

ДИНАМИКА СТАБИЛЬНОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *SDHA*, *HPRT*, *PRL3D1* И *HES1* В РАМКАХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ КРЫС

Е.И. Лебедева^{1,*}, А.С. Бабенко², А.Т. Щастный¹

¹ Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов
медицинский университет»
210009, Республика Беларусь, Витебск, просп. Фрунзе, 27

² Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»
220116, Республика Беларусь, Минск, просп. Дзержинского, 83

До настоящего времени не удалось выявить универсального набора референсных генов для нормализации данных полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Многочисленные исследования, затрагивающие выбор референсных генов для конкретных целей, далеко не всегда тщательно прорабатывают стратегию выбора. В ряде работ этап выбора референсных генов в принципе не используется ввиду дороговизны и иных причин. В результате этого для нормализации данных часто используются гены, неплохо зарекомендовавшие себя в иных, часто отличающихся, обстоятельствах эксперимента. Цель настоящего исследования заключалась в изучении динамики уровня мРНК генов в рамках моделирования фиброза печени крыс тиаоацетамидом.

При рассмотрении процесса фиброгенеза в целом, от интактной печени до развитого в ней фиброза, оптимальными референсными генами являются *hes1* и *sdha*. Однако при акцентах на конкретных этапах фиброза стоит выбирать пару генов в зависимости от показателей стабильности. На начальных стадиях фиброгенеза можно использовать *sdha* и *hprt*. Ген *hes1* наилучшим образом подойдёт на роль референсного в том случае, когда среднее значение Cq генов-мишеней будет составлять примерно 29 циклов (как у *hes1*). С осторожностью стоит использовать *hes1* при работе в диапазонах Cq генов-мишеней 26–29 и более 30, поскольку ошибка в таком случае будет нарастать. В отношении гена *sdha*, придерживаясь того же принципа, отметим как оптимум значение Cq, равное 27. В то же время допустима работа с диапазоном Cq 24–27, а в диапазонах выше 28 использование *sdha* может быть сопряжено с повышением ошибок расчётов.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, нормализация данных, референсный ген

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование работы: работа выполнена в рамках государственной программы научных исследований «Фундаментальные и прикладные науки — медицине» Министерства Здравоохранения Республики Беларусь, задание 2.89 «Изучить роль экспрессии генов NOTCH- и TWEAK-сигнальных путей, участвующих в процессах пролиферации и дифференцировки клеток печени в норме и при её токсическом поражении» (регистрационный номер 20190107 от 19.02.2019).

Для цитирования: Лебедева Е.И., Бабенко А.С., Щастный А.Т. Динамика стабильности экспрессии генов *sdha*, *hprt*, *prl3d1* и *hes1* в рамках моделирования фиброза печени крыс. *Биомедицина*. 2022;18(2):17–30. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-2-17-30>

Поступила 28.03.2022

Принята после доработки 25.04.2022

Опубликована 10.06.2022

STABILITY OF THE *SDHA*, *HPRT*, *PRL3D1*, AND *HES1* GENE EXPRESSION IN A RAT LIVER FIBROSIS MODEL

Elena I. Lebedeva^{1*}, Andrei S. Babenko², Anatoly T. Shchastny¹

¹ Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University,
210009, Republic of Belarus, Vitebsk, Frunze Ave., 27

² Belarussian State Medical University,
220116, Republic of Belarus, Minsk, Dzerzhinsky Ave., 83, build. 15

So far, no versatile set of reference genes for normalizing real-time polymerase chain reaction data has been identified. Numerous studies focusing the selection of reference genes for specific purposes frequently fail to elaborate a suitable selection strategy. In a number of such studies, the stage of selecting reference genes is ignored due to either its high cost or other reasons. As a result, the normalization of data is carried out using genes, which have previously shown their effectiveness under other, sometimes completely different, experimental conditions. In this work, we aim to study variations in the level of mRNA expression of several genes, some of which are commonly used to normalize RT-PCR data. As special conditions, modeling of rat liver fibrosis with thioacetamide was used.

In our experiment, when considering the process of fibrogenesis as a whole, the optimal reference genes were found to be *hes1* and *sdha*. However, when focusing on specific stages of fibrosis, a pair of genes should be selected depending on the stability indicators. At the initial fibrogenesis stages, *sdha* and *hpert* can be used. The *hes1* gene is suitable as a reference gene, when the average Cq value of the target genes is approximately 29 cycles (as in *hes1*). *Hes1* should be used with care when working in the Cq ranges of target genes of 26–29 and above 30, since the error is likely to increase. Following the same principle, the optimum Cq value for the *sdha* gene was observed to be 27, although the Cq range of 24–27 is also acceptable. At the same time, when working in the Cq range of above 28, the use of *sdha* may be associated with an increase in calculation errors.

Keywords: real-time PCR, qPCR, data normalization, reference gene, gene expression

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: the work was carried out within the framework of the state research program “Fundamental and Applied Sciences for Medicine” of the Ministry of Health of the Republic of Belarus, assignment No. 2.89 “To study the role of the expression of NOTCH- and TWEAK-signaling pathway genes involved in the processes of proliferation and differentiation of liver cells in normal and under its toxic damage” (registration No. 20190107 dated February 19, 2019).

For citation: Lebedeva E.I., Babenko A.S., Shchastny A.T. Stability of the *sdha*, *hpert*, *prl3d1*, and *hes1* Gene Expression in a Rat Liver Fibrosis Model. *Journal Biomed.* 2022;18(2):17–30. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-2-17-30>

Submitted 28.03.2022

Revised 25.04.2022

Published 10.06.2022

Введение

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ) является быстрым, высокоточным, чувствительным и воспроизводимым методом оценки уровня мРНК в клетках. В ряде случаев ПЦР-РВ может быть предпочтительнее высокопроизводительного секвенирования при оценке

относительного уровня экспрессии генов как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях. Для реализации всех преимуществ ПЦР-РВ необходимо уделять максимальное внимание вопросам стандартизации и воспроизводимости результатов. Специалисты, как правило, выделяют несколько ключевых этапов получения адек-

ватных, воспроизводимых и точных данных. Во-первых, это выделение чистых и сохранившихся в значительной степени свою целостность препаратов общей фракции РНК. Во-вторых, корректный выбор стратегии нормализации количественных данных ПЦР-РВ, включая обоснованный выбор референсных генов или их групп, и пр. Вопрос стандартизации и воспроизводимости данных остро стоит при использовании любых методов анализа, однако во многих случаях существуют подробные и проверенные руководства, направленные на минимизацию систематических и случайных ошибок. В случае ПЦР-РВ роль такого руководства выполняет MIQE Guidelines (Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments). Этот, разработанный в 2009 г. ведущими специалистами в области ПЦР-РВ, сборник накопленных экспериментальных данных по вопросу нормализации и стандартизации количественных данных ПЦР нашёл широкое применение среди исследовательских лабораторий самого разного профиля [4, 17, 21].

