

ВЫБОР РЕФЕРЕНТНЫХ ГЕНОВ ДЛЯ АНАЛИЗА ТРАНСКРИПЦИИ ПРИ МИОКАРДИТЕ

© А. Л. Рунов,^{1,*} Е. В. Курчакова,¹ Д. А. Хащевская,²
О. М. Мусеева,² М. С. Вонский¹

¹ Институт цитологии РАН и

² Федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург;

* электронный адрес: tsinakan@gmail.com

Миокардит — заболевание сердца, сопровождающееся воспалительными изменениями и некрозом кардиомиоцитов. Диагностика миокардита основана на использовании сложного и небезопасного метода эндомикардиальной биопсии (ЭМБ). Известно, что развитие миокардита приводит к изменениям экспрессии некоторых генов не только в тканях сердца, но и в клетках крови. Таким образом, профили экспрессии могут быть рассмотрены как возможные биомаркеры этой патологии. Однако панель референтных генов, экспрессия которых в исследуемом материале не зависит от развития миокардита, до сих пор не определена. В настоящей работе исследовали содержание мРНК шести генов домашнего хозяйства в препаратах ЭМБ и клеток крови. Предложен алгоритм обработки результатов ПЦР-РВ, полученных в условиях лимитированного количества образца. Показано, что *GAPDH* и *HPRT1* составляют минимальную панель референтных генов для исследования экспрессии при миокардите в препаратах ЭМБ и клеток крови.

Ключевые слова: миокардит, мРНК, ОТ-ПЦР-РВ, референтный ген, экспрессия генов.

Принятые сокращения: ОТ-ПЦР-РВ — ПЦР в реальном времени после обратной транскрипции, п. о. — пары оснований, ЭМБ — эндомикардиальная биопсия, Ct — пороговый цикл.

Под миокардитом понимают морфологически и иммуногистохимически документированный воспалительный процесс в сердечной мышце, сопровождающийся дегенеративными изменениями и некрозом кардиомиоцитов. Развитие миокардита, как правило, обусловлено инфекцией, чаще всего вирусной, а также аутоиммунными системными заболеваниями, действием токсинов и (или) лекарственных препаратов. Вследствие того, что миокардит может быть вызван целым рядом различных этиологических агентов и имеет различные клинические проявления, его диагностика крайне затруднена, что негативно влияет на выбор правильного лечения больного (Heidecker et al., 2011).

Золотым стандартом для диагностики миокардита являются критерии экспертов Европейского общества кардиологов, основанные на гистологическом и иммуногистохимическом анализе патологически измененных тканей эндомикардиальной биопсии (ЭМБ) (Caforio et al., 2013). Прижизненная биопсия тканей сердца требует высокой квалификации исполнителя и проводится только в медицинских учреждениях, оказывающих высокоспециализированную медицинскую помощь. Кроме того, гистологическое и иммуногистохимическое исследование биоптатов не используется для рутинной диагностики, что затрудняет получение статистически значимого массива данных. Современные неинвазивные методы визуализации, в том числе магнитно-резонансная томография, ограничены для диагностической оценки из-за их относи-

тельно низкой чувствительности и специфичности по сравнению с проверенными методами биопсии. Поэтому для точной диагностики миокардита требуется объективный метод выявления, который являлся бы безопасным для человека, максимально достоверным и простым в использовании.

Исследование экспрессии генов при миокардитах, выполненное с помощью гибридизации кДНК на микрочипах, позволило выявить целый ряд генов, экспрессия которых меняется в пораженных кардиомиоцитах (Kittleson et al., 2004, 2005; Cunha-Neto et al., 2005; Ruppert et al., 2008; Heidecker et al., 2011). Однако поскольку аналитическим методом количественного исследования экспрессии генов является ПЦР в реальном времени после обратной транскрипции (ОТ-ПЦР-РВ), эти исследования несут, скорее, оценочный характер (Derveaux et al., 2010). Кроме того, патологические изменения профиля транскрипции в кардиомиоцитах при миокардите могут модулировать транскрипцию в клетках крови (Brown et al., 2002; Margulies et al., 2009; Shehadeh, Hare, 2013). Таким образом, перспективным представляется сопоставление экспрессии генов в тканях сердца и клетках крови при миокардите, направленное на идентификацию специфических профилей экспрессии как биомаркеров миокардита. Решению этой задачи должно предшествовать определение панели референтных генов.

