

ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ РЕФЕРЕНСНЫХ ГЕНОВ В МОЗГЕ КРЫС
ПРИ ПРОВЕДЕНИИ АНТИОКСИДАНТНОЙ
И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ
В ЛИТИЙ-ПИЛОКАРПИНОВОЙ МОДЕЛИ ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИИ

© 2022 г. А. П. Шварц^{1, *}, А. Д. Дёмина¹, М. В. Захарова¹, А. А. Коваленко¹,
М. О. Грязнова¹, А. М. Ищенко², А. В. Зайцев¹

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

²НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Роспотребнадзора,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: aleksandr.pavlovich.schwarz@gmail.com

Поступила в редакцию 20.04.2022 г.

После доработки 11.05.2022 г.

Принята к публикации 12.05.2022 г.

Обратная транскрипция в сочетании с количественной (в реальном времени) полимеразной цепной реакцией (ОТ-кПЦР) является золотым стандартом для оценки экспрессии генов на уровне РНК, однако требует тщательного выбора валидных референсных генов для нормализации результатов. Целью данной работы было определение оптимальных референсных генов для ОТ-кПЦР экспериментов в височной коре и дорзальном гиппокампе мозга крыс в латентную фазу (период эпилептогенеза до появления спонтанных рецидивирующих судорог) литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии на фоне раздельного или сочетанного применения рекомбинантного провоспалительного цитокина — рецепторного антагониста интерлейкина-1 (100 мг/кг в сутки) и комбинации антиоксидантов (100 мг/кг витамина С, 200 мг/кг витамина Е, 25 мкг/кг S-аденозилметионина). Была проанализирована экспрессия 9 референсных генов (*Actb*, *B2m*, *Gapdh*, *Rpl13a*, *Sdha*, *Ppia*, *Hprt1*, *Pgk1*, *Ywhaz*). С помощью сервиса RefFinder® мы определили оптимальные референсные гены для оценки уровня содержания целевых мРНК в дорзальном гиппокампе (*Gapdh*, *Pgk1*, *Hprt1*) и височной коре (*Pgk1*, *Sdha*, *Ppia*) головного мозга. При этом было выявлено значимое усиление экспрессии генов *Actb* и *B2m* в дорзальном гиппокампе, которое не подавлялось ни применением IL-1ra, ни смесью антиоксидантов, ни их сочетанием. Мы также оценили уровень экспрессии гена провоспалительного цитокина интерлейкина-1 бета (*Il1b*) в дорзальном гиппокампе, нормируя его относительно трех оптимальных (*Gapdh*, *Pgk1*, *Hprt1*) референсных генов либо относительно нестабильных *Actb* и *B2m*. В случае использования оптимальных референсных генов было обнаружено, что экспрессия гена *Il1b* увеличивается в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели эпилепсии, и ни один из видов терапии не изменяет этой реакции. При нормировке относительно уровня мРНК *Actb* и *B2m*, изменения экспрессии гена *Il1b* в дорзальном гиппокампе в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели не выявляются. Исходя из этого, гены *Actb* и *B2m* могут быть вовлечены в процесс эпилептогенеза и не могут использоваться в качестве референсных в эпилептических моделях. Таким образом, результаты нашей работы демонстрируют важность аккуратного выбора референсных генов.

Ключевые слова: ОТ-ПЦР, референсный ген, экспрессия генов, мРНК, височная эпилепсия, литий-пилокарпиновая модель, мозг

DOI: 10.31857/S0869813922060073

Обратная транскрипция в сочетании с количественной (в реальном времени) полимеразной цепной реакцией (ОТ-кПЦР) является золотым стандартом для оценки экспрессии генов на уровне РНК. Этот метод обладает рядом важных преимуществ, включая высокий уровень стандартизации, широкий динамический диапазон измерений, возможность оценки большого количества мишеней. Тем не менее, получение качественных данных требует соблюдения ряда условий при планировании, проведении, обработке и публикации результатов ОТ-кПЦР, которые легли в основу руководства MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments – минимальная информация для публикации экспериментов с применением количественной ПЦР) [1]. Кроме соблюдения всех требований к пробоподготовке и проведению реакции для количественной оценки экспрессии генов крайне важно затем правильно нормировать полученные данные.

На сегодняшний день стандартным подходом к нормированию данных ОТ-кПЦР является расчет содержания целевых мРНК относительно мРНК референсных генов [2]. Традиционно для таких целей использовались гены домашнего хозяйства, однако в последние десятилетия накапливаются свидетельства того, что их экспрессия может тоже изменяться в некоторых моделях, и поэтому разрабатываются подходы для поиска наиболее надежных референсных генов среди экспериментальных образцов [3–5]. Неудачный выбор референсных генов может привести к потере значимых различий или даже обнаружению противоположных реальным по знаку изменений экспрессии целевых РНК [6].

Ранее нами были определены оптимальные референсные гены для ОТ-кПЦР в пентилентетразоловой модели острых судорог, не приводящих к индукции эпилептогенеза [7]. Настоящая работа направлена на оценку стабильности наиболее часто используемых референсных генов в мозге крыс в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии при применении экспериментальной терапии, направленной на подавление процессов нейровоспаления и окислительного стресса. Литий-пилокарпиновая модель считается одной из лучших моделей для изучения патогенеза приобретенной эпилепсии [8]. Процессы нейровоспаления и окислительного стресса, сопутствующие нейродегенеративным изменениям при эпилептогенезе, способны взаимно усиливать друг друга, и считаются перспективными мишенями для превентивной терапии приобретенных форм эпилепсии [9].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на самцах крыс Вистар, выращенных в экспериментально-биологической клинике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (ИЭФБ РАН). Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Bio-этического комитета ИЭФБ РАН.