Публикация MIQE не решила проблему стандартизации данных ПЦР полностью. К сожалению, далеко не все лаборатории могут себе позволить точно следовать пунктам руководства по целому ряду причин: стоимость исследований, оснащение необходимыми материалами и оборудованием, несогласие с некоторыми тезисами и пунктами руководства и пр. Таким образом, несмотря на более чем 10-летний период существования руководства MIQE, в современной литературе по-прежнему появляются работы, полностью или частично противоречащие друг другу. Как показывает практика, вне зависимости от точного соблюдения всех требований MIQE, при оценке уровня экспрессии генов очень большую роль играет выбор правильной стратегии нормализации данных и, в частности, выбор адекватных референсных генов. Этой проблеме посвящено достаточно

большое количество работ. Практически во всех случаях авторы предлагают использовать для выбора оптимальных референсных генов специализированные алгоритмы, например BestKeeper (qBase), NormFinder, geNorm, и достаточно стандартную панель из числа генов домашнего хозяйства. Некоторые авторы указывают на невозможность введения единого критерия нормализации для различных тканей и экспериментальных условий. Само собой, это создаёт преграды унификации и стандартизации подходов к нормализации, требует выбора различных генов и их сочетания в экспериментах на разных тканях и в зависимости от условий эксперимента [1, 3, 7, 13, 16].

Цель настоящего исследования заключается в изучении динамики уровня мРНК генов в рамках длительного экспериментального воздействия химическим агентом (тиоацетамид). Выбранные мишени (*sdha*, *hpri*, *prl3d1* и *hes1*) рассматриваются нами с точки зрения возможности использования их в качестве референсных генов для нормализации данных ПЦР-РВ. В качестве модельного процесса выбран фиброгенез печени с последующим переходом в цирроз. Модельный организм — крысы Wistar.

Материалы и методы

В качестве генов-мишеней использовали два часто встречающихся в литературных источниках референсных гена (нормализация данных ПЦР-РВ) — *sdha* (NCBI Gene ID: 157074) и *hpri* (NCBI Gene ID: 24465). Кроме этого, использовали два гена, выступавших только в качестве целевых объектов (генов-мишеней) в экспериментальных исследованиях и никогда не используемых в качестве референсных — *prl3d1* (NCBI Gene ID: 53950) и *hes1* (NCBI Gene ID: 29577).

Ген *sdha* кодирует субъединицу А сукцинатдегидрогеназы, экспрессируется в большинстве тканей, вовлекается в процесс

обмена веществ. Участвует в переносе электронов с сукцината на кофермент Q в рамках электрон-транспортной цепи митохондрий [14].

Ген *hprt1* кодирует фермент гипоксантин фосфорибозил трансферазу, который превращает гуанин в гуанозинмонофосфат, а гипоксантин — в инозинмонофосфат. Один из ключевых белков обмена пуриновых нуклеотидов. В значительном количестве обнаруживается различных тканях [18].

Ген *prl3d1* не относится к обычным белкам взрослого организма крыс и является членом крупного семейства пролактина. Большие количества этого белка встречаются во второй половине срока беременности самок крыс. В норме у взрослых особей практически не встречается. Этот белок связывается с рецепторами пролактина. Участвует в регуляции ответа на поступление питательных веществ; стимуляции сигнального пути JAK-STAT; регуляции деления клеток; контроле над репродуктивной функцией, включая собственно беременность и лактацию [9].

Ген *hes1* относится к семейству Hes — внутриядерных белков клетки, регулирующих транскрипцию. Является ингибитором транскрипции для белков, которые используют в этом процессе белок bHLH. Вовлекается в ряд физиологически важных процессов, таких как репарация ДНК, митогенез, клеточная адгезия и миграция и пр. [12].

Дизайн эксперимента был одобрен на заседании Комиссии по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными Учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет». Все манипуляции с животными проводили в соответствии с рекомендациями Конвенции Совета Европы по охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях, от 18.03.1986, Директивой Совета ЕЭС от 24.11.1986

и рекомендациями FELASA Working Group Report (1994–1996).

В эксперименте использовали половозрелых крыс-самцов Wistar (72 особи начальной массой 190–210 г). Животные прошли карантинный режим вивария и не имели внешних признаков каких-либо заболеваний. Крысы содержались в пластиково-металлических клетках (по 6 особей), размещённых на стеллажах при естественном освещении, со свободным доступом к корму и воде. В качестве подстилки использовали предварительно обеззараженные опилки. Температура в помещении вивария поддерживалась на уровне 21–23°C, а влажность воздуха составляла 50%. Все животные получали стандартный, сбалансированный рацион питания в установленное время. В качестве питья крысы получали питьевую воду.

Фиброгенез печени у животных индуцировали раствором тиаоацетамида (ТАА), который вводили в желудок с помощью зонда в дозе 200 мг/кг массы тела животного два раза в неделю за 3 ч до кормления в течение 11 недель. С использованием генератора случайных чисел животных рандомизировали на 6 групп по 12 особей в каждой (m0 — контрольная, m1 — длительность воздействия ТАА 3 недели, m2 — длительность воздействия ТАА 5 недель, m3 — длительность воздействия ТАА 7 недель, m4 — длительность воздействия ТАА 9 недель, m5 — длительность воздействия ТАА 11 недель. Крысы контрольной группы получали аналогичный объём воды без ТАА.