Действительно, метод ПЦР-РВ является относительно простым аналитическим методом. Содержание гена-мишени

Таблица 1

Последовательности праймеров для ПЦР-РВ

Ген (Accession)	Прямой праймер	Обратный праймер	Длина продукта, п. о.
<i>GAPDH</i> (NM_002046)	5'-CCACTCCTCCACSTTTGAC-3'	5'-ACCCTGTTGCTGTAGCCA-3'	102
<i>ActB</i> (NM_001101)	5'-ACCGAGCGCGGCTACAG-3'	5'-CTTAATGTCACGCACGATTTCC-3'	60
<i>HPRT1</i> (NM_000194)	5'-AATTATGGACAGGACTGAACGTCTTGCT-3'	5'-TCCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTATAGC-3'	117
<i>HMBS</i> (NM_000190)	5'-CACCCACACACAGCCTACTT-3'	5'-GTTTTCTCCGCCGTTGCAG-3'	75
<i>RPL5</i> (NM_000969)	5'-GCTCGGAAACGCTTGGTGATA-3'	5'-CCCTCTATACGGGCATAAGCAAT-3'	119
<i>B2M</i> (NM_004048)	5'-TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT-3'	5'-TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT-3'	86

определяют по отношению к стандартному образцу или калибратору, количество которого определено. В качестве внутреннего стандарта для ОТ-ПЦР-РВ обычно используют мРНК референтных генов — генов, содержание мРНК которых в исследуемых тканях не изменяется при экспериментальном воздействии или развитии патологии. Для достоверной нормализации результатов ОТ-ПЦР-РВ рекомендуют использовать не менее 2 референтных генов. В качестве меры экспрессии используют отношение количества специфической мРНК в образце к содержанию мРНК референтных генов (Vandesompele et al., 2002).

Задачей данной работы являлся выбор набора референтных генов, применимых для исследования экспрессии генов при миокардите не только в клетках сердца, но и в клетках периферической крови.

Материал и методика

В работе использовали клинический материал, представленный ФМИЦ им. В. А. Алмазова (Санкт-Петербург). Клинический материал представлял собой биоптаты, полученные в результате диагностической ЭМБ и не использованные в иммуногистохимических исследованиях (10 образцов), а также препараты клеток периферической крови (лейкоциты, 10 образцов) пациентов с верифицированным миокардитом. В качестве контрольных образцов использовали фрагменты миокарда доноров ортотопической трансплантации сердца (2 образца) и препараты клеток крови здоровых доноров (лейкоциты, 10 образцов). После забора клинический материал помещали в буфер, ингибирующий РНКазы (Ramalho et al., 2004), и хранили при -70°C .

мРНК выделяли с помощью коммерческого набора AllPrep™ DNA/RNA Micro Kit (QIAGEN, Германия). Чистоту и концентрацию выделенной РНК определяли спектрофотометрически. Целостность мРНК оценивали с помощью электрофореза в денатурирующем геле (5%-ный ПААГ, 6 М мочевины и 0.5-кратный буфер ТВЕ). Для проведения обратной транскрипции использовали коммерческий набор RevertAid (tm) First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва) с олиго(дТ)₁₈-праймерами. Реакцию проводили в объеме 20 мкл, используя до 1 мкг очищенной мРНК в каждой реакции. Обратную

транскрипцию проводили в течение 60 мин при 42°C (в соответствии с инструкцией фирмы-производителя). Полученные образцы кДНК хранили при -20°C не более 3 сут до проведения ПЦР. ПЦР-РВ проводили с помощью амплификатора АНК-64 (ИнаП РАН, Россия) в объеме 20 мкл в 2-кратной повторности с использованием коммерческого набора реагентов для ПЦР-РВ R-412 (Синтол, Россия), концентрация каждого праймера — 200 нМ. Для детекции использовали краситель EvaGreen® (Biotium, США). Для сравнения графиков, полученных при проведении ПЦР-РВ, использовали пороговый метод. Определение эффективности амплификации для разных генов проводили методом построения калибровочных графиков (Rutledge, Cote, 2003). Последовательности праймеров приведены в табл. 1.