На начало эксперимента возраст животных составлял 6–8 нед. Индукцию пилокарпин-индуцированного эпилептического статуса проводили, как подробно описано ранее [10]. За сутки до введения пилокарпина всем крысам, включая контрольных, внутривенно (в/в) вводили раствор хлорида лития в дозе 127 мг/кг (LiCl; Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США). Для блокады периферических мускариновых рецепторов вводили бромид N-метилскополамина (1 мг/кг, в/в; Sigma-Aldrich) за час до введения пилокарпина. Пилокарпин (Sigma-Aldrich) вводили дробно в дозе 10–40 мг/кг (по 10 мг/кг с интервалом 30 мин, в/в) до развития судорог силой 4 балла по шкале Racine [11]. По истечении 75 мин после начала 4-й стадии судорог их блокировали введением диазепама (в/в, 10 мг/кг, Sigma-Aldrich). Животным контрольной группы вместо пилокарпина вводили физиологический раствор.

Экспериментальную терапию начинали через час после остановки эпилептического статуса и проводили в течение 7 дней. Части животных вводили человеческий рекомбинантный противовоспалительный цитокин – рекомбинантный рецепторный антагонист интерлейкина-1 (в/б, IL-1ra, препарат анакинра, Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург, Россия) в дозе 100 мг/кг (группа Li-PC + IL-1ra), другим – смесь антиоксидантов [12]: витамин С (ОАО “Дальхимфарм”, Хабаровск, Россия) в дозе 100 мг/кг, витамин Е (АО “Мосагроген”, Москва, Россия) в дозе 200 мг/кг, S-аденозилметионин (адметионина бутандисульфонат, препарат “Гептор”, АО “Верофарм”, Россия) в дозе 25 мг/кг (в/б); третьим вариантом терапии было комбинированное введение IL-1ra и смеси антиоксидантов (в/б).

Нелеченым животным после эпилептического статуса и контрольной группе (введение LiCl без пилокарпина) вводили физраствор и стерильное подсолнечное масло (растворитель для инъекционной формы витамина Е). Выбор терапии обусловлен показанным ранее нейропротекторным эффектом выбранной дозы IL-1ra в исследуемой модели эпилепсии [13], а также эффективным подавлением окислительного стресса при применении указанного сочетания низкомолекулярных антиоксидантов [12].

Через 7 дней после эпилептического статуса (одни сутки после последней инъекции препаратов) животных декапитировали, быстро извлекали мозг, замораживали и хранили мозг при -80°C до дальнейшей обработки. Дорзальную область гиппокампа и височную область коры больших полушарий выделяли с использованием микроатома-криостата, как было подробно описано ранее [7]. Границы начала и окончания извлечения областей мозга указаны на рис. 1.

РНК выделяли методом кислой гуанидин-изотиоцианат-хлороформной экстракции с использованием реагента ExtractRNA (Евроген, Москва, Россия). Образцы РНК подвергали обработке RQ1 ДНКазой, свободной от РНКаз, (Promega, США) в течение 15 мин с последующей преципитацией РНК в растворе хлорида лития (конечная концентрация около 6 М) и промывкой в 75%-ном этаноле. Концентрацию РНК определяли по поглощению раствора при длине волны 260 нм, а чистоту препарата – по соотношению оптической плотности при длинах волн 260/280 нм на спектрофотометре NanoDropLite (ThermoFisherScientific, США). Обратную транскрипцию проводили с использованием 1 мкг выделенной РНК, 0.5 мкг oligodT- и 0.25 мкг случайных 9-мерных праймеров (ДНК-Синтез, Москва, Россия), 15 е. а. РНАзина (Силекс, Москва, Россия) и 100 е. а. MMLV-ревертазы (Евроген, Москва, Россия) при 42°C в течение часа с предварительным отжигом праймеров при 70°C в течение 10 мин (до добавления фермента). Реакцию останавливали прогреванием в течение 10 мин при 65°C , полученную кДНК разводили в 10 раз и хранили при -20°C перед ПЦР.

ПЦР в реальном времени для анализа экспрессии 9 референсных генов (*Actb*, *B2m*, *Gapdh*, *Rpl13a*, *Sdha*, *Ppia*, *Hprt1*, *Pgk1*, *Ywhaz*) проводили с применением оригинальных мультиплексных тест-систем нашей разработки, как подробно описано ранее [14], с использованием TaqM-полимеразы (Алкор-био, Санкт-Петербург, Россия) на приборе CFX384 (Bio-Rad Laboratories, США) в конечном объеме реакции 5 мкл, внося по 0.7 мкл образцов кДНК в четырех повторностях, с использованием отрицательного контроля ПЦР (вода вместо кДНК) и отрицательного контроля обратной транскрипции (пробы, в которые во время проведения обратной транскрипции не добавляли ревертазы). Также дополнительно оценивали экспрессию гена провоспалительного цитокина интерлейкина-1 β (*Il1b*). Последовательности праймеров приведены в табл. 1. Праймеры были синтезированы компанией “ДНК-синтез” (Москва, Россия).

Стабильность референсных генов оценивали с помощью онлайн-сервиса RefFinder® [15], объединяющего в себе 4 популярных алгоритма оценки стабиль-