Крыс выводили из эксперимента декапитацией с применением гильотины в состоянии кратковременного эфирного наркоза: опытных — через 3, 5, 7, 9 и 11 недель, а интактных — по окончании эксперимента.

Для изучения уровня экспрессии мРНК генов методом ПЦР-РВ скальпелем из большой левой доли печени крыс забирали фрагмент органа диаметром не более 5 мм.

После забора образцы помещали в криопробирки и далее в жидкий азот для транспортировки и хранения непосредственно до начала процедуры выделения РНК.

Выделение суммарной РНК проводили с помощью набора реагентов «АртРНК MiniSpin» (ООО «АртБиоТех», Беларусь) согласно протоколу производителя. Гомогенизацию образцов проводили с использованием фарфоровых ступок и пестиков в присутствии жидкого азота, не допуская размораживания образцов.

После процедуры выделения и очистки суммарную РНК сбивали с мини-колонок с помощью свободной от РНКаз milliQ воды, входящей в состав набора. Контроль качественных характеристик образцов проводили с помощью электрофореза в агарозном геле (выборочно) без денатурирующих условий (1x TAE, 2% гель). Количество суммарной РНК после выделения определяли с помощью спектрофотометрии (длина волны — 260 нм, Quantus, Promega, США). Выборочно снимали спектр поглощения 220–340 нм.

Синтез кДНК проводили с использованием олиго-дТ-праймеров и набора реагентов ArtMMLV Total (ООО «АртБиоТех», Беларусь) в соответствии с инструкцией производителя. Для одной реакции использовали одинаковое стартовое количество суммарной РНК 200 нг/реакцию.

Для дизайна специфических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов использовали данные о последовательностях мРНК генов, депонированные в базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). В случае наличия нескольких вариантов мРНК перед началом дизайна проводили их выравнивание с помощью бесплатного программного пакета Ugene v.33 («UniPro», Россия). Для дизайна использовали консервативные участки последовательности мРНК с соблюдением правила о размещении одного или более олигонуклеотидов в месте соединения двух разных экзонов.

Первичный дизайн проводили с помощью бесплатного онлайн-приложения Primer3 v. 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Уникальность и специфичность полученных олигонуклеотидов проверяли с помощью онлайн-сервиса Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Анализ наличия стабильных димеров и шпилечных структур олигонуклеотидов и ампликонов, а также моделирование оптимальных условий ПЦР-РВ осуществляли с помощью бесплатного онлайн программного пакета mFold (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>) и бесплатного онлайн-приложения OligoAnalyser (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). Последовательности олигонуклеотидов представлены в табл. 1.

Для проведения ПЦР-РВ использовали реагенты производства ОДО «Праймтех» (Беларусь). Конечный объем реакционной смеси составлял 25 мкл и содержал все необходимые компоненты в следующих концентрациях: 2 mM хлорида магния, 0,1 mM смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов, 500 нМ олигонуклеотидов, включая зонд для ПЦР-РВ, 1,25 ед. термостабильной Taq ДНК-полимеразы с соответствующим буферным раствором.

Режим термоциклирования: +95°C — 2 мин, затем 40 циклов: +95°C — 5 с, +60°C — 45 с. Детекция по каналу FAM после каждого цикла. В работе использовали оборудование производства компании «BioRad» (прибор «CFX96touch», США). Критерием успешной оптимизации считали наименьший показатель цикла амплификации. Эффективность реакций определяли с помощью метода стандартной кривой и серий разведений концентрированных образцов кДНК. Шаг — 5 раз. Критерием удовлетворительной эффективности считали не менее 90%. Для определения уровня экспрессии генов проводили ПЦР-РВ согласно оптимизированным протоколам для всех мишеней. Все реакции проводили

Таблица 1. Последовательности специфических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов
Table 1. Sequences of specific oligonucleotide primers and fluorescently labeled probes

Название олигонуклеотида	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'	Метка, 5'	Метка, 3'
<i>hprtF</i>	GGACAGGACTGAAAGACTTGCT		
<i>hprtR</i>	ACAGAGGGCCACAATGTGAT		
<i>hprtP</i>	CATGAAGGAGATGGGAGGCC	FAM	BHQ1
<i>priF</i>	CCTTATACAACAGGACTCAGGCTA		
<i>priR</i>	ACTGCAAGTCTTTGAGTCCAGA		
<i>priP</i>	GAAAATTTTGACTACCTGCCTGG	FAM	BHQ1
<i>sdhaF</i>	CCCACAGGTATCTATGGTGCT		
<i>sdhaR</i>	TTGGCTGTTGATGAGAATGC		
<i>sdhaP</i>	CATCACAGAAGGGTGCCGTG	FAM	BHQ1
<i>hes1F</i>	GAAAGATAGCTCCCGGCATT		
<i>hes1R</i>	CGGAGGTGCTTCACTGTCAT		
<i>hes1P</i>	CCAAGCTGGAGAAGGCAGACA	FAM	BHQ1

в триплетах. В каждой группе все 12 образцов анализировали отдельно для получения наибольшей достоверности и учёта внутригрупповой вариации, фенотипической гетерогенности уровня экспрессии генов.

Стабильность уровня мРНК генов оценивали с использованием показателя стандартного отклонения, а также алгоритмов BestKeeper, NormFinder и geNorm в рамках бесплатного онлайн-приложения RefFinder (<https://www.heartcure.com.au/reffinder/>) [8, 15].

Для проведения гистологического исследования образцы печени крыс помещали в 10%-ный р-р нейтрального формалина на фосфатном буфере и фиксировали в течение 24 ч. Затем проводили обработку фиксированного материала с последующей заливкой в парафин с использованием автомата для гистологической обработки ткани Thermo STP-120 («Thermo Fisher Scientific», Германия) и станции для заливки ткани парафином Thermofisher EC350 («Thermo Fisher Scientific», Германия). От каждого животного получали по одному блоку и с помощью микротомы Thermo M340E (MICROM, «Laborgerate GmbH», Германия) изготавливали в среднем по 3–4 среза толщиной 4 мкм и помещали их на предметные стёкла.