После проведения ОТ-ПЦР-РВ данные анализировали с использованием свободно распространяемых программ BestKeeper и Rest-2009 (Pflaff et al., 2002, 2004).

Результаты и обсуждение

В качестве кандидатов в референтные гены были выбраны конститутивно экспрессирующиеся гены, успешно использованные ранее на других моделях: гены глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH*), бета-актина (*ActB*), гипоксантингуанин-фосфорибозилтрансферазы (*HPRT1*), гидроксиметилбилансинтазы (*HMBS*) рибосомального белка L5 (*RPL5*) и бета-2-микроглобулина (*B2M*) (Barber et al., 2005; Rho et al., 2010; Yin et al., 2011). Выбор праймеров осуществлен из последовательностей, депонированных в базе данных RTPrimerDB праймеров и зондов для ПЦР в реальном времени (Pattyn et al., 2003). Пары праймеров были выбраны с учетом экзон-интронной структуры, чтобы исключить амплификацию геномной ДНК. После оптимизации условий проведения ОТ-ПЦР было показано формирование специфического продукта исключительно на матрице кДНК, тогда как на геномной ДНК амплификация не проходила (данные не представлены).

Выбор референтных генов для нормализации результатов ПЦР-РВ основан на анализе экспрессии генов-кандидатов в образцах опытной и контрольной групп. Обработку результатов ОТ-ПЦР-РВ проводят, используя стандартные алгоритмы (BestKeeper, GeNorm и др.), которые