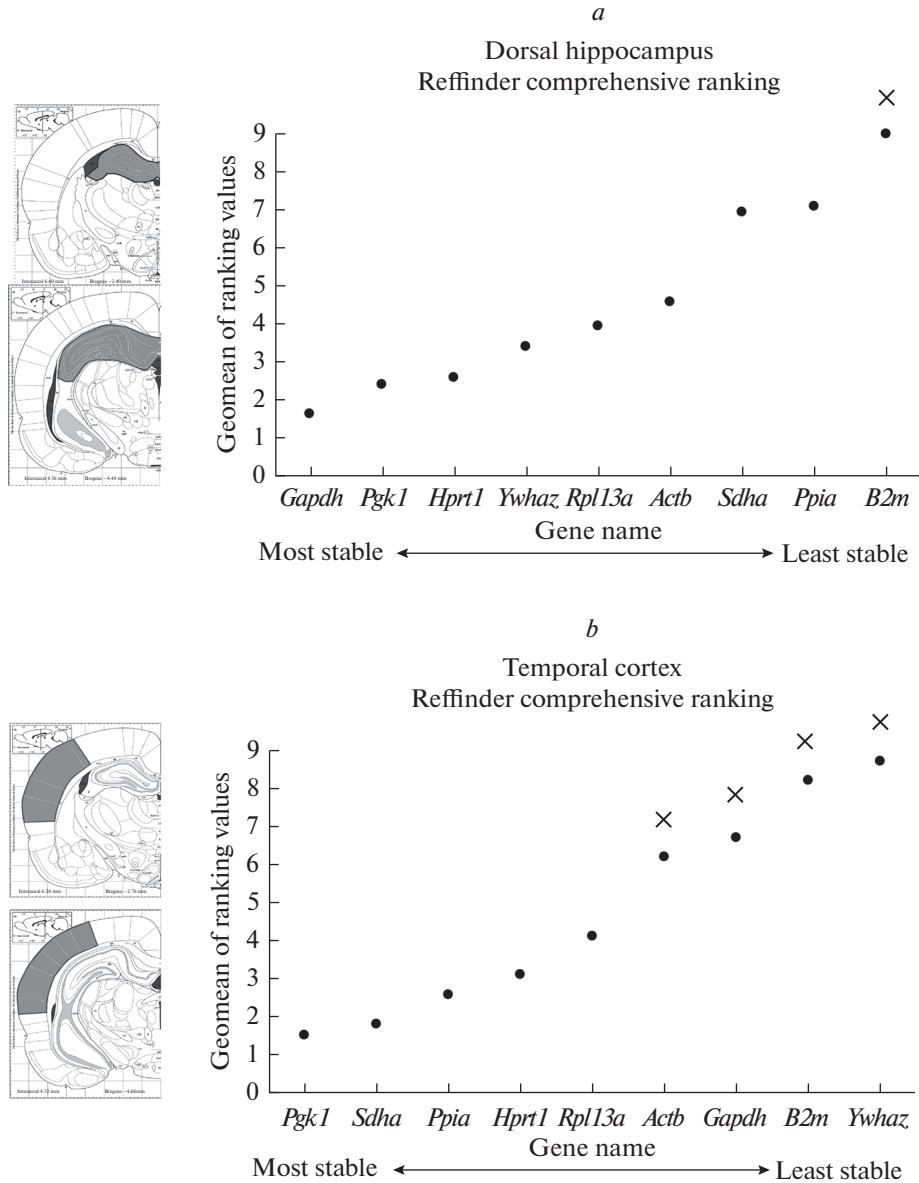


Рис. 1. Стабильность экспрессии референсных генов в дорзальном гиппокампе (*a*) и височной коре (*b*) головного мозга крыс в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии на фоне раздельной и комбинированной терапии рецепторным антагонистом IL-1 α (анакинра, 100 мг/кг) и смесью антиоксидантов (100 мг/кг витамина С, 200 мг/кг витамина Е, 25 мг/кг S-аденозилметионина). Материал для анализа забирали через 7 дней после индукции эпилептического статуса, терапию начинали через час после остановки судорог. \times – гены непригодные для использования в качестве референсных согласно алгоритму geNorm ($M > 0.5$), по оси ординат указан объединенный ранг стабильности гена, рассчитанный на основании геометрического усреднения рангов, рассчитанных 4 алгоритмами. Слева от графиков приведены условные границы начала (верхний рисунок) и окончания (нижний рисунок) забора материала для анализа согласно атласу крысиного мозга в стереотактических координатах [26] (дорзальный гиппокамп: Interaural 6.60...4.56 Bregma -2.40 ... -4.44 ; височная кора: Interaural 6.24...4.32 Bregma -2.76 ... -4.68).

Таблица 1. Праймеры и зонды для количественной ПЦР

Название гена Номер в базе данных RefSeq	Последовательность 5'-3' (прямой, обратный, зонд)	Ссылка на источник
<i>Gapdh</i> ¹ NM_017008	TGCACCACCAACTGCTTAG GGATGCAGGGATGATGTTT ATCACGCCACAGCTTTCCAGAGGG*	[17]
<i>Ppia</i> ² NM_017101	AGGATTCATGTGCCAGGGTG CTCAGTCTTGGCAGTGCAGA CACGCCATAATGGCACTGGTGGCA&	[18]
<i>B2m</i> ¹ NM_012512	TGCCATTTCAGAAACTCCCC GAGGAAGTTGGGCTTCCCATT ATCAAGTGTACTCTCGCCATCCACCG&	[19]
<i>Actb</i> ¹ NM_031144	TGTCACCAACTGGGACGATA GGGGTGTGAAGGTCTCAAA CGTGTGGCCCTGAGGAGCAC#	Прямой и обратный праймер – [20] зонд – [14]
<i>Ywhaz</i> ³ NM_013011	GATGAAGCCATTGCTGAACCTTG GTCTCCTGGGTATCCGATGTC TGAAGAGTCGTACAAAGACAGCACGC&	Прямой и обратный праймер – [21] зонд – [14]
<i>Rpl13a</i> ² NM_173340	GGATCCCTCCACCTATGACA CTGGTACTTCCACCCGACCTC CTGCCCTCAAGGTTGTGCGGCT#	Прямой и обратный праймер – [22] зонд – [14]
<i>Pgk1</i> ³ NM_053291	ATGCAAAGACTGGCCAAGCTAC AGCCACAGCCTCAGCATATTTT TGCTGGCTGGATGGGCTTGGA*	Прямой и обратный праймер – [21] зонд [14]
<i>Hprt1</i> ³ NM_012583	TCCTCAGACCGCTTTTCCCGC TCATCATCACTAATCACGACGCTGG CCGACCGTTCTGTCTCATGTCGACCCT#	Прямой и обратный праймер – [23] зонд – [14]
<i>Sdha</i> ² NM_130428	AGACGTTTGACAGGGGAATG TCATCAATCCGCACCTTGTA ACCTGGTGGAGACGCTGGAGCT*	Прямой и обратный праймер – [24] зонд – [14]
<i>Il1b</i> NM_031512	CACCTCTCAAGCAGAGCACAG GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC TGTCCCGACCATTGCTGTTTCCTAG #	[25]

* Мечены флуорофором R6G и гасителем флуоресценции BHQ2; # – мечены FAM и гасителем флуоресценции BHQ1 quencher; & – мечены флуорофором ROX и гасителем флуоресценции BHQ2; ^{1, 2, 3} – тест-системы с одинаковым индексом входят в состав одного мультиплекса.

