

ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»



АДРЕС РЕДАКЦИИ:

Москва,
ул. Скотопрогонная, д.29/1,
подъезд 15
Зав. редакцией
Галина Ивановна ГАВРИКОВА
8 (495) 670-65-44

E-mail: immunol@idm.msk.ru
www.medlit.ru

Почтовый адрес:

115088, Москва,
Новоостاپовская ул.,
д. 5, стр. 14

ЛР № 010215 от 29.04.97

Все права защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

Сведения о статьях, публикуемых в журнале "Иммунология", помещаются в Excerpta Medica; Biological Abstracts; Chemical Abstracts; INIS Atomindex (International Nuclear Information System); Ulrich's International Periodicals Directory.

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ

Тел. 8 (495) 678-64-84

Ответственность за достоверность информации, содержащейся в рекламных материалах, несут рекламодатели

Редактор *Е. К. Константинова*

Художественный редактор
М. Б. Белякова

Технический редактор *Т. В. Нечаева*
Корректор *А. В. Малахова*
Верстка *Е. М. Архипова*

Сдано в набор 17.10.2014.

Подписано в печать 1.12.2014.

Формат 60 × 88 1/8.

Печать офсетная.

Печ. л. 5,00.

Усл. печ. л. 5,88.

Уч.-изд. л. 8,3.

Заказ 722.

Отпечатано в ООО "Подольская Периодика", 142110, г. Подольск, ул. Кирова, 15

Подписка через интернет:
www.aks.ru? www.pressa-rr.ru

Индексы по каталогу «Роспечать»:

Индекс 71492 – для индивидуальных подписчиков

Индекс 71493 – для предприятий и организаций

Индексы по каталогу «Пресса России»:

27877 – для индивидуальных подписчиков

27878 – для предприятий и организаций

ISSN 0206-4952. Иммунология. 2014.
Т. 35. № 6. 297—336.

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
ИНСТИТУТ ИММУНОЛОГИИ ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА



И.И. Мечников

ИММУНОЛОГИЯ

Двухмесячный научно-практический журнал

ОСНОВАН В ЯНВАРЕ 1980 г.

Журнал входит в перечень периодических научно-технических изданий, рекомендуемых ВАК Российской Федерации для публикации основных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук

Том 35

6

2014

НОЯБРЬ – ДЕКАБРЬ

Главный редактор академик РАН Р. М. ХАИТОВ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Л. П. АЛЕКСЕЕВ, член-корр. РАН, профессор, доктор мед. наук, Р. И. АТАУЛ-ЛАХАНОВ, профессор, доктор мед. наук, Ф.Ю. ГАРИБ, профессор, доктор мед. наук (научный редактор), Г. О. ГУДИМА, профессор, доктор биол. наук, И. С. ГУЩИН, член-корр. РАН, профессор, доктор мед. наук, Н. И. ИЛЬИНА, профессор, доктор мед. наук, З. Г. КАДАГИДЗЕ, профессор, доктор мед. наук, Э. В. КАРАМОВ, профессор, доктор биол. наук, А. В. КАРАУЛОВ, член-корр. РАН, доктор мед. наук, профессор, Н. В. МЕДУНИЦЫН, академик РАН, доктор мед. наук, Р. В. ПЕТРОВ, академик РАН, Б. В. ПИНЕГИН (зам. главного редактора), профессор, доктор мед. наук, Ю. П. РЕЗНИКОВ, профессор, доктор мед. наук, И. Г. СИДОРОВИЧ, профессор, доктор мед. наук, А. С. СИМБИРЦЕВ, профессор, доктор мед. наук, А. В. ФИЛАТОВ, профессор, доктор биол. наук, И. С. ФРЕЙДЛИН, член-корр. РАН, доктор мед. наук, М. Р. ХАИТОВ, доктор мед. наук

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

Г. И. АБЕЛЕВ (Москва), А. В. ЕМЕЛЬЯНОВ (Санкт-Петербург), В. А. КОЗЛОВ (Новосибирск), Л. В. ЛУСС (Москва), А. Н. МАЯНСКИЙ (Нижний Новгород), М. З. САИДОВ (Махачкала), Р. И. СЕПИАШВИЛИ (Москва), Л. П. СИЗЯКИНА (Ростов-на-Дону), Н. Ю. СОТНИКОВА (Иваново), И. А. ТУЗАНКИНА (Екатеринбург), В. А. ЧЕРЕШНЕВ (Екатеринбург)