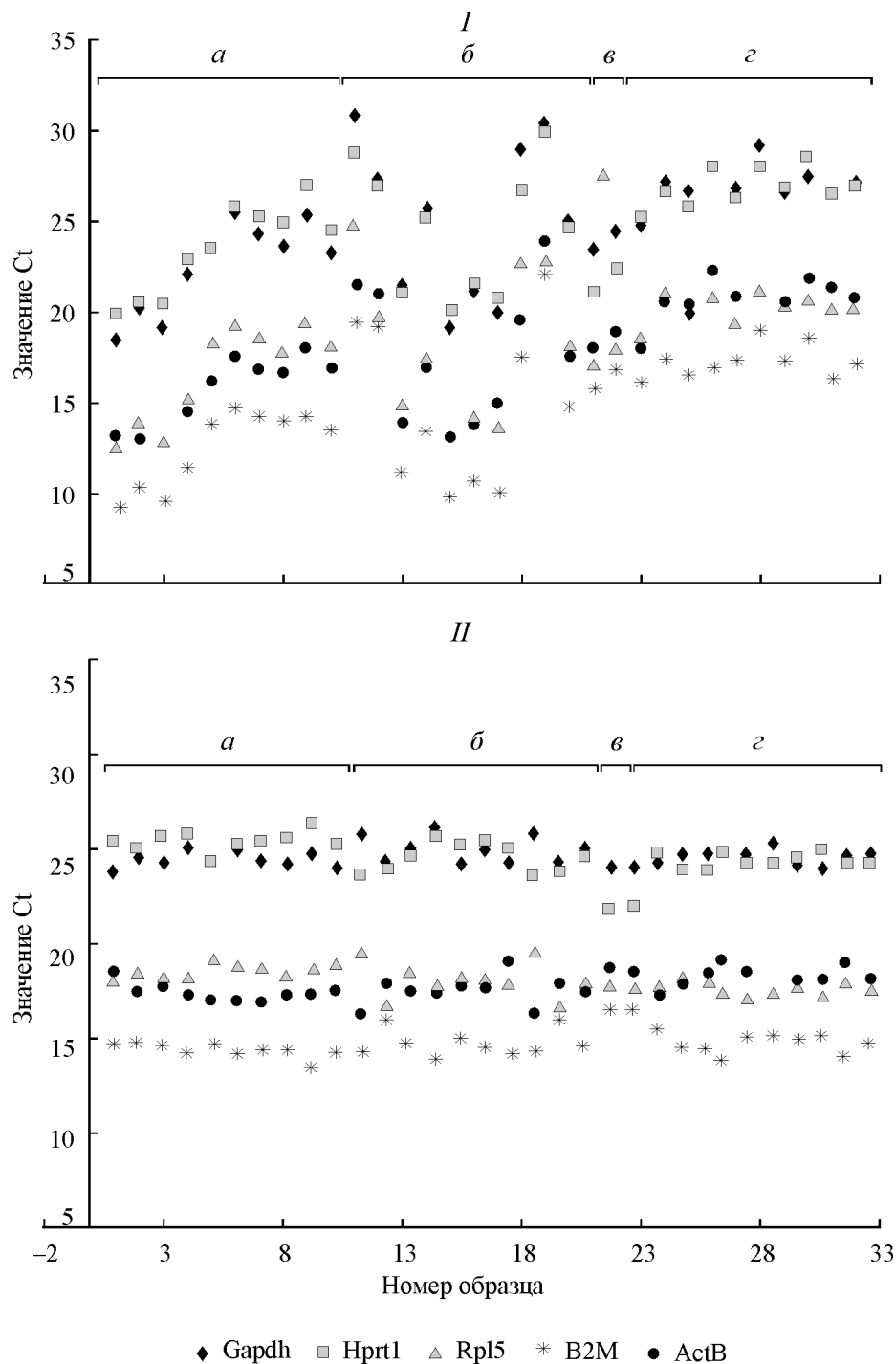


Рис. 1. Выравнивание пороговых циклов (Ct) для 32 образцов.

Результаты ОТ-ПЦР-РВ для мРНК, выделенной из следующих материалов: *a* — образцы 1—10 из клеток крови здоровых доноров, *б* — образцы 11—20 из клеток крови пациентов, *в* — образцы 21, 22 фрагментов миокарда доноров, *г* — образцы 23—32 ЭМБ пациентов. *I* — исходные данные, *II* — выровненные данные.

основаны на поиске попарных корреляций между пороговыми циклами (Ct) для разных генов. При этом концентрации мРНК для всех анализируемых образцов выравнивают, что позволяет использовать в качестве одного из критериев стабильности экспрессии гена разброс значений Ct, соответствующий концентрации его специфической мРНК в пробе. Данный внутренний критерий оказывает существенное влияние на итоговый результат выбора референтных генов.

Исследование экспрессии генов в препаратах ЭМБ затруднено лимитированным количеством образца. Для выделения доступны 1—2 мг клинического материала, количество РНК в котором достаточно мало (общее содержание мРНК менее 1 мкг). Таким образом, концентрация РНК в пробе оказывается ниже предела чувствительности спектрофотометра, что не позволяет контролировать количество материала, используемое для постановки реакции обратной транскрипции. Однако после оптими-

зации условий проведения ОТ-ПЦР-РВ выделяемого из ЭМБ количества мРНК оказывается достаточно для получения воспроизводимых результатов. Поскольку нормировать количество мРНК, используемой в реакции, невозможно, это условие применимости алгоритма поиска референтных генов не может быть выполнено. Вследствие этого необходима дополнительная математическая обработка данных, заключающаяся в искусственном выравнивании концентраций. Выровненные данные далее могут быть обработаны с помощью стандартных программных пакетов.