ности: geNorm [3], Normfinder [15], BestKeeper [5], comparative Delta-Ct [4] и формирующего объединенный рейтинг стабильности на основании геометрического усреднения рангов каждого гена, полученного каждым из этих методов.

Экспрессию изучаемых генов рассчитывали относительно трех оптимальных референсных для конкретной области с помощью $2^{-\Delta\Delta Ct}$ метода [16]. Данные нормировали по среднему значению контрольной группы (инъекции LiCl) и логарифмировали по основанию 2, чтобы привести к нормальному распределению. Статистическую обработку проводили в программе GraphPad Prism 7.00 с применением однофакторного дисперсионного анализа и апостериорного попарного сравнения с применением критерия Даннета (в качестве группы сравнения использовались нелеченные животные после эпилептического статуса). Для поиска выпадающих значений применяли метод Грабба.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мы оценили стабильность экспрессии 9 референсных генов, традиционно используемых для нормализации данных ОТ-кПЦР, в гиппокампе и височной коре головного мозга крыс в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели височ-

ной эпилепсии на фоне отдельной или совместной терапии противовоспалительными (рецепторный антагонист IL-1) и антиоксидантными (витамин С, витамин Е, S-аденозилметионин) препаратами.

Согласно алгоритму *geNorm*, ориентируясь на критерий $M > 0.5$, в дорзальном гиппокампе 8 из 9 проанализированных генов, исключая только ген *B2m*, могут использоваться в качестве референсных (рис. 1а). Используя объединенный рейтинг стабильности на основании геометрического усреднения рангов каждого гена, полученного с помощью четырех методов, мы выявили, что наиболее стабильно экспрессируются гены *Gapdh*, *Pgk1* и *Hprt1*.

В височной коре экспрессия изученных генов в целом была менее стабильной (рис. 1б). Согласно алгоритму *geNorm*, четыре гена (*Actb*, *Gapdh*, *B2m*, *Ywhaz*) экспрессировались нестабильно и были непригодны для нормализации данных ОТ-кПЦР. По объединенному рейтингу наиболее стабильными референсными генами оказались *Pgk1*, *Sdha*, *Ppia*.

Мы рассчитали уровень экспрессии 6 изученных генов относительно трех оптимальных референсных генов для каждой изученной области (рис. 2 и 3).

В дорзальном гиппокампе обнаружено увеличение экспрессии генов *B2m* и *Actb* после эпилептического статуса, при этом ни один из исследованных видов терапии не подавлял этих изменений (рис. 2; *B2m*: $F(4.37) = 4.777$; $p < 0.01$ и *Actb*: $F(4.36) = 3.674$; $p = 0.01$). В височной области коры значимых изменений экспрессии генов обнаружено не было (рис. 3).

Чтобы оценить, как может повлиять на оценку экспрессии генов интересовавший выбор референсных генов, мы оценили экспрессию гена провоспалительного цитокина интерлейкина-1 бета (*Il1b*) в гиппокампе крыс, нормируя относительно уровня экспрессии каждого из трех наиболее стабильных референсных генов (*Gapdh*, *Pgk1*, *Hprt1*), их геометрического среднего, или относительно двух самых нестабильных (*B2m* и *Actb*) (рис. 4). При использовании наиболее стабильных референсных генов было выявлено значимое повышение уровня экспрессии гена *Il1b* после эпилептического статуса (геометрическое среднее: *F(4.35) = 3.8*, $p = 0.01$; *Hprt1*: $F(4.35) = 4.3$, $p < 0.01$; *Pgk1*: $F(4.35) = 3.9$, $p = 0.01$; *Gapdh*: $F(4.35) = 3.3$, $p = 0.02$). В то же время при нормализации относительно экспрессии гена *B2m* или *Actb* изменений экспрессии не выявлялось (*B2m*: $F(4.34) = 0.52$, $p = 0.72$; *Actb*: $F(4.34) = 1.9$, $p = 0.13$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мы изучили стабильность экспрессии 9 референсных генов в височной коре и гиппокампе крыс при экспериментальном эпилептогенезе – в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии – на фоне применения экспериментальной противовоспалительной (рецепторный антагонист IL-1), антиоксидантной (витамин С, витамин Е, S-аденозилметионин) терапии и их сочетания. Ранее подобных исследований с литий-пилокарпиновой моделью не проводилось, однако были работы с моделями электрической стимуляции перфорантного пути и каинатной моделью, а также с пилокарпиновой моделью без использования хлорида лития [27, 28]. В нашей недавней работе на пентилентетразоловой модели острых судорог мы показали, что выбор устойчивых референсных генов для гиппокампа и разных областей коры сильно различается, что воспроизвелось и в настоящем исследовании. Так, экспрессия гена *Gapdh* была наиболее стабильной в гиппокампе, в то время как в височной коре она не была стабильной (рис. 1). С другой стороны, стабильность экспрессии генов *Ppia* и *Sdha* была высокой в височной коре, но не в гиппокампе (рис. 1, 2).