МЕЖДУНАРОДНЫЙ СОВЕТ:

Т. У. АРИПОВА (Ташкент), С. С. ГАМБАРОВ (Ереван), М. П. ПОТАПНЕВ (Минск)

**IZDATEL'STVO
MEDITSINA**



MOSCOW

115088, Moscow,
Novoostapovskaya str., 5,
building 14

Tel.: +7(495) 670-65-94

E-mail: immunol@idm.msk.ru

www.medlit.ru

ЛП № 010215 от 29.04.97

ISSN 0206-4952

**RUSSIAN ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES
INSTITUTE OF IMMUNOLOGY OF FEDERAL MEDICAL AND BIOLOGICAL AGENCY**



И.И. Мечников

IMMUNOLOGIYA

IMMUNOLOGY

Bimonthly scientific-practical Journal

SINCE 1980

Volume 35

6

2014

NOVEMBER – DECEMBER

**Editor-in-Chief Rakhim KHAITOV,
MD, PhD, DSc, Prof., academician of RAS**

THE EDITORIAL BOARD:

LEONID ALEXEEV, corresponding member of RAS, MD, PhD, DSc., prof., RAVSHAN ATAULLAKHANOV, MD, PhD, DSc., prof., FIRUZ GARIB, MD, PhD, DSc., prof., GEORGIY GUDIMA, DBS, PhD, DSc., prof., IGOR GUSHCHIN, corresponding member of RAS, MD, PhD, DSc., prof., NATALIA ILYNA, MD, PhD, DSc., prof., ZAIRA KADAGIDZE, MD, PhD, DSc., prof., EDWARD KARAMOV, DBS, PhD, DSc., ALEXANDER KARAULOV, corresponding member of RAS, MD, PhD, DSc., prof., NICKOLAY MEDUNITSYN, Academician of RAS, MD, PhD, DSc., REM PETROV, Academician of RAN, BORIS PINEGIN (Deputy Editor), MD, PhD, DSc., prof., YURI RESNIKOV, MD, PhD, DSc., prof., IGOR SIDOROVICH, MD, PhD, DSc., prof., ANDREY SIMBIRTSEV, MD, PhD, DSc., prof., ALEXANDER FILATOV, DBS, PhD, DSc., prof., IRINA FREYDLIN, corresponding member of RAS, MD, PhD, DSc., prof., MUSA KHAITOV, MD, PhD, DSc.

THE EDITORIAL COUNCIL:

GARRY ABELEV (Moscow), ALEXANDER EMEL'YANOV (St. Petersburg), VLADIMIR KOZLOV (Novosibirsk), LUDMILA LUSS (Moscow), ANDREW MAYANSKY (Nizhny Novgorod), ALEXANDER MIKHAYLENKO (Tver), MARAT SAIDOV (Makhachkala), REVAZ SEPIASHVILI (Moscow), LUDMILA SIZYAKINA (Rostov-on-Don), NATALIA SOTNIKOVA (Ivanovo), IRINA TUZANKINA (Ekaterinburg), VALERY CHERESHNEV (Ekaterinburg)

THE INTERNATIONAL EDITORIAL COUNCIL:

T.U. ARIPOVA (Tashkent), S.S. GAMBAROV (Erevan), M.P. POTAPNEV (Minsk)

СОДЕРЖАНИЕ

КЛЕТОЧНАЯ ИММУНОЛОГИЯ

- Васильева О.А., Якушина В.Д., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В.** Роль галектина-1 в регуляции дифференцировки CD4⁺CD25⁺/CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺-клеток in vitro . . . 300
- Чулкина М.М., Трофимов Д.Ю., Кофиади И.А., Алексеев Л.П., Савилова А.М.** Комплексный анализ кинетики экспрессии мРНК цитокинов в реакции бластной трансформации с митогеном КонА 306
- Ширшев С.В., Куклина Е.М., Заморина С.А., Некрасова И.В., Никитина Н.М.** Способ определения фагоцитарной активности лейкоцитов по степени гашения биолюминесценции. 312