При анализе результатов ОТ-ПЦР-РВ относительные концентрации мРНК в пробе для генов i и j определяют, используя разность значений соответствующих пороговых циклов. В случае эффективности амплификации, равной 100 % для обоих генов i и j , отношение их концентраций рассчитывают по формуле $2^{\Delta \Delta Ct_{j,i}}$, где $\Delta Ct_{j,i} = (Ct_j - Ct_i)$ (Derveaux et al., 2010). Величины Ct_i и Ct_j отражают общее содержание мРНК в пробе, значения Ct_i и Ct_j могут быть изменены путем смещения: $Ct_i^* = Ct_i + Shft$, что не меняет значения $\Delta Ct_{j,i}$. При этом смещении величина $Shft$ должна быть одинаковой для всех Ct , полученных при амплификации данной пробы.

Подобное смещение не меняет отношение концентраций мРНК в пробе, однако позволяет игнорировать выравнивание количеств мРНК при постановке ОТ-ПЦР-РВ и, таким образом, применять стандартные алгоритмы для анализа полученных данных. Нами предложена следующая процедура предварительной обработки результатов ПЦР-РВ, полученных в условиях лимитированного количества образца.

1. Вычисление геометрического среднего (Ct_{geom}) между Ct всех потенциальных референтных генов (n штук) для каждого образца (индекс i):

$$Ct_{geom,i} = (Ct_{1,i} \cdot \dots \cdot Ct_{n,i})^{1/n}.$$

2. Вычисление геометрического среднего для полученных значений для всех N образцов (определение положения средней линии — Mean):

$$Mean = (Ct_{geom,1} \cdot \dots \cdot Ct_{geom,N})^{1/N}.$$

3. Вычисление сдвигов для каждого образца:

$$Shft_i = Mean - Ct_{geom,i}.$$

4. Сдвиг значений Ct для всех генов для всех образцов:

$$Ct'_{k,i} = Ct_{k,i} + Shft_i.$$

В случае различий в эффективностях амплификации между генами i и j их значения должны быть учтены для коррекции величин Ct для каждого гена непосредственно перед обработкой данных. Действительно, величина Ct отражает число копий специфической мРНК в реакции ОТ-ПЦР-РВ. Однако в зависимости от эффективности амплификации, при изменении концентрации мРНК, скорость накопления продукта для генов i и j будет различаться, что приведет к непропорциональному изменению значений Ct для каждого гена, изменению значения $\Delta Ct_{j,i}$ и соответственно к ошибочному определению отношения числа копий генов i и j .

При 100%-ной эффективности амплификации в каждом цикле ПЦР происходит удвоение целевого продукта.

В реальном эксперименте количество амплифицированной ДНК возрастает по степенному закону пропорционально E^N (N — количество прошедших циклов реакции), эффективность (eff) амплификации рассчитывают по формуле $eff = (E - 1) \cdot 100\%$. В этом случае отношение концентраций мРНК для генов i и j определяют по формуле $(eff_j + 1)^{Ct_j} / (eff_i + 1)^{Ct_i} = 2^{(Ct_j \cdot \log_2(eff_j + 1) - Ct_i \cdot \log_2(eff_i + 1))}$ (Rutledge, Cote, 2003). Тогда пересчет Ct для приведения эффективности амплификации к 100 % может быть выполнен как $Ct^* = Ct \cdot \log_2(eff + 1)$. Таким образом, в случае различающихся эффективностей приведенному выше алгоритму должен предшествовать шаг пересчета Ct , а дальнейшее смещение $Shft$ должно быть произведено с использованием скорректированных величин Ct^* .

Для определения эффективностей амплификации мы использовали мРНК, выделенные из препаратов периферической крови (3 образца) и ЭМБ (3 образца). Различий между эффективностями амплификации каждого конкретного гена при использовании разных типов материала не обнаружили. Таким образом, процедуры пробоподготовки, выделения и очистки мРНК не вносят дополнительных ингибиторов в реакцию ОТ-ПЦР-РВ, эффективность амплификации зависит только от системы праймеров, матрицы и условий проведения реакции. Были получены следующие значения эффективностей амплификации (eff) для генов-кандидатов: $eff(GAPDH) = 99.8 \pm 2.0$; $eff(ActB) = 79.1 \pm 1.8$; $eff(HPRT1) = 85.4 \pm 2.0$; $eff(HMBS) = 95.7 \pm 2.1$; $eff(RPL5) = 78.1 \pm 2.1$; $eff(B2M) = 71.9 \pm 1.9$.