Для выявления соединительной ткани применяли окраску по методу Маллори в автоматическом стейнере «Thermo HMS70» («Thermo Fisher Scientific», Германия).

Результаты количественных измерений оценивали с использованием программ Statistica 10.0 («StatSoft Inc.» США), IBM SPSS Statistics 23.0, Microsoft Office Excel («Microsoft Corp.», США).

Результаты исследований

Данные ПЦР-РВ были получены для 216-ти образцов кДНК. Согласно плану исследования, все образцы разделили на 6 групп в соответствии с временем воздействия химическим фактором (m0 — интактные образцы, без воздействия, m1– m5 — экспериментальные образцы после воздействия тиацетамидом). Каждая группа образцов состояла из 12-ти кДНК, полученных в триплетах, суммарно — 36.

Для всех генов на всех экспериментальных и контрольных точках определили показатели диапазона Cq (quantitation cycle), а также выделили в отдельный столбец число циклов, составляющее эти диапазоны. Данные представлены в табл. 2.

Данные о диапазонах Cq на разных этапах исследования различаются, что, по-

Таблица 2. Динамика изменений диапазона значений *Cq* исследуемых генов на разных контрольных точках эксперимента

Table 2. Dynamics of the *Cq* ranges for the studied genes at different control points of the experiment

Точка	*Диапазон <i>Cq</i>				**Число циклов			
	<i>hprt</i>	<i>sdha</i>	<i>prl3d1</i>	<i>hes1</i>	<i>hprt</i>	<i>sdha</i>	<i>prl3d1</i>	<i>hes1</i>
m0	24,4–29,0	25,0–28,9	34,4–39,0	26,8–31,1	4,6	3,9	4,6	4,3
m1	24,5–27,4	24,6–27,3	33,8–36,9	28,1–29,8	2,9	2,7	3,1	1,7
m2	27,6–30,7	27,0–30,3	32,7–37,1	28,3–31,8	3,1	3,3	4,4	3,5
m3	26,9–29,8	26,2–28,6	32,5–37,7	28,3–30,2	2,9	2,4	5,3	1,9
m4	26,7–29,7	26,9–28,4	30,9–35,2	28,5–30,1	3,0	1,6	4,3	1,6
m5	27,7–29,2	26,4–28,8	32,3–35,9	27,9–29,9	1,6	2,4	3,6	2,0
Все	24,4–30,7	24,6–30,3	30,9–39,0	26,8–31,1	6,3	5,7	8,1	4,3

Примечание: * — минимальное и максимальное значение *Cq* (quantitation cycle) для всех образцов данной точки эксперимента, $n=36$ (12 образцов в триплетах); общее количество образцов в графе «все» — 216; ** — разница между максимальным и минимальным значением цикла (*Cq*).

Note: * — minimum and maximum *Cq* value (quantification cycle) for all samples at this point of the experiment, $n=36$ (12 samples in triplets); total number of samples in the column “all” = 216; ** — difference between the maximum and minimum values of the cycle (*Cq*).

видимому, указывает на то, что все гены так или иначе реагируют на экспериментальные условия. Этого, безусловно, следует избегать в случае использования гена в качестве референсного для нормализации данных ПЦР-РВ. Даже допущение того, что разница в 2 цикла является следствием ошибки эксперимента, связанной с ручным способом постановки ПЦР-РВ, в подавляющем большинстве случаев она выше.

Для гена *prl3d1* диапазоны *Cq* являются чрезвычайно высокими (*Cq* выше 30-го цикла, среднее — 34,9 цикла), что, в свою очередь, говорит о низком уровне мРНК этого гена. Вследствие этого повышается вероятность и значимость ошибок пипетирования при работе. Снижается ценность *prl3d1* в качестве потенциального референсного гена для нормализации данных ПЦР-РВ. Также становится сложнее определить реальные колебания уровня мРНК в ответ на экспериментальное воздействие. Стоит отметить и колебания уровня мРНК гена *prl3d1* в ходе эксперимента в разных группах практически на порядок (3–3,3 цикла).

Следующий включённый в исследование, нетипичный для референсного, ген *hes1* также не отличался высокой стабильно-

стью и показывал различный разброс *Cq* в экспериментальных группах и контроле (m0). Тем не менее, в большинстве групп диапазон его *Cq* на превышал 2, что говорит в пользу более высокого потенциала этого гена для использования в качестве референсного. Уровень мРНК со средним значением *Cq* 29,3 допускает его использование при анализе экспрессии генов с показателем *Cq* в диапазоне 29–35. Этот ген не является идеальным референсным геном, однако в рамках данного эксперимента по моделированию фибротических изменений в печени крысы под действием химического индуцирующего фактора может быть рассмотрен как ген-кандидат, в отличие от *prl3d1*.

Анализ уровня мРНК часто используемых в качестве референсных генов *sdha1* и *hprt1* показал, что при умеренной экспрессии (в среднем *Cq* порядка 27-го цикла для обоих генов) наблюдается значительный разброс значений *Cq* от группы к группе (см. табл. 3, столбец «Среднее значение *Cq*»).

Как и в случае с *prl3d1*, разброс *Cq* генов *sdha1* и *hprt1* между группами практически во всех случаях превышал 2. Это негативным образом сказалось и на показателях стандартного отклонения *Cq* (табл. 3).

Таблица 3. Вариация средних значений и стандартных отклонений *Cq* исследуемых генов на разных контрольных точках эксперимента

Table 3. Variation of the *Cq* mean values and standard deviations at different control points of the experiment

Точка	Среднее значение <i>Cq</i>				Стандартное отклонение <i>Cq</i>			
	<i>hprt</i>	<i>sdha</i>	<i>prl3d1</i>	<i>hes1</i>	<i>hprt</i>	<i>sdha</i>	<i>prl3d1</i>	<i>hes1</i>
m0	27,1	26,8	36,5	29,5	1,2	0,9	1,1	0,9
m1	25,7	26,0	35,2	29,2	0,6	0,6	0,8	0,6
m2	28,8	28,2	34,9	29,5	0,7	0,9	1,2	1,0
m3	27,8	27,0	34,7	29,2	0,8	0,6	1,4	0,6
m4	27,9	27,5	34,2	29,5	0,6	0,4	0,7	1,0
m5	28,5	27,6	34,1	29,1	0,4	0,6	0,9	0,7
Все	27,6	27,2	34,9	29,3	1,3	1,0	1,3	0,8

Как видно из таблицы, на основании данных о стандартном отклонении *Cq* только *hes1* в среднем по эксперименту показал значение менее 1. Ген *sdha1* не превысил показателя 1. На основании этих данных, без применения специальных программных средств, можно считать, что пара *hes1* и *sdha1* может быть использована для нормализации данных ПЦР-РВ.