ИММУНООНКОЛОГИЯ

- Афанасьева Д.А., Барышникова М.А., Щербakov А.И., Косоруков В.С., Барышников А.Ю.** Разработка модели противоопухолевой липосомальной вакцины . . . 317

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ АЛЛЕРГОЛОГИЯ

- Чудаков Д.Б., Рязанцев Д.Ю., Каширина Е.И., Бержец В.М., Свиричевская Е.В.** Роль дозы аллергена в индукции у мышей IgE антител на белки из клещей домашней пыли 321

ИММУНОПАТОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

- Митина Т.А., Голенков А.К., Яздовский В.В., Караулов А.В., Москалец О.В., Клинушкина Е.Ф., Катаева Е.В., Трифонова Е.В., Луцкая Т.Д., Дудина Г.А., Высоцкая Л.Л., Черных Ю.Б., Захаров С.Г., Белоусов К.А., Фомин А.М., Когарко И.Н.** Кинетика свободных легких цепей иммуноглобулинов сыворотки крови у пациентов с множественной миеломой в процессе проведения курсов химиотерапии, включающих леналидомид 329
- Логинова Н.П., Четвертных В.А., Семченко В.В., Сайдакова Е.В., Чемурзиева Н.В.** Особенности экспрессии цитокератинов 5 и 8 в клетках эпителиальной стромы тимуса и количество TREC в периферических Т-лимфоцитах у детей с врожденными пороками сердца 333

CELL IMMUNOLOGY

- Vasil'eva O.A., Yakushina V.D., Novitsky V.V., Ryzantseva N.V.** The role of galectin-1 in the regulation of CD4⁺CD25⁺/CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺-cells differentiation in vitro
- Chulkina M.M., Trofimov D.Yu., Kofiadi I.A., Alekseev L.P., Savilova A.M.** Comparative analysis of different cytokines and transcription factors mrna expression in lymphocytes activated by ConA
- Shirshev S.V., Kuklina E.M., Zamorina S.A., Nekrasova I.V., Nikitina N.M.** The method for determination of leukocytes phagocytic activity by bioluminescence extinction degree

IMMUNOONCOLOGY

- Afanasieva D.A., Baryshnikova M.A., Shcherbakov A.I., Kosorukov V.S., Baryshnikov A.Yu.** The development of anticancer liposomal vaccine model

EXPERIMENTAL AND CLINICAL ALLERGOLOGY

- Chudakov D.B., Ryzantsev D.Yu., Kashirina E.I., Berzhets V.M., Svirshchevskaya E.V.** The role of allergen dose on the induction in mice of IgE to house dust mite proteins

IMMUNOPATHOLOGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY

- Mitina T.A., Golenkov A.K., Yzdovsky V.V., Karaulov A.V., Moskalets O.V., Klinushkina E.F., Kataeva E.V., Trifonova E.V., Lutskey T.D., Dudina G.A., Vysotskaya L.L., Chernych J.B., Zacharov S.G., Belousov K.A., Fomin A.M., Kogarko I.N.** Kinetics of free light chains of immunoglobulins sera of patients with multiple myeloma in the chemotherapy process which includes lenalidomide
- Loginova N.P., Chetvertnyh V.A., Semchenko V.V., Sajdakova E.V., Chemurzieva N.V.** The expression pattern of cytokeratin 5 and 8 cells of epithelial thymic STROMA AND quantity trec in peripheral t-lymphocytes in children with congenital heart disease

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 612.017.1.33.083

Васильева О.А.¹, Якушина В.Д.¹, Новицкий В.В.^{1,2}, Рязанцева Н.В.^{1,2}**РОЛЬ ГАЛЕКТИНА-1 В РЕГУЛЯЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ CD4⁺CD25⁺/CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺-КЛЕТОК IN VITRO**¹ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 634050, г. Томск; ²Национальный исследовательский государственный университет, 634050, г. Томск