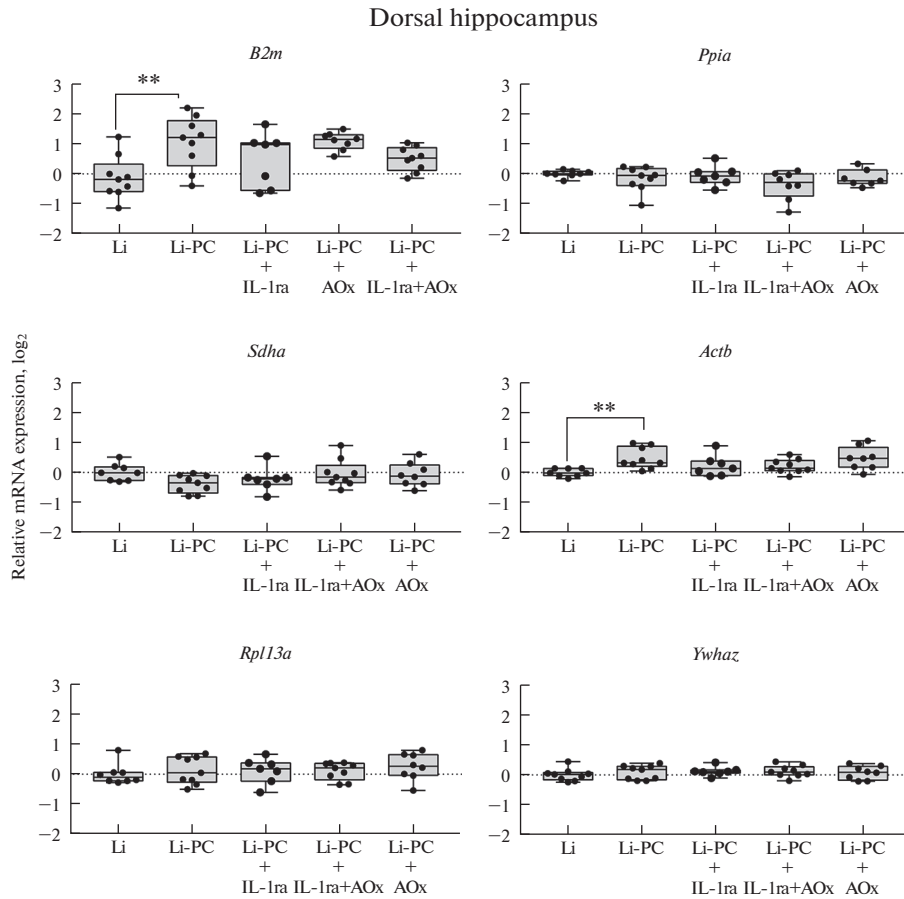


Рис. 2. Экспрессия референсных генов в дорзальном гиппокампе крыс в латентную фазу (7 дней после индукции) литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии на фоне раздельной и комбинированной терапии противовоспалительным цитокином IL-1ra и смесью антиоксидантов). Li – контрольные животные без индукции судорог (только введение хлорида лития), Li-PC – животные, у которых вызвали эпилептический статус путем введения пилокарпина; IL-1ra – лечение рецепторным антагонистом интерлейкина-1 (анакинра, 100 мг/кг в сут), AOx – лечение смесью антиоксидантов (100 мг/кг витамина С, 200 мг/кг витамина Е, 25 мг/кг S-аденозилметионина в сутки). ** – $p < 0.01$ (однофакторный дисперсионный анализ с последующим попарным сравнением критерием Даннета – в качестве группы сравнения использованы нелеченные животные после эпилептического статуса; группа “Li” использована для демонстрации эффектов пилокарпиновых судорог на изучаемые показатели, напрямую не сравнивалась с животными после судорог, получавшими терапию)

В период эпилептогенеза в каинатной модели гены *Ppia* и *Actb* были описаны как оптимальные референсные гены в гиппокампе [27]. Мы же выявили, что в литий-пилокарпиновой модели, по крайней мере на фоне экспериментальной терапии, их экспрессия мало стабильна (рис. 1). Стоит также отметить, что в модели пентилентетразоловых судорог экспрессия гена *Ppia* была стабильна в дорзальном гиппокампе [29]. Интересно, что ранее *Actb* называли одним из наиболее стабильных референсных генов в гиппокампе крыс при эпилептогенезе, индуцированном системным введением пилокарпина (хлоридом лития) [28], однако наше исследование не подтверждает данные Marques с коллегами. Наблюдаемые расхождения мо-

