctnnb1*, *Irgm1*, *H2-Aa* и *H2-Ab1* (см. рисунок).

Исследованные образцы тотальной РНК экспрессировали сигнатурные гены эритроидных клеток *Tfrc*, *Tal1*, *Cd36*, *Itga4* и *Itgb1* в большом количестве копий, что свидетельствовало о высокой чистоте магнитно-сортированных эритроидных ядросодержащих клеток.

Выводы. Острая кровопотеря активно влияет на транскриптом эритроидных ядросодержащих клеток мыши и приводит к повышению экспрессии гена *Clec5a*, что может свидетельствовать о роли эритроидных ядросодержащих клеток костного мозга в надзоре за патогенами, которые эритроидные ядросодержащие клетки, вероятно, могут уничтожать при помощи антимикробных белков кальпротектина и кателицидина, гены которых (*S100a8*, *S100a9* и *Camp*) доминируют по экспрессии в эритроидных клетках костного мозга мышей [1].

Литература

1. Perik-Zavodskaja O., Perik-Zavodskii R., Nazarov K. et al. Murine Bone Marrow Erythroid Cells Have Two Branches of Differentiation Defined by the Presence of CD45 and a Different Immune Transcriptome Than Fetal Liver Erythroid Cells // Intern. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24 (21). P. 15752.