На модели *in vitro* исследовано влияние β-галактазидсвязывающего белка семейства лектинов – галектина-1 на субпопуляционный состав и иммуносупрессорную функцию регуляторных CD4⁺-лимфоцитов. Действие галектина-1 на дифференцировку CD4⁺CD25⁺/CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺-лимфоцитов определяется степенью зрелости клеток и условиями культивирования. Инкубация предварительно дифференцированных клеток с рекомбинантным галектином-1 сопровождалась повышением количества лимфоцитов с фенотипом CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, повышением содержания и уровня экспрессии мРНК транскрипционного фактора Foxp3 и продукции цитолитического белка перфорина. Результаты исследования свидетельствуют о том, что иммунорегуляторное действие галектина-1 основано на поддержании регуляторного фенотипа уже дифференцированных CD4⁺-лимфоцитов. Разработанная модель эксперимента может быть использована для направленной регуляции процесса дифференцировки лимфоцитов в сторону Т-регуляторных лимфоцитов и получения популяции клеток, обладающих иммуносупрессорными свойствами.

Ключевые слова: галектин-1; Т-регуляторные лимфоциты; дифференцировка; транскрипционный фактор Foxp3; перфорин.

Для цитирования: Иммунология. 2014; 35 (6): 300–305.

Vasil'eva O.A.¹, Yakushina V.D.¹, Novitsky V.V.^{1,2}, Ryazantseva N.V.^{1,2}

THE ROLE OF GALECTIN-1 IN THE REGULATION OF CD4⁺CD25⁺/CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺-CELLS DIFFERENTIATION IN VITRO

¹Siberian state medical university, 634050, Tomsk, Russian Federation; ²National research Tomsk state university, 634050, Tomsk, Russian Federation

The effect of β-galactoside-binding protein from lectins family - galectin-1 on the subpopulation structure and immunosuppressive function of CD4⁺-regulatory lymphocytes was studied *in vitro*. The action of galectin-1 on the differentiation of CD4⁺CD25⁺/CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells depends on the ratio of lymphocytes maturity and conditions of cell cultivation. The incubation of pre-differentiated cells with the recombinant galectin-1 was accompanied by the increase in the number of lymphocytes with CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ phenotype, the increase in the content and expression level of transcription factor Foxp3 mRNA and the increase in cytolytic protein – perforin production. The findings suggest that the immunoregulatory effects of galectin-1 are based on the maintaining of the regulatory phenotype of differentiated CD4⁺-lymphocytes. Experimental model that we have developed, can be used to regulate the process of lymphocyte differentiation toward regulatory T-cell and to receive the populations of cells with immunosuppressive properties.

Key words: galectin-1; T-regulatory cells; differentiation; transcription factor Foxp3; perforin.

Citation: Immunologiya. 2014; 35 (6): 300–305. (in Russian)

Введение. По современным представлениям, Т-регуляторные лимфоциты (Treg) представляют собой фенотипически и функционально гетерогенную группу клеток [1]. Благодаря данной популяции лимфоцитов обеспечивается периферическая иммунологическая толерантность к аутоантигенам, осуществляются подавление пролиферации различных клонов Т-хелперов, удаление аутореактивных лимфоцитов, контроль силы и продолжительности иммунного ответа [2, 3]. Дефицит или функциональная неполноценность Treg является основополагающим фактором патогенеза аутоиммунных заболеваний, а их избыточное количество вызывает выраженную иммуносупрессию, что способствует прогрессированию злокачественных новообразований. Поэтому особый интерес приобретают методы коррекции иммуноопос-

редованных заболеваний, основанные на модулировании процесса дифференцировки Treg-клеток как основных агентов, ответственных за супрессию иммунного ответа.

В качестве регулятора Т-клеточного гомеостаза в данной работе рассматривается эндогенный низкомолекулярный белок семейства лектинов – галектин-1. Галектин-1 в норме присутствует на поверхности клеток в разных органах: плаценте, легких, печени, костном мозге, селезенке, сердце, лимфатических узлах и предстательной железе. Он экспрессируется на фибробластах, эпителиальных, эндотелиальных, дендритных клетках, макрофагах, активированных Т- и В-лимфоцитах, костномозговых стромальных клетках, НК-клетках, а также на Foxp3⁺ Т-регуляторных клетках [4, 5]. Внутриклеточно галектин-1 локализуется на свободных цитоплазматических рибосомах, в цитозоле и ядре [6]. Избыточная экспрессия на поверхности галектина-1 характерна для опухолевых клеток различного происхождения. Галектин-1 регулирует многочисленные процессы, связанные с жизнедеятельностью клеток: инициирует клеточный апоптоз, стимулирует ангиогенез, участвует в дифференци-