При более внимательном взгляде на изменение уровня мРНК генов (рис. 1) становится заметнее разница между эффектом ТАА в разных группах (m0–m5). Мы намеренно не провели нормализацию данных с использованием референсного гена, а лишь применили расчёт изменений уровня мРНК относительно точки m0.

Уровень мРНК гена *hes1* относительно стартовой точки (m0 — интактные животные) колебался в пределах погрешности эксперимента и во всех точках не отличался от стартового более чем в два раза. Примерно такие же результаты удалось получить и для гена *sdha*. Уровень его экспрессии в точке m2 изменился относительно стартового более чем в 2 раза (2,5 раза). Тем не менее, на протяжении всего последующего эксперимента он оставался в пределах ошибки. Неожиданным оказался скачок в 2,5 раза (m1) и последующее падение в 3 раза (m2, разница колебаний m1–m2 составила примерно 6 раз) уровня мРНК *hprt*. Несмотря на то, что далее в точках m3–m5 значения стабилизировались, однознач-

но признать *hprt* надёжным референсным геном в рамках настоящего эксперимента нельзя. Наконец, касательно *prl3d1* прослеживается чёткий ответ на воздействие ТАА на протяжении всего эксперимента.

Параллельно оценке уровня мРНК для всех образцов печени на всех контрольных точках проводили морфологическое исследование (данные не представлены), что позволило сопоставить этапы развития фиброза и сравнить точки m1–m5 с интактной печенью m0. Согласно шкале балльной оценки степени фиброза печени по шкале Ishak K.G. [6], все контрольные точки эксперимента были охарактеризованы в связи с баллами F шкалы (табл. 4).

Согласно данным диаграмм, представленным на рис. 1, в точке m1 уровень мРНК всех 4-х исследуемых генов отреагировал на введение тиацетамида. В точке m1 при начальных изменениях тканей печени уровень мРНК всех генов возрос. Тем не менее, *hes1* и *sdha* не показали заметного роста или падения в дальнейшем. В то время как *hprt* серьёзно отреагировал не только в точке m1, но и далее сильным падением в точке m2 в рамках прогрессирования фиброза. В свою очередь, повышение уровня мРНК гена *prl3d1* может рассматриваться как маркер усугубления степени фиброза от F1 до F5 по шкале, вплоть до стадии перехода фиброза в цирроз.

Использование программных алгоритмов анализа стабильности уровня мРНК

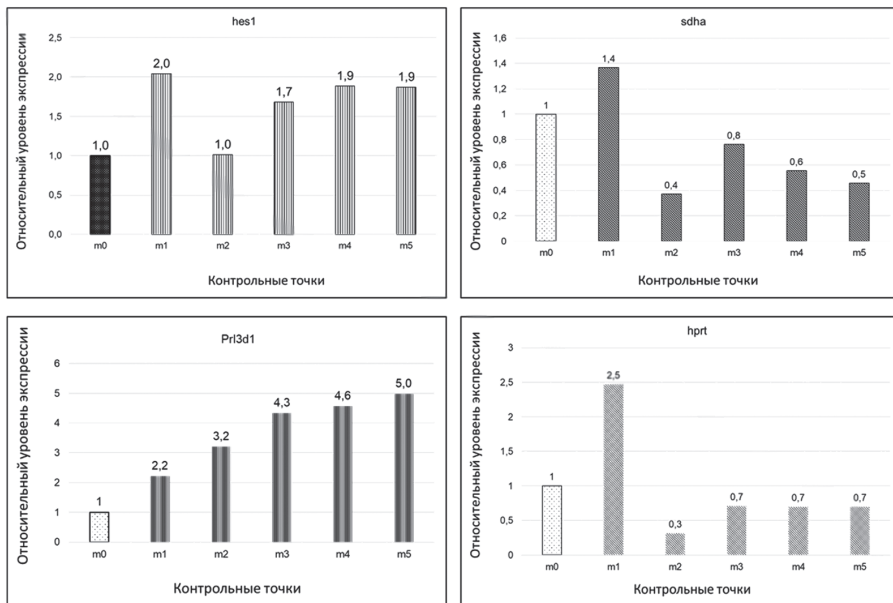


Рис. 1. Изменение относительного уровня экспрессии генов (относительно контрольной точки *m0*), на разных этапах фиброгенеза (контрольные точки *m1–m5*).
Fig. 1. Variations in the relative mRNA expression level (relative to the checkpoint *m0*), at different stages of fibrogenesis (checkpoints *m1–m5*).

исследуемых генов, с одной стороны, подтвердили описанные выше результаты, но с другой — привнесли некоторые новшества, заставляющие внимательно обдумать и взвесить окончательный выбор для нормализации данных ПЦР-РВ.

В табл. 5 представлены сравнительные данные анализа стабильности уровня мРНК генов-кандидатов.

