

Адам және жануарлар
физиологиясы

Физиология человека и
животных

Human and animal
physiology

УДК: 577.27; 612.017.1:616-006

*В.А. Абрамова, Н. Абдолла, Ю.В. Перфильева, Е.О. Остапчук, Н.Н. Беляев

Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина, Казахстан, г. Алматы

*E-mail: mglory91@mail.ru

Исследование влияния высокомолекулярного гиалуронана на функциональную активность Т-регуляторных клеток человека

Работа посвящена изучению влияния высокомолекулярного гиалуронана, являющегося компонентом межклеточного матрикса, на супрессорную активность Трег-клеток периферической крови здорового человека с фенотипом CD4+CD25+FoxP3+, обеспечивающих толерантность к собственным антигенам. Гиалуронан усиливал у части доноров супрессорную активность Трег-клеток в отношении пролиферации эффекторных Т-лимфоцитов, у другой части снижал ее независимо от формы его презентации Трег-клеткам (растворимая или фиксированная на твердой фазе). Гиалуронан не влиял на продукцию IL-10 Трег-клетками. В свою очередь, Т-супрессорная активность не была связана с продукцией IL-10 Трег-клетками. Обсуждаются предполагаемые механизмы влияния гиалуронана на развитие супрессии, опосредованной Трег-клетками. Разработанные в работе методические подходы к изучению Трег-клеток с помощью гиалуронана могут быть полезны для исследований нарушения нормальной Трег-зависимой иммуносупрессии при аутоиммунопатологии и при раке.

Ключевые слова: Т-регуляторные клетки, иммуномагнитная клеточная сепарация, проточная цитофлуориметрия, гиалуронан, интерлейкин-10, МТТ-тест.

V.A. Abramova, N. Abdolla, Yu. V. Perfilieva, E.O. Ostapchuk, N.N. Belyaev

Study of high molecular weight hyaluronan influence on functional activity of human T regulatory cells

The work is devoted to study the extracellular matrix component, high molecular weight hyaluronan, on the suppressor activity of CD4+CD25+FoxP3+ Treg cells, which were obtained from healthy human peripheral blood. Hyaluronan has been established to increase suppressor activity of Treg cells in part of donors; in other individuals it caused a decrease in this parameter. Hyaluronan did not influence on the production of IL-10 by Treg cells. In its turn suppressor activity has not been associated with IL-10 production by Treg cells. Some mechanisms of hyaluronan influence on the suppression by Treg cells are discussed. Experimental approaches worked out in this study, can be useful for investigation of the impaired Treg-dependent immunosuppression in pathologic states as autoimmunity and cancer.

Key words: T-regulatory cells, immunomagnetic cell separation, flow cytometry, hyaluronan, interleukin-10, MTT-test.

В.А. Абрамова, Н. Абдолла, Ю.В. Перфильева, Е.О. Остапчук, Н.Н. Беляев

Жоғары молекулалық салмақтағы гиалуронанның адамның Т- реттегіш жасушаларының функционалдык активтілігіне әсерін зерттеу

Бұл жұмыс сау адамдардың шеткі аймақтық қанындағы Трег-жасушалардың супрессорлық активтілігіне, жасуша аралық матриктің компонентті болып табылатын жоғары молекулалық салмақтағы гиалуронанның әсерін зерттеуге арналған. Гиалуронан бір бөлек донорларда эффекторлық Т жасушалардың пролиферациясына, Трег жасушалардың супрессорлық активтілігін күшейтсе, ал басқа бір бөлігінде оны төмендетті. Гиалуронан Трег-жасушалардың IL-10 продукциясына әсер етпеді. Өз кезегінде, Т супрессорлық активтілік, Трег-жасушалардың IL-10 продукциясымен байланысы болмады. Трег-жасушаларымен гиалуронанның супрессия дамуындағы

болжамды эсер механизмі талқылануда. Бұл жұмыстағы гиалуронның көмегімен Treg жасушаларын зерттеуге арналған жетілдірілген әдістемелік жолдар, онкологиялық және аутоиммундық аурулар кезіндегі иммундық супрессияға байланысты қалыпты Treg-тің кемістігін зерттеу үшін пайдалы болуы мүмкін.

Түйін сөздер: Т-реттегіш жасушалар, иммуномагниттік жасушалық сепарация, ағынды цитофлуориметрия, гиалуронан, интерлейкин-10, МТТ-тест.

T-регуляторные клетки (Treg) представляют собой популяцию T-лимфоцитов с фенотипом CD4+CD25+FoxP3+, составляющих важное звено адаптивного иммунитета, контролирующее активность эффекторных клеток и обеспечивающее толерантность к собственным антигенам [1, 2]. В качестве дополнительных маркеров Treg-клеток при их идентификации используют GITR, OX40 (CD134), CTLA-4 (CD152) [3]. Дисфункция Treg-клеток приводит к развитию аутоиммунной патологии, такой, как ревматоидный артрит, множественный склероз, воспаление толстого кишечника, синдром Шегрена, миастения гравис, тиреоидит Хашимото, системная красная волчанка, диабет первого типа [4, 5], тогда как при раке наблюдается увеличение активности Treg-клеток, инфильтрирующих опухоль, что приводит к локальной иммуносупрессии и росту опухоли [6]. Treg-клетки также могут существенно модулировать течение инфекционного процесса [7]. Хотя активация Treg-клеток, имеющих клональное разнообразие, запускается специфическим образом через посредство T-клеточных рецепторов, супрессия, которую они индуцируют, не является антиген-специфической [8].