Значения Ct , полученные для всех 32 образцов, корректировали с учетом приведенных значений эффективности амплификации. После этого проводили обработку с помощью предложенного алгоритма сдвига. Результат выравнивания представлен на рис. 1. Видно, что значения Ct для всех образцов для каждого гена стали сопоставимыми.

Возможное изменение профиля экспрессии при выравнивании экспериментально определенных Ct с применением предлагаемого алгоритма было исследовано с применением программы Rest-2009. На рис. 2 представлены профили экспрессии генов-кандидатов, рассчитанные с использованием исходных и модифицированных данных. Видно, что выравнивание не привело к каким-либо изменениям профиля экспрессии после трансформации.

Анализ результатов ОТ-ПЦР-РВ показал, что как в препаратах периферической крови, так и в ЭМБ гены $ActB$, $RPL5$ и $B2M$ имеют относительно высокий уровень экспрессии (пороговый цикл реакций 15—20), тогда как гены $GAPDH$, $HPRT1$ и $HMBS$ можно охарактеризовать как слабо экспрессирующиеся (пороговые циклы для всех образцов более 23). Ген $HMBS$ был исключен из дальнейшего рассмотрения в связи с высокими значениями Ct (более 35) и отклонением формы кривой амплификации от канонической. Полученные для остальных рассмотренных генов данные были трансформированы в соответствии с описанным выше алгоритмом и обработаны с использованием программы BestKeeper. Результаты корреляционного анализа, выполненного с применением программы BestKeeper, представлены в табл. 2.

Коэффициенты корреляции показывают, что все исследованные гены стабильно коэкспрессируются (коэффициенты попарных корреляций больше 0.9) и могут быть использованы в качестве референтных. Наивысшая

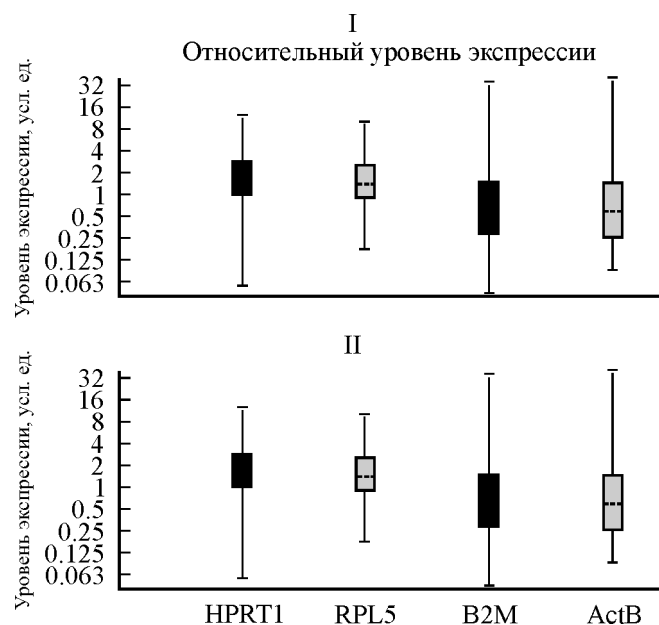


Рис. 2. Профили экспрессии генов для 32 образцов, полученные с применением программы Rest-2009. За референтный ген принят *GAPDH*.

I и II — по исходным и выровненным данным соответственно.

оценка ВК по алгоритму BestKeeper получена для гена *GAPDH* (ВК = 0.988, $P = 0.001$), что служит основанием для его использования в качестве референтного. Остальные гены имеют более низкие оценки ВК, однако поскольку во всех случаях их значения превышают 0.95 (при $P = 0.001$), они также могут быть выбраны для нормирования результатов ОТ-ПЦР-РВ. Предварительные эксперименты по анализу экспрессии генов-потенциальных биомаркеров миокардита показали, что значения C_t для этих генов лежат в диапазоне 25—35 циклов (данные не представлены). Исходя из этого в качестве второго референтного гена был выбран ген *HPRT1*, значения C_t которого лежат в том же диапазоне.