Наименьший показатель стандартного отклонения *Sq* для всех образцов в сумме показал ген *hes1*. Геном-кандидатом, кото-

Таблица 4. Оценка степени фиброза печени экспериментальных животных
Table 4. Assessment of liver fibrosis stages in experimental animals

Группы животных	Балльная оценка степени фиброза печени по шкале Ishak K.G.	Гистологическая характеристика степени выраженности фиброза
m0	F0	Фиброз отсутствует
m1	F1	Фиброзное расширение порталных трактов с короткими фиброзными септами или без них
m2	F2/F3	Фиброзное расширение большинства порталных трактов с короткими фиброзными септами или без них. Единичные мостовидные порто-портальные септы
m3	F3/F4	Фиброзное расширение большинства порталных трактов с единичными мостовидными порто-портальными септами, местами с выраженными мостовидными порто-портальными и единичными порто-центрльными септами
m4	F4/F5	Период трансформации фиброза в цирроз. Фиброзное расширение большинства порталных трактов с выраженными мостовидными порто-портальными и единичными порто-центрными септами. Диффузная нодулярная перестройка паренхимы (неполный цирроз)
m5	F5	

Таблица 5. Изменение стабильности референсных генов в зависимости от контрольной точки эксперимента (стадия фиброза) и выбранного алгоритма анализа стабильности

Table 5. Variation in the stability of reference genes depending on the control point of the experiment (fibrosis stage) and the selected stability analysis algorithm

Точка	Стандартное отклонение				BestKeeper				NormFinder			
	<i>hprt</i>	<i>sdha</i>	<i>prl3d1</i>	<i>hes1</i>	<i>hprt</i>	<i>sdha</i>	<i>prl3d1</i>	<i>hes1</i>	<i>hprt</i>	<i>sdha</i>	<i>prl3d1</i>	<i>hes1</i>
m0	1,22	0,88	1,15	0,87	1,02	0,74	0,82	0,83	1,02	0,42	0,85	1,20
m1	0,59	0,60	0,77	0,62	0,46	0,62	0,61	0,54	0,54	0,64	0,65	0,71
m2	0,73	0,87	1,21	0,95	0,66	0,79	1,00	0,76	0,70	0,31	0,91	1,31
m3	0,81	0,57	1,36	0,65	0,69	0,58	1,03	0,53	0,69	0,73	1,18	0,87
m4	0,62	0,38	0,74	0,96	0,60	0,22	0,58	0,76	0,82	0,40	1,04	0,94
m5	0,38	0,63	0,87	0,65	0,22	0,52	0,74	0,57	0,44	0,45	0,57	0,81
Всего	1,28	0,98	1,28	0,81	1,06	0,80	1,31	0,83	1,16	0,59	1,50	0,94

рый способен составить пару *hes1* для расчёта среднего геометрического значения и повышения качества анализа, является *sdha*. Такой же результат был предоставлен и алгоритмами BestKeeper и NormFinder — пара *hes1/sdha*. Однако алгоритм geNorm счёл оптимальной парой референсных генов для модели индуцированного химическим фактором фиброза *hprt/sdha*.

Обсуждение результатов

В рамках настоящего исследования оценивали уровень мРНК генов, которые используются в работах других авторов как в качестве референсных, для нормализации данных ПЦР в режиме реального времени (*sdha* и *hprt1*), а также как собственно объекты исследований различных процессов — мишени (*prl3d1* и *hes1*). За более чем 20-летний опыт нормализации данных ПЦР-РВ, к сожалению, не удалось выявить универсального набора референсных генов. Тем не менее, в настоящее время существуют коммерчески доступные панели кандидатов в референсные гены, а также некий свод правил по их поиску и валидации в целом. Многочисленные работы, затрагивающие выбор референсных генов для конкретных целей, далеко не всегда тщательно прорабатывают стратегию выбора. Более того, во многих работах этап выбора референсных генов в принципе не используется ввиду дороговизны иссле-

дований и иных причин. В результате этого для нормализации данных ПЦР-РВ часто используются гены, неплохо зарекомендовавшие себя в иных, часто отличающихся, обстоятельствах эксперимента.

На примере нашего исследования мы показали, что при моделировании фиброза печени у крыс с помощью химического индуктора гены-кандидаты ведут себя нелинейно и порой непредсказуемо на разных этапах одного и того же процесса — фиброгенеза. Само собой, при работе в менее благоприятных условиях, без поддержки морфолога, порой очень сложно сформировать выборку образцов тканей печени так однородно, как это удалось нам. Тем более, если речь идёт о клинических случаях, работе с биоптатами печени.

На основании полученных нами результатов стоит отметить, что к вопросу выбора оптимальных референсных генов стоит подходить тщательно, посвящая этому процессу отдельное время и ресурсы до начала главного эксперимента. Так, если планируется изучение перехода фиброза в цирроз, то стоит отдать предпочтение популярному референсному гену *sdha*, а пару ему может составить *hprt1*. В то же время на ранних этапах фибротических изменений, когда интактная печень только начинает подвергаться индуцирующему фиброз воздействию, стоит отдать предпочтение *hprt*. И несмотря на то, что в паре с ним может идти

sdha, в интактной печени без воздействия оба этих гена использовать не рекомендуется, а на роль оптимального референсного гена выходит *hes1*.

Не стоит рассматривать на роль оптимального референсного гена *prl3d1* ввиду низкого уровня экспрессии, но даже при сопоставимом уровне предполагаемых мишеней нельзя забывать о том, что этот ген экспрессируется преимущественно во время беременности и лактации, и в принципе не стоит его принимать во внимание у взрослых самцов. В то же время в рамках некоторых патологических состояний уровень его экспрессии может изменяться и, наоборот, служить маркером, мишенью, а не референсом.

В отличие от *prl3d1*, ген *hes1* охотнее воспринимается как вероятный кандидат в референсные гены ввиду более высокого уровня экспрессии. Тем не менее, на основании полученных нами данных *hes1* показывал наилучшую стабильность экспрессии лишь в образцах интактной печени, а в ходе эксперимента по индукции фиброза реагировал на экспериментальные условия. Так же, как и в случае с *prl3d1*, ген *hes1* часто используется в качестве молекулярной мишени. Несмотря на это, в рамках нашей работы суммарно по всем контрольным точкам — от интактной ткани печени до перехода фиброза в цирроз — именно *hes1* оказался наиболее стабильно экспрессирующимся и в меньшей степени в среднем отвечал на экспериментальное воздействие индуктором фиброза.

В отличие от *prl3d1* и *hes1*, гены *sdha* и *hprt* можно часто встретить в современной литературе в качестве референсных. При среднем уровне экспрессии данные гены достаточно стабильны в различных тканях лабораторных крыс как в интактном виде, так и во время воздействия экспериментальными химическими, физическими и биологическими факторами.