Для корреспонденции: Васильева Ольга Александровна, Vasiljeva-24@yandex.ru

For correspondence: Vasil'eva Olga Aleksandrovna, Vasiljeva-24@yandex.ru

ровке Т-лимфоцитов, развитии В-лимфоцитов, сплайсинге мРНК, дифференцировке нервных и мышечных клеток, клеточной адгезии и межклеточной кооперации [4, 5, 7]. На моделях аутоиммунных заболеваний показано, что галектин-1 играет ключевую роль в развитии и функционировании Т-регуляторных лимфоцитов, в связи с этим представляет интерес исследование влияния галектина-1 на дифференцировку Т-регуляторных клеток и возможность получения популяции лимфоцитов, обогащенной данным подклассом клеток. В работе мы провели оценку влияния рекомбинантного галектина-1 на количество, функциональную активность Т-регуляторных клеток, уровень экспрессии мРНК и содержание транскрипционного фактора дифференцировки Treg (Foxp3⁺) в разных условиях культивирования *in vitro*.

Материалы и методы

Культивирование мононуклеарных лейкоцитов с галектином-1

В исследовании использовали периферическую кровь здоровых людей обоего пола ($n = 15$), средний возраст которых составил 26 ± 4 года. Взятие крови производили утром натощак из локтевой вены в количестве 20 мл в вакуумные пробирки с антикоагулянтом K₃-ЭДТА. Из крови методом градиентного центрифугирования [8] выделяли мононуклеарные лейкоциты. Количество выделенных клеток стандартизировали до $2,0 \cdot 10^6$ /мл, разбавляя полной питательной средой, состоящей из 90% RPMI-1640 (ЗАО «Вектор», Россия), 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ООО «Биолот», Россия), 0,3 мг/мл L-глутамина, 50 мкг/мл гентамицина. Клетки культивировали в специализированных 48-луночных стерильных планшетах с крышкой (BD Falcon™, США) в CO₂-инкубаторе при 37°C.

Исследование проводили с использованием двух экспериментальных моделей. В модели 1 изучали влияние рекомбинантного галектина-1 (0,5 и 1 мкг/мл; RnDSystems, США;) на неактивированные клетки и добавляли его в культуральную среду вместе с анти-CD3/CD28-антителами (АТ) и цитокинами, необходимыми для поляризации в сторону Т-регуляторных лимфоцитов. Модель 2 экспериментала предусматривала внесение рекомбинантного галектина-1 через 72 ч культивирования к уже активированным и поляризованным лимфоцитам. Общая продолжительность культивирования клеток составила 6 сут.

Активацию лимфоцитов проводили анти-CD3-АТ и анти-CD28-АТ (BD Pharmingen, США) в количестве 1 и 2 мкг/мл соответственно. С целью генерации субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов в культуральную среду одновременно с активирующими АТ добавляли рекомбинантные цитокины: интерлейкин (IL)-2 (10 нг/мл) и трансформирующий фактор роста β_1 (TGF β_1) (20 нг/мл) (RnDSystems, США); замену среды осуществляли через 72 ч от начала культивирования. В качестве контроля использовали культуру мононуклеарных лейкоцитов, активированных анти-CD3/CD28-АТ.

Контроль дифференцировки клеток на 6-е сутки проводили методом иммунофенотипирования на проточном цитометре FACSCantoII (BD, США). Содержание транскрипционного фактора FoxP3 и цитолитического белка перфорина анализировали в клетках, культивированных с добавлением галектина-1 через 72 ч от начала культивирования (модель 2).