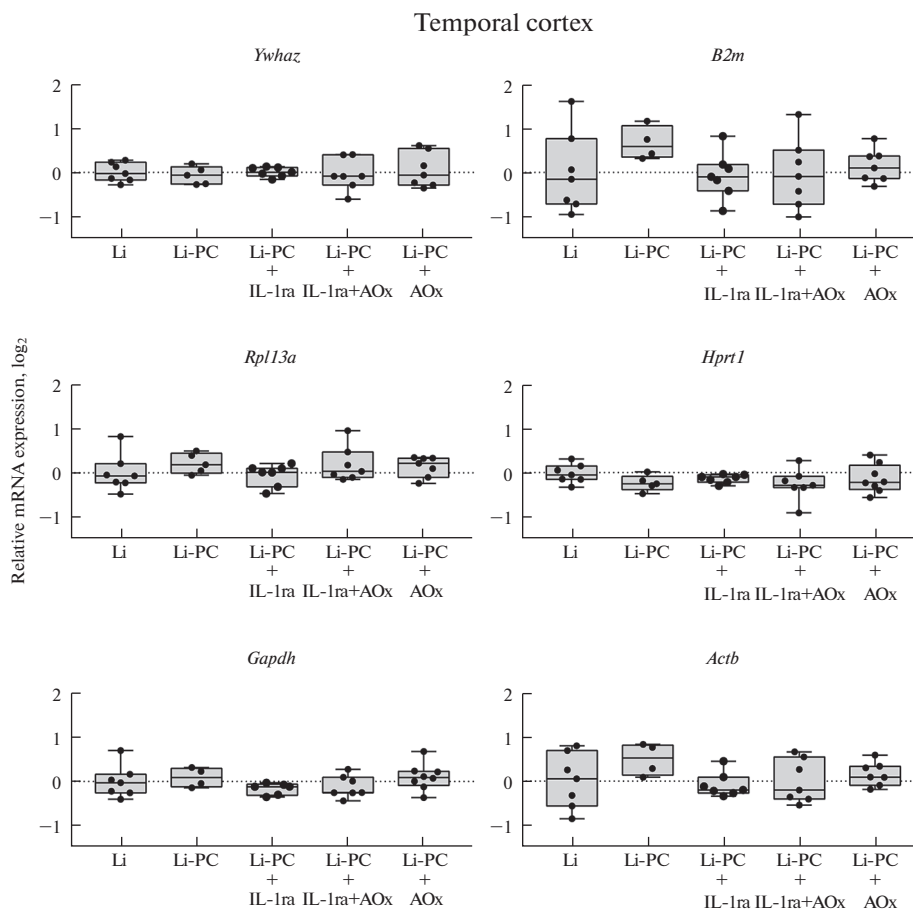


Рис. 3. Экспрессия референсных генов в височной области коры головного мозга крыс в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии на фоне отдельной и комбинированной терапии противовоспалительным цитокином IL-1ra. Li – контрольные животные без индукции судорог (только введение хлорида лития), Li-PC – животные, у которых вызывали эпилептический статус путем введения пилокарпина; IL-1ra – лечение рецепторным антагонистом интерлейкина-1 (анакинра, 100 мг/кг в сутки), АОx – лечение смесью антиоксидантов (100 мг/кг витамина С, 200 мг/кг витамина Е, 25 мг/кг S-аденозилметионина в сутки).

гут объяснены иным выбором сроков: в процитированной работе стабильность экспрессии оценивали сразу после и через сутки после инъекции хемоконвульсанта, когда эффекты эпилептогенеза еще не выражены. Кроме того, в нашем случае эффекты вводимых препаратов могли дополнительно сказаться на стабильности экспрессии изучаемых генов. Данное противоречие подчеркивает важность экспериментального подбора оптимальных референсных генов с учетом исследуемой области мозга и экспериментальных условий, так как даже в близких моделях стабильность одних и тех же референсных генов может кардинально различаться.

В настоящей работе продемонстрировано усиление экспрессии генов *Actb* и *B2m* в гиппокампе крыс при экспериментальной индукции эпилептогенеза в литий-пилокарпиновой модели, при этом данные эффекты были устойчивы к проведенной антиоксидантной и противовоспалительной терапии (рис. 2). Данный феномен требует дальнейшего изучения, так как, по-видимому, связан с патогенетическими

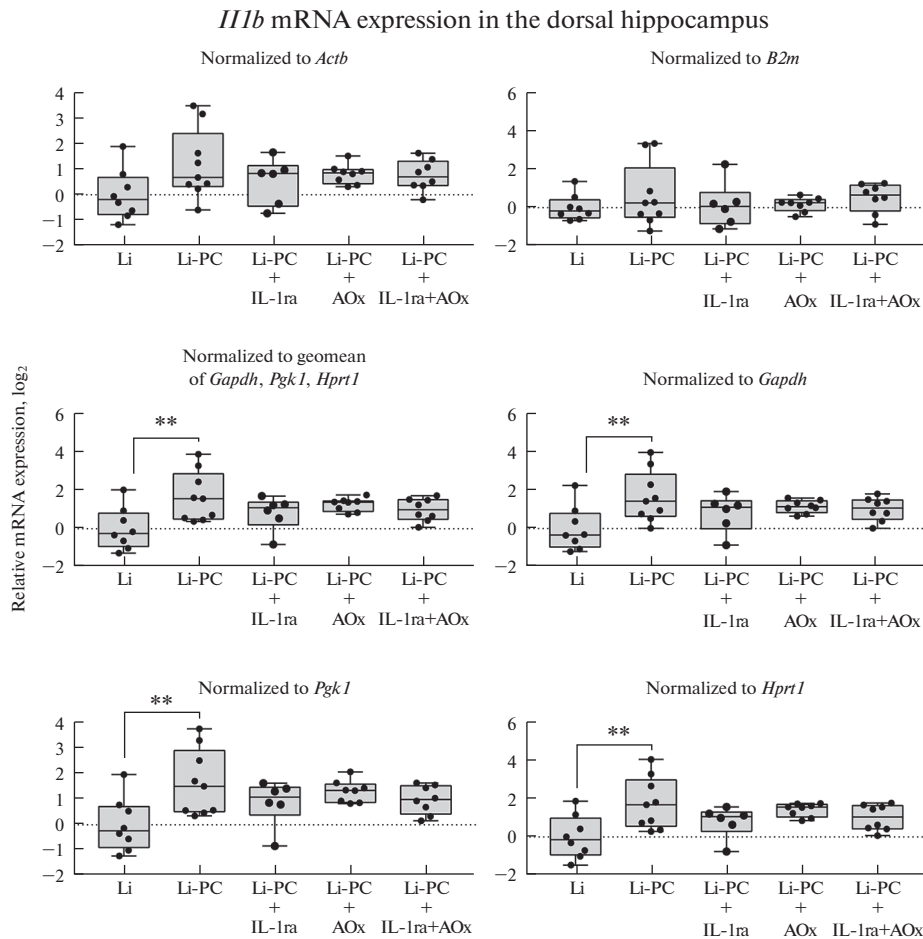


Рис. 4. Стратегия нормирования данных ОТ-кПЦР влияет на обнаружение изменений экспрессии гена *I11b* в дорзальной области гиппокампа крыс в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии. Li – контрольные животные без индукции судорог (только введение хлорида лития), Li-PC – животные, у которых вызывали эпилептический статус путем введения пилокарпина; IL-1ra – лечение рецепторным антагонистом интерлейкина-1 (анакинра, 100 мг/кг в сут), АОx – лечение смесью антиоксидантов (100 мг/кг витамина С, 200 мг/кг витамина Е, 25 мг/кг S-аденозилметионина в сутки). Уровень экспрессии гена *I11b* был нормирован относительно уровня экспрессии каждого из трех наиболее стабильных референсных генов (*Gapdh*, *Pgk1*, *Hprt1*), их геометрического среднего, или относительно двух самых нестабильных (*B2m* и *Actb*); ** $p < 0.01$ (однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным критерием Даннета – попарное сравнение всех групп с нелечеными животными после эпилептического статуса).