В похожей по дизайну работе [20] ещё в 2015 г. исследователи сравнили стабиль-

ность экспрессии 12 кандидатов в референсные гены. *Sdha* и *hprt* оказались достаточно стабильными в ткани печени при воздействии химических токсических веществ. К сожалению, работа была проведена лишь на 4-х животных без продолжительного воздействия и моделирования конкретных патологических процессов, таких как фиброз или цирроз.

Годом позже группа учёных [11] изучила стабильность экспрессии гена *sdha* под воздействием гипергликемии, гипоксии и химического вещества изофлуран. В качестве модельного объекта использовали культуру клеток кардиомиобластов крысы — H9c2. В ходе комбинирования неблагоприятных факторов оказалось, что экспрессия *sdha* в среднем изменяется на 15% с минимальным ответом в 10% после 6 ч воздействия и максимальным в 40% и более после первых суток. Хотя вариация в 15% не является критической, всё же важно принимать во внимание время инкубации и дозу фактора.

Интересно отметить и работу [19], в которой учёные предлагают оптимизированную панель из 9-ти наиболее популярных генов-кандидатов в референсные. Разработанная панель направлена на облегчение поиска оптимальных референсных генов в различных тканях организма крысы. Среди генов, включённых панель, присутствуют *sdha* и *hprt*.

В работах [2, 22] говорится о том, что гены *sdha* и *hprt* не стоит использовать при работе с аноректальными пороками у крыс. Повидимому, ассоциированные ткани имеют серьёзные отличия в уровне экспрессии этих генов. В исследование включили 18 животных, никаких дополнительных воздействий не осуществляли. Также группа M. Hlavackova, et al. [10] отметила, что гены *sdha* и *hprt* в тканях сердечной мышцы у крыс при экспериментальной гипоксии не подходят на роль референсных из-за высокой вариабельности уровня мРНК. Работа проводилась на 12-ти животных. Сравнивали

уровень мРНК генов-кандидатов до и после экспериментального воздействия.

В работе [5], как и в настоящем исследовании, индукцию фиброза проводили с использованием ТАА. Внушительный объём выборки: 60 особей, разделённых на 5 групп, отсутствие подготовки и обоснования выбора референсного гена. *Hprt* используется на всех этапах исследования.

Таким образом, мы видим, что часть исследований по оценке уровня мРНК генов в тканях крысы используют для нормализации данных ПЦР-РВ данные сторонних, порой сильно отличающихся, работ. Часть исследований проводит выбор референсных генов отдельно от основного эксперимента, и часто разные группы приводят противоречивые данные о стабильности экспрессии генов. Наконец, часть исследований с хорошей технической проработкой и подготовкой опытов всё же не учитывает различный эффект от воздействия экспериментальными условиями на разных этапах исследования.

Выводы

В различных источниках можно встретить понятные и известные, но вместе с тем не всеми применяемые правила нормализации данных ПЦР-РВ. Одним из наиболее важных считают использование стабильно экспрессирующегося от образца к образцу, не отвечающего на экспериментальное воздействие и имеющего сопоставимые с мишенью показатели уровня мРНК гена. При невозможности выбора одного, что часто и происходит в силу различных причин, рекомендуют использовать два и даже три референсных гена одновременно.

Опираясь на результаты нашего исследования, мы хотим добавить, что:

– при изучении каких-либо процессов (в условиях физиологической нормы

или патологических) в тканях млекопитающих стоит оценивать характеристики референсных генов на всех контрольных точках эксперимента и/или при возможно большем числе состояний (важно в клинической диагностике);

– обязательно проводить этап выбора референсных генов до начала основного эксперимента минимум на 10-ти образцах биологического материала, максимально близко соответствующего таковому в экспериментальной группе, причём мы рекомендуем проводить эту работу даже при полном повторении сторонних авторов;

– в зависимости от цели и задач эксперимента использовать наиболее стабильно экспрессирующиеся гены в среднем по опыту или для каждой контрольной точки в отдельности, если гены не совпадают.