Иммунофенотипирование Т-регуляторных лимфоцитов

Субпопуляцию Treg определяли по связыванию АТ к CD4, меченных флюоресцеина изотиоцианатом, к CD25-аллофикоцианином (APC) и к Foxp3 – фикоэритрином (BD Pharmingen, США). К клеткам, отмытым от культуральной среды, добавляли 5 мкл анти-CD25-АТ, 10 мкл анти-CD4-АТ и инкубировали 20 мин. С помощью набора реагентов “Human Foxp3 Buffer set” (BD Pharmingen, США) осуществляли фиксацию клеток в течение 10 мин и пермеабиллизацию 30 мин. Затем окрашивали анти-Foxp3-АТ в течение 30 мин, отмывали

и анализировали на проточном цитометре. Все процедуры инкубации проводили при комнатной температуре, клетки отмывали с использованием “Stain Buffer” (BD Pharmingen, США).

Вестерн-блоттинг

Содержание транскрипционного фактора Foxp3 и цитолитического белка перфорина при действии галектина-1 на клетки, дифференцированные в направлении регуляторных Т-лимфоцитов, определяли методом вестерн-блоттинга. Равное количество цельноклеточных лизатов подвергали электрофору в полиакриламидном геле, содержащем 10% додецилсульфата натрия, затем белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Мембрану блокировали 1% желатином, трижды промывали буфером TTBS (20 ммоль/л трис-HCl, pH 7,6, 137 ммоль/л NaCl и 0,05% твин-20), после чего инкубировали с первичными АТ anti-Foxp3 (eBioscience, США), anti-perforin (RnDSystems, США) в течение 1 ч, трижды промывали буфером TTBS и добавляли вторичные АТ с пероксидазной меткой (RnDSystems, США). Для визуализации результатов использовали хемилюминесцентный субстрат «NOVEX ECL Chemiluminescent Substrate Reagent kit» (Invitrogen, США). Содержание белков определяли путем подсчета интенсивности бенда на рентгеновской пленке с помощью программы «TotalLab 2.01». В качестве стандарта и внутреннего контроля использовали белок глицеро-3-фосфатдегидрогеназу (eBioscience, США), выражая содержание исследуемого протеина как отношение сигнала определяемого белка к сигналу белка глицеро-3-фосфатдегидрогеназы в исследуемых образцах.

Количественное определение экспрессии мРНК

Влияние рекомбинантного галектина-1 на экспрессию мРНК транскрипционного фактора Foxp3 изучали, добавляя галектин-1 к мононуклеарным лейкоцитам (в дозе 1 мкг/мл) вместе с активирующими АТ, длительность воздействия составила 72 ч. Контролем служила культура клеток без добавления галектина-1. За 4 ч до окончания инкубации в культуры клеток добавляли стимуляторы – форболмиристилacetат в дозе 50 нг/мл и кальция иономицин в дозе 1 мкг/мл. После 72 ч культивирования клеток с рекомбинантным галектином-1 среду с клетками переносили из лунок планшета в пробирки типа эппендорф, центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин, супернатант удаляли, а осадок клеток использовали для выделения РНК и последующей оценки уровня экспрессии мРНК транскрипционного фактора дифференцировки Т-регуляторных лимфоцитов. Выделение РНК из мононуклеарных лейкоцитов осуществляли сорбентно-колоночным методом (RNeasy Plus Mini Kit, QIAGEN, Германия). Далее синтезировали ДНК на матрице мРНК при участии обратной транскриптазы. Для этого готовили реакционную смесь: 9 мкл (0,5–2 мкг) РНК, 1 мкл (100 нг) статистического праймера (N9; праймера, подобранного к среднестатистической последовательности ДНК), 10 мкл RT-буфера (20 mM трис-HCl, pH = 8,3, 5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 100 mM KCl, 0,4 mM dNTP), 200 ед. активности ДНК-зависимой РНК-полимеразы (MMuLV-RT) (Promega, США). Реакцию обратной транскрипции проводили в течение 60 мин при температуре 42°C.

Таблица 1

Праймеры, позволяющие специфично амплифицировать фрагменты кДНК

Ген	Последовательность нуклеотидов в прямом (F) и обратном (R) праймерах
Foxp3	F: CTGGCAAATGGTGTCTG R: GTGCCCTGCCCTTCTCAT
β -Actin	F: CATTTCCGAAGCGAGTGTCT R: GAGCGATTCCGGACTACCTT