перестройками – либо изменениями транскрипции, либо соотношением клеточных элементов нервной ткани. С учетом того, что *Actb* является одним из популярнейших референсных генов, часто используемых как единичный без дополнительной проверки [30], следует с осторожностью относиться к интерпретации данных ОТ-кПЦР в случае, если не проводится проверка стабильности референсных генов.

В нашем исследовании продемонстрировано, что выбор референсных генов может существенно повлиять на результаты исследования. Например, при нормализа-

ции результатов относительно генов *B2m* или *Actb*, которые в данной модели нежелательно использовать в качестве референсных, мы не наблюдали значимого увеличения экспрессии гена *Ilfb*, которое обнаруживается при нормализации относительно любого из трех оптимальных референсных генов (рис. 4). Схожие эффекты были ранее продемонстрированы при анализе экспрессии гена белка програнулина (*Pgrn*) в гиппокампе крыс в вальпроатной модели расстройств аутистического спектра: неоптимальный выбор стратегии нормализации приводил не только к исчезновению статистически выявляемых эффектов, но даже к ложному выявлению противоположных реальным изменений содержания целевой мРНК [6]. Стоит также отметить, что в упомянутой работе *Gapdh* оказывался наименее стабильным и невалидным референсным геном в гиппокампе, в то время как в настоящей работе (рис. 1), так и в наших предыдущих исследованиях на модели пентилентетразоловых судорог [31] он оказывается наиболее стабильным в дорзальном гиппокампе.

Таким образом, мы определили регионспецифичные оптимальные референсные гены для оценки уровня содержания целевых мРНК в дорзальном гиппокампе (*Gapdh*, *Pgk1*, *Hprt1*) и височной коре (*Pgk1*, *Sdha*, *Ppia*) головного мозга крыс в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии на фоне сочетанной или раздельной экспериментальной противовоспалительной и антиоксидантной терапии. При этом было выявлено значимое усиление экспрессии генов *Actb* и *B2m* в дорзальном гиппокампе, которое не подавлялось ни применением IL-1ra, ни смеси антиоксидантов (витамин С, витамин Е, аденозилметионин), ни их сочетанием.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 20-75-00127).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А.В.З., А.П.Ш., А.В.Д.), сбор данных (А.В.Д., М.О.Г., А.П.Ш.), обработка данных (М.В.З., А.А.К., А.П.Ш.), написание и редактирование манускрипта (М.В.З., А.А.К., А.П.Ш., М.О.Г., А.М.И., А.В.З.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55: 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
2. Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J (2010) How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods* 50: 227–230. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.11.001>
3. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
4. Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL (2006) Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol* 7: 33. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-33>
5. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Nevians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26: 509–515.
6. Zhou J, Zhang X, Ren J, Wang P, Zhang J, Wei Z, Tian Y (2016) Validation of reference genes for quantitative real-time PCR in valproic acid rat models of autism. *Mol Biol Rep* 43: 837–847. <https://doi.org/10.1007/s11033-016-4015-x>

7. Schwarz AP, Kovalenko AA, Malygina DA, Postnikova TY, Zubareva OE, Zaitsev AV (2020) Reference Gene Validation in the Brain Regions of Young Rats after Pentylenetetrazole-Induced Seizures. *Biomedicines* 8: 239.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines8080239>
8. Löscher W (2017) Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. *Neurochem Res* 42: 1873–1888.
<https://doi.org/10.1007/s11064-017-2222-z>
9. Terrone G, Balosso S, Pauletti A, Ravizza T, Vezzani A (2020) Inflammation and reactive oxygen species as disease modifiers in epilepsy. *Neuropharmacology* 167: 107742.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107742>
10. Dyomina AV, Kovalenko AA, Zakharova MV, Postnikova TY, Griflyuk AV, Smolensky IV, Antonova IV, Zaitsev AV (2022) MTEP, a Selective mGluR5 Antagonist, Had a Neuroprotective Effect but Did Not Prevent the Development of Spontaneous Recurrent Seizures and Behavioral Comorbidities in the Rat Lithium-Pilocarpine Model of Epilepsy. *Int J Mol Sci* 23: 497.
<https://doi.org/10.3390/ijms23010497>
11. Racine RJ (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32: 281–294.
[https://doi.org/10.1016/0013-4694\(72\)90177-0](https://doi.org/10.1016/0013-4694(72)90177-0)
12. Ming Z, Fan Y, Yang X, Lautt WW (2006) Synergistic protection by S-adenosylmethionine with vitamins C and E on liver injury induced by thioacetamide in rats. *Free Radic Biol Med* 40: 617–624.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.09.034>
13. Dyomina AV, Zubareva OE, Smolensky IV, Vasilev DS, Zakharova MV, Kovalenko AA, Schwarz AP, Ischenko AM, Zaitsev AV (2020) Anakinra Reduces Epileptogenesis, Provides Neuroprotection, and Attenuates Behavioral Impairments in Rats in the Lithium-Pilocarpine Model of Epilepsy. *Pharmaceuticals (Basel)* 13: 340.
<https://doi.org/10.3390/ph13110340>
14. Schwarz AP, Malygina DA, Kovalenko AA, Trofimov AN, Zaitsev AV (2020) Multiplex qPCR assay for assessment of reference gene expression stability in rat tissues/samples. *Mol Cell Probes* 53: 101611.
<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101611>
15. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64: 5245–5250.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>
16. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25: 402–408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
17. Lin W, Burks CA, Hansen DR, Kinnamon SC, Gilbertson TA (2004) Taste receptor cells express pH-sensitive leak K⁺ channels. *J Neurophysiol* 92: 2909–2919.
<https://doi.org/10.1152/jn.01198.2003>
18. Malkin SL, Amakhin DV, Veniaminova EA, Kim KK, Zubareva OE, Magazanik LG, Zaitsev AV (2016) Changes of ampa receptor properties in the neocortex and hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Neuroscience* 327: 146–155.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.04.024>
19. Yamaguchi M, Yamauchi A, Nishimura M, Ueda N, Naito S (2005) Soybean Oil Fat Emulsion Prevents Cytochrome P450 mRNA Down-Regulation Induced by Fat-Free Overdose Total Parenteral Nutrition in Infant Rats. *Biol Pharm Bull* 28: 143–147.
<https://doi.org/10.1248/bpb.28.143>
20. Bonefeld BE, Elfving B, Wegener G (2008) Reference genes for normalization: A study of rat brain tissue. *Synapse* 62: 302–309.
<https://doi.org/10.1002/syn.20496>
21. Langnaese K, John R, Schweizer H, Ebmeyer U, Keilhoff G (2008) Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in a rat asphyxial cardiac arrest model. *BMC Mol Biol* 9: 53.
<https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-53>
22. Swijsen A, Nelissen K, Janssen D, Rigo J-M, Hoogland G (2012) Validation of reference genes for quantitative real-time PCR studies in the dentate gyrus after experimental febrile seizures. *BMC Res Notes* 5: 685.
<https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-685>
23. Kyzar EJ, Zhang H, Sakharkar AJ, Pandey SC (2017) Adolescent alcohol exposure alters lysine demethylase 1 (LSD1) expression and histone methylation in the amygdala during adulthood. *Addict Biol* 22: 1191–1204.
<https://doi.org/10.1111/adb.12404>
24. Pohjanvirta R, Niittynen M, Lindén J, Boutros PC, Moffat ID, Okey AB (2006) Evaluation of various housekeeping genes for their applicability for normalization of mRNA expression in dioxin-treated rats. *Chem Biol Interact* 160: 134–149.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.01.001>