Применительно к настоящему исследованию, при рассмотрении процесса фиброгенеза в целом от интактной печени до развитого в ней фиброза, оптимальными референсными генами являются *hes1* и *sdha*. Однако при акцентах на конкретных этапах фиброза стоит выбирать пару генов в зависимости от показателей стабильности. На начальных стадиях фиброгенеза можно использовать *sdha* и *hprt*. Ген *hes1* наилучшим образом подойдёт на роль референсного в том случае, когда среднее значение C_q генов-мишеней будет составлять примерно 29 циклов (как у *hes1*). С осторожностью стоит использовать *hes1* при работе в диапазонах C_q генов-мишеней 26–29 и более 30-ти, поскольку ошибка в таком случае будет нарастать. В отношении гена *sdha*, придерживаясь того же принципа, отметим как оптимум значение C_q , равное 27. В то же время допустима работа с диапазоном C_q 24–27, а в диапазонах выше 28-ти использование *sdha* может быть сопряжено с повышением ошибок расчётов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Biredinc A., Mehta R., Alhussain R., Afendi A., Chandhoke V., Younossi Z., Баранова А. Выбор надёжных контрольных генов для количественной ПЦР в реальном времени на образцах неопухолевой ткани желудка человека. *Молекулярная биология*. 2012;46(1):166–175. [Biredinc A., Mehta R., Alhussain R., Afendi A., Chandhoke V., Younossi Z., Baranova A. Výbor nadezhnyh kontrol'nyh genov dlya kolichestvennoj PCR v real'nom vremeni na obrazcah neopuholevoj tkani zheludka cheloveka [Selection of reliable control genes for quantitative real-time PCR on samples of non-tumor human gastric tissue]. *Molecular biology*. 2012;46(1):166–175. (In Russian)].
2. Bai Y., Chen H., Yuan Z.W., Wang W. Normal and abnormal embryonic development of the anorectum in rats. *J. Pediatr. Surg.* 2004;39(4):587–590. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2003.12.002.
3. Bustin S., Nolan T. Talking the talk, but not walking the walk: RT-qPCR as a paradigm for the lack of reproducibility in molecular research. *Eur. J. Clin. Invest.* 2017;47(10):756–774. DOI: 10.1111/eci.12801.
4. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 2009;55(4):611–622. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797.
5. Eraky S.M., El-Mesery M., El-Karef A., Eissa L.A., El-Gayar A.M. Silymarin and caffeine combination ameliorates experimentally-induced hepatic fibrosis through down-regulation of LPAR1 expression. *Biomed. Pharmacother.* 2018;101:49–57. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.02.064.
6. Everhart J.E., Wright E.C., Goodman Z.D., Dienstag J.L., Hoefs J.C., Kleiner D.E., Ghany M.G., Mills A.S., Nash S.R., Govindarajan S., Rogers T.E., Greenson J.K., Brunt E.M., Bonkovsky H.L., Morishima Ch., Litman H.J., HALT-C Trial Group. Prognostic value of Ishak fibrosis stage: Findings from the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial. *Hepatology*. 2010;51(2):585–594. DOI: 10.1002/hep.23315.
7. Fiddler J.L., Clarke S.L. Evaluation of candidate reference genes for quantitative real-time PCR analysis in a male rat model of dietary iron deficiency. *Genes Nutr.* 2021;16(1):17. DOI: 10.1186/s12263-021-00698-0.
8. Giri A., Sundar I.K. Evaluation of stable reference genes for qPCR normalization in circadian studies related to lung inflammation and injury in mouse model. *Sci. Rep.* 2022;12(1):1764. DOI: 10.1038/s41598-022-05836-1.
9. Hayakawa K., Nakanishi M.O., Ohgane J., Tanaka S., Hirokawa M., Soares M.J., Yagi S., Shiota K. Bridging sequence diversity and tissue-specific expression by DNA methylation in genes of the mouse prolactin superfamily. *Mamm. Genome*. 2012;23(5–6):336–345. DOI: 10.1007/s00335-011-9383-x.
10. Hlaváčková M., Kožichová K., Neckář J., Kolář F., Musters R.J.P., Novák F., Nováková O. Up-regulation and redistribution of protein kinase C- δ in chronically hypoxic heart. *Mol. Cell. Biochem.* 2010;345(1–2):271–282. DOI: 10.1007/s11010-010-0581-8.
11. Klenke S., Renckhoff K., Engler A., Peters J., Frey U.H. Easy-to-use strategy for reference gene selection in quantitative real-time PCR experiments. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2016;389(12):1353–1366. DOI: 10.1007/s00210-016-1305-8.
12. Li Y., Xu Y., Wang R., Li W., He W., Luo X., Ye Y. Expression of Notch-Hif-1 α signaling pathway in liver regeneration of rats. *J. Int. Med. Res.* 2020;48(9):300060520943790. DOI: 10.1177/0300060520943790.
13. Liu W., Yu J., Wang Y-F., Shan Q-Q., Wang Y-X. Selection of suitable internal controls for gene expression normalization in rats with spinal cord injury. *Neural Regen. Res.* 2022;17(6):1387–1392. DOI: 10.4103/1673-5374.327350.
14. Lu X., Liu Y., Zhang D., Liu K., Wang Q., Wang H. Determination of the panel of reference genes for quantitative real-time PCR in fetal and adult rat intestines. *Reprod. Toxicol.* 2021;104:68–75. DOI: 10.1016/j.reprotox.2021.07.001.
15. Meng Q., Shu B., Sun S., Wang Y., Yang M., Zhu E., Liu A., Gao S., Gou Y., Wang Z. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR normalization in the coffee white stem borer, *Xylotrechus quadripes* Chevrolat (Coleoptera: Cerambycidae). *Bull. Entomol. Res.* 2022;112(2):151–161. DOI: 10.1017/S0007485321000596.
16. Ruiz-Villalba A., Ruijter J.M., van den Hoff M.J.B. Use and misuse of Cq in qPCR data analysis and reporting. *Life (Basel)*. 2021;11(6):496. DOI: 10.3390/life11060496.
17. Sanders R., Mason D.J., Foy C.A., Huggett J.F. Considerations for accurate gene expression measurement by reverse transcription quantitative PCR when analysing clinical samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014;406(26):6471–6483. DOI: 10.1007/s00216-014-7857-x.
18. Schwarz A.P., Kovalenko A.A., Malygina D.A., Postnikova T.Y., Zubareva O.E., Zaitsev A.V. Reference gene validation in the brain regions of young rats after pentyleneetetrazole-induced seizures. *Biomedicines*. 2020;8(8):239. DOI: 10.3390/biomedicines8080239.
19. Schwarz A.P., Malygina D.A., Kovalenko A.A., Trofimov A.N., Zaitsev A.V. Multiplex qPCR assay for assessment of reference gene expression stability in rat tissues/samples. *Mol. Cell. Probes*. 2020;53:101611. DOI: 10.1016/j.mcp.2020.101611.
20. Svingen T., Letting H., Hadrup N., Hass U., Vinggaard A.M. Selection of reference genes for quantitative

- tive RT-PCR (RT-qPCR) analysis of rat tissues under physiological and toxicological conditions. *Peer J.* 2015;3:e855. DOI: 10.7717/peerj.855.
21. Taylor S.C., Nadeau K., Abbasi M., Lachance C., Nguyen M., Fenrich J. The ultimate qPCR experiment: producing publication quality, reproducible data the first time. *Trends Biotechnol.* 2019;37(7):761–774. DOI: 10.1016/j.tibtech.2018.12.002.
22. Yang Z., Gao L., Jia H., Bai Y., Wang W. The expression of Shh, Ptch1, and Gli1 in the developing caudal spinal cord of fetal rats with anorectal malformations. *J. Surg. Res.* 2019;233:173–182. DOI: 10.1016/j.jss.2018.08.006.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Лебедева Елена Ивановна*, к.б.н., доц., учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;

e-mail: lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru

Бабенко Андрей Сергеевич, к.х.н., доц., учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Щастный Анатолий Тадеушевич, д.м.н., проф., учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;

e-mail: admin@vsmu.by

Elena I. Lebedeva*, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;

e-mail: lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru

Andrei S. Babenko, Cand. Sci. (Chem.), Assoc. Prof., Belarussian State Medical University

Anatoly T. Shchastniy, Dr. Sci. (Med.), Prof., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;

e-mail: admin@vsmu.by

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author