Таким образом, нами исследовано содержание мРНК конститутивно экспрессируемых генов *GAPDH*, *ActB*, *RPL5*, *B2M*, *HPRT1* и *HMBS* в тканях сердца и клетках периферической крови здоровых доноров и пациентов с верифицированным миокардитом. Разработан алгоритм математической обработки результатов ОТ-ПЦР-РВ, эмулирующий выравнивание количеств мРНК, вносимых в реакцию в условиях ограниченного количества образца. Данный алгоритм позволяет применять стандартные под-

ходы оценки референтных генов в случаях, когда количество вносимой в реакцию ОТ-ПЦР-РВ мРНК не может быть выровнено. Показано, что гены *GAPDH*, *ActB*, *RPL5*, *B2M*, *HPRT1* и *HMBS* экспрессируются конститутивно в тканях сердца и клетках периферической крови, при этом уровень их экспрессии не зависит от развития миокардита. *GAPDH* и *HPRT1* представляют собой наилучший минимальный набор референтных генов, обеспечивающих возможность поиска транскрипционных профилей — биомаркеров миокардита — не только в тканях сердца, но и в клетках крови.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «ФМИЦ им. В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ «Молекулярно-генетические механизмы развития вирусных миокардитов и совершенствование методов их диагностики».

Список литературы

- Barber R. D., Harmer D. W., Coleman R. A., Clark B. J. 2005. *GAPDH* as a housekeeping gene: analysis of *GAPDH* mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol. Genomics*. 21 : 389—395.
- Brown H. R., Ni H., Benavides G., Yoon L., Hyder K., Giridhar J., Gardner G., Tyler R. D., Morgan K. T. 2002. Correlation of simultaneous differential gene expression in the blood and heart with known mechanisms of adriamycin-induced cardiomyopathy in the rat. *Toxicol. Pathol.* 30 : 452—469.
- Caforio A. L., Pankuweit S., Arbustini E., Basso C., Gimeno-Blanes J., Felix S. B., Fu M., Helio T., Heymans S., Jahns R., Klingel K., Linhart A., Maisch B., McKenna W., Mogensen J., Pinto Y. M., Ristic A., Schultheiss H.P., Seggewiss H., Tavazzi L., Thiene G., Yilmaz A., Charron P., Elliott P. M. 2013. Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases. *Eur. Heart J.* 34 : 2636—2648.
- Cunha-Neto E., Dzau V. J., Allen P. D., Stamatiou D., Benvenuto L., Higuchi M. L., Koyama N. S., Silva J. S., Kalil J., Liew C. C. 2005. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *Amer. J. Pathol.* 167 : 305—313.
- Derveaux S., Vandesompele J., Hellemans J. 2010. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*. 50 : 227—230.
- Heidecker B., Kittleson M. M., Kasper E. K., Wittstein I. S., Champion H. C., Russell S. D., Hruban R. H., Rodriguez E. R., Baughman K. L., Hare J. M. 2011. Transcriptomic biomarkers for the accurate diagnosis of myocarditis. *Circulation*. 123 : 1174—1184.
- Kittleson M. M., Minhas K. M., Irizarry R. A., Ye S. Q., Edness G., Breton E., Conte J. V., Tomaselli G., Garcia J. G., Hare J. M. 2005. Gene expression in giant cell myocarditis: altered expression of immune response genes. *Int. J. Cardiol.* 102 : 333—340.
- Kittleson M. M., Ye S. Q., Irizarry R. A., Minhas K. M., Edness G., Conte J. V., Parmigiani G., Miller L. W., Chen Y., Hall J. L., Garcia J. G., Hare J. M. 2004. Identification of a gene expression profile that differentiates between ischemic and nonischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 110 : 3444—3451.
- Margulies K. B., Bednarik D. P., Dries D. L. 2009. Genomics, transcriptional profiling, and heart failure. *J. Amer. Coll. Cardiol.* 53 : 1752—1759.
- Pattyn F., Speleman F., De Paeppe A., Vandesompele J. 2003. RTPrimerDB: the Real-Time PCR primer and probe database. *Nucleic Acids Res.* 31 (1) : 122—123.
- Pfaffl M. W., Horgan G. W., Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statisti-