25. *Rioja I, Bush KA, Buckton JB, Dickson MC, Life PF* (2004) Joint cytokine quantification in two rodent arthritis models: kinetics of expression, correlation of mRNA and protein levels and response to prednisolone treatment. *Clin Exp Immunol* 137: 65–73.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02499.x>
26. *Paxinos G, Watson C* (2005) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates – The New Coronal Set*, 5th ed. Elsevier Acad Press. San Diego, CA.
27. *Sadangi C, Rosenow F, Norwood BA* (2017) Validation of reference genes for quantitative gene expression analysis in experimental epilepsy. *J Neurosci Res* 95: 2357–2366.
<https://doi.org/10.1002/jnr.24089>
28. *Marques TEBS, de Mendonça LR, Pereira MG, de Andrade TG, Garcia-Cairasco N, Paçó-Larson ML, Gitaí DLG* (2013) Validation of Suitable Reference Genes for Expression Studies in Different Pilocarpine-Induced Models of Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *PLoS One* 8: e71892.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071892>
29. *Schwarz AP, Kovalenko AA, Malygina DA, Postnikova TY, Zubareva OE, Zaitsev AV* (2020) Reference Gene Validation in the Brain Regions of Young Rats after Pentylentetrazole-Induced Seizures. *Biomedicines* 8: 239.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines8080239>
30. *Chapman JR, Waldenström J* (2015) With Reference to Reference Genes: A Systematic Review of Endogenous Controls in Gene Expression Studies. *PLoS One* 10: e0141853.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141853>
31. *Schwarz AP, Kovalenko AA, Malygina DA, Postnikova TY, Zubareva OE, Zaitsev AV* (2020) Reference Gene Validation in the Brain Regions of Young Rats after Pentylentetrazole-Induced Seizures. *Biomedicines* 8: 239.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines8080239>

The Reference Gene Validation in the Brain of Rats during Antioxidant and Anti-Inflammatory Treatment in the Lithium–Pilocarpine Model of Temporal Epilepsy

**A. P. Schwarz^{a, *}, A. V. Dyomina^a, M. V. Zakharova^a, A. A. Kovalenko^a,
M. O. Gryaznova^a, A. M. Ischenko^b, and A. V. Zaitsev^a**

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of RAS, Saint Petersburg, Russia*

^b*Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency, Saint Petersburg, Russia*

^{*}*e-mail:aleksandr.pavlovich.schwarz@gmail.com*

Reverse transcription combined with quantitative (real-time) polymerase chain reaction (RT-qPCR) is the gold standard for assessing gene expression, but requires careful selection of valid reference genes to normalize the results. The aim of this work was to determine the optimal reference genes for RT-qPCR experiments in the temporal cortex and dorsal hippocampus of the rat brain in the latent phase (the period of epileptogenesis before the onset of spontaneous recurrent seizures) of the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy during the separate or combined treatment with recombinant pro-inflammatory cytokine, an interleukin-1 receptor antagonist (100 mg/kg i.p. per day) and a balanced antioxidant cocktail (100 mg/kg vitamin C, 200 mg/kg vitamin E, 25 mcg/kg S-adenosylmethionine i.p. per day). The expression of 9 reference genes (*Actb*, *B2m*, *Gapdh*, *Rpl13a*, *Sdha*, *Ppia*, *Hprt1*, *Pgk1*, *Ywhaz*) was analyzed. Using the RefFinder® online tool, we determined the optimal reference genes for assessing the levels of target mRNAs in the dorsal hippocampus (*Gapdh*, *Pgk1*, *Hprt1*) and temporal cortex (*Pgk1*, *Sdha*, *Ppia*). At the same time, we revealed a significant increase in the expression of the *Actb* and *B2m* genes in the dorsal hippocampus, which was not suppressed either by the treatment with IL-1ra, or by a mixture of antioxidants (vitamin C, vitamin E, adenosylmethionine), or by their combination. Based on this, the *Actb* and *B2m* genes may be involved in the epileptogenesis and cannot be used as reference genes in epileptic models. Thus, the results of our work highlight the importance of careful selection of reference genes.

Keywords: RT-PCR, reference genes, gene expression, mRNA, temporal lobe epilepsy, lithium-pilocarpine model, brain, real time PCR