Т а б л и ц а 2

Корреляция между экспрессией генов-кандидатов

Ген	<i>GAPDH</i>	<i>HPRT1</i>	<i>RPL5</i>	<i>B2M</i>	<i>ActB</i>
<i>HPRT1</i>	0.96	—	—	—	—
<i>RPL5</i>	0.98	0.95	—	—	—
<i>B2M</i>	0.96	0.90	0.94	—	—
<i>ActB</i>	0.95	0.92	0.93	0.96	—
ВК ^a	0.99	0.96	0.98	0.98	0.98

Примечание. $P = 0.001$ для всех значений. ^aВК — оценка гена по внутреннему критерию программы BestKeeper.

cal analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30 : e36.

Pfaffl M., Tichopad A., Prgomet C., Neuvians T. 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.

Ramalho A. S., Beck S., Farinha C. M., Clarke L. A., He-da G. D., Steiner B., Sanz J., Gallati S., Amaral M. D., Harris A., Tzetis M. 2004. Methods for RNA extraction, cDNA preparation and analysis of CFTR transcripts. *J. Cystic Fibros.* 3 : 11—15.

Rho H. W., Lee B. C., Choi E. S., Choi I. J., Lee Y. S., Goh S. H. 2010. Identification of valid reference genes for gene expression studies of human stomach cancer by reverse transcription-qPCR. *BMC Cancer.* 10 : 240—253.

Ruppert V., Meyer T., Pankuweit S., Moller E., Funck R. C., Grimm W., Maisch B. 2008. Gene expression profiling from endomyocardial biopsy tissue allows distinction between subentities of dilated cardiomyopathy. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 136 : 360—369.

Rutledge R. G., Cote C. 2003. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res.* 31 : e93.

Shehadeh, L. A. Hare, J. M. 2013. Ribonucleic acid biomarkers for heart failure. Is there a correlation between heart and blood transcriptomics? *JACC. Heart Failure.* 1 : 477—479.

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. *Gen. Biol.* 3 : research0034—research0034.11.

Yin R., Liu X., Liu C., Ding Z., Zhang X., Tian F., Liu W., Yu J., Li L., de Hrabe A. M., Stoeger T. 2011. Systematic selection of housekeeping genes for gene expression normalization in chicken embryo fibroblasts infected with Newcastle disease virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 413 : 537—540.

Поступила 18 XII 2014

SELECTION OF REFERENCE GENES FOR TRANSCRIPTION ANALYSIS FOR MYOCARDITIS STUDIES

*A. L. Runov,¹ * E. V. Kurchakova,¹ D. A. Khaschevskaya,² O. M. Moiseeva,² M. S. Vonsky¹*

¹ Institute of Cytology RAS and ² Federal V. A. Almazov Medical Research Centre, St. Petersburg;
* e-mail: tsinakan@gmail.com

Myocarditis is defined as myocardial inflammation, followed by cardiomyocyte necrosis. Diagnostics of myocarditis is based on unsafe and complicated method of endomyocardial biopsy (EMB). Development of myocarditis might alter gene expression not only in cardiac but in peripheral blood cells (PBC) as well. So, transcription profiles can be considered as possible biomarkers for the given pathology. At the moment, there are no reference genes defined for expression analysis in myocarditis studies. In this study, we analyzed mRNA content of six housekeeping genes in EMB and PBC samples. An algorithm for processing qPCR results obtained under the limited amount of sample is proposed. Set of *GAPDH* and *HPRT1* genes has been selected for normalization of gene expression profiles in cardiac tissue and blood cells under the studies of myocarditis.

Key words: myocarditis, mRNA, RT-qPCR, reference gene, gene expression.