Механизмы активации и угнетения Treg-клеток являются предметом интенсивных исследований. Особый интерес представляет взаимодействие Treg-клеток с внеклеточным матриксом (extracellular matrix, ECM), представляющим сложную смесь протеинов, протеогликанов и глюкозаминогликанов, которые поддерживают архитектуру тканей [9]. Важным компонентом ECM является гиалуронан (HA) – отрицательно заряженный полисахарид [10], состоящий из повторяющихся звеньев дисахарида (D-глюкуроновая кислота ($\beta 1 \rightarrow 3$)-N-ацетилглюкозамин ($\beta 1 \rightarrow 4$)). Гиалуронан может существовать как в высоко-, так и в низкомолекулярной форме. В отличие от высокомолекулярного HA, низкомолекулярный HA выполняет противоположные функции в регулировании иммунного ответа, то есть, он выступает в роли своеобраз-

ного «сигнала опасности», и взаимодействие с ним приводит к активации иммунокомпетентных клеток [10]. «Сигналом опасности» низкомолекулярный HA считают потому, что он образуется из высокомолекулярного HA при его деградации гиалуронидазами, экспрессия которых в ECM увеличивается при воспалении. HA привлекает внимание исследователей в виду его участия в механизме возникновения и регуляции воспаления, в том числе Treg-клетками [11-13].

Молекула CD44 является клеточным рецептором лимфоцитов для HA. Существует множество изоформ CD44, которые образуются за счет альтернативного сплайсинга вариантных экзонов [11, 14, 15]. Однако экспрессия CD44 на поверхности клеток еще не гарантирует связывание с HA. В отсутствие стимуляции лимфоциты экспрессируют стандартную форму CD44, не способную связывать гиалуронан [11, 13]. Активация Treg-клеток митогенными стимулами в условиях эксперимента (анти-CD3 + анти-CD28) вызывает экспрессию v9 и v6 изоформ CD44, которые связывают высокомолекулярный HA, что приводит к усилению их супрессорной функции [14, 15]. Остается неизвестным, присутствуют ли в норме в циркулирующей крови здоровых людей Treg-клетки, способные к активации супрессорной активности после связывания высокомолекулярного HA.

Целью исследования явилось изучение влияния высокомолекулярного HA на супрессорную активность Treg-клеток периферической крови человека.

Материалы и методы

В качестве источника Treg-клеток использовали периферическую кровь здоровых доноров, полученную из локтевой вены. 10 мл крови с антикоагулянтом ЭДТА осторожно наслаивали на 10 мл гистобака 1077 (Sigma-Aldrich, Германия) и центрифугировали 20 мин при 3000 g при 4°C. Фракцию мононуклеарных клеток (PBMC) отбирали из интерфазного кольца и отмывали 20-кратным объемом среды RPMI-1640 центри-

фугированием при 200 g в течение 10 мин при 20°C.

Выделение популяции Treg-клеток из мононуклеарной фракции периферической крови проводили с помощью набора «CD4+CD25+CD127dim/- Reg T Cell Isolation Kit II» (Milenyi Biotec, Германия) согласно прописи фирмы-производителя, используя колонки типа CS+ и MS+ и магнитный сепаратор MiniMACS. На первом этапе с помощью негативной иммуномагнитной селекции из мононуклеарной фракции крови удаляли не-CD4+ клетки с помощью коктейля моноклональных биотинилированных антител к специфическим маркерам, не встречающимся на Treg-клетках (CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR $\alpha\beta$, CD235a, CD127^{high}), и железосодержащих парамагнитных бус, конъюгированных с моноклональными антителами против биотина. Затем проводили позитивную селекцию по маркеру CD25, используя бусы с моноклональными антителами к CD25. CD25- T-клетки, выделившиеся в негативной фракции, использовали в качестве клеток-мишеней (Tcon_v).

О супрессорной активности Treg-клеток, активированных НА, судили по торможению пролиферации клеток-мишеней, оцениваемому по снижению активности цитоплазматических дегидрогеназ в МТТ-тесте [16]. Treg-клетки (5×10^4 кл./лун.) кокультивировали с клетками-мишенями Tcon_v (105 кл./лун.) в присутствии фитогемагглютинаина (PHA) (Sigma-Aldrich) (5 мкг/мл) или 10 нг/мл форбол миристат ацетата и 0,5 мкг/мл иономицина (PMA/I) (Sigma-Aldrich) в 96-луночных планшетах, в присутствии или отсутствии НА, в 200 мкл полной культуральной среды (ПКС) RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Sigma-Aldrich), 2 mM глутамина (Sigma-Aldrich), 100 U/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина, при 37°C и 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе в течение 72 ч. За 4 ч до окончания культивирования в каждую ячейку вносили по 500 мкг/мл МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид) (Sigma-Aldrich). По окончании опыта из лунок удаляли супернатант, образовавшиеся кристаллы формазана подсушивали, растворяли в диметилсульфоксиде (Sigma-Aldrich) и колориметрировали в иммуноферментном анализаторе при 492/630

нм. Индекс супрессии пролиферации (ИСП) клеток вычисляли по формуле: ИСП=(К-О)/Кх100%, где К – значение экстинкции в контроле, О – то же самое в опыте. К вычисляли, суммируя значения экстинкции в лунках с Treg-клетками и клетками-мишенями.

Оценку фиксации НА на полистирольных планшетах проводили следующим образом. Поли-L-лизин (PL) (Sigma-Aldrich) в концентрации 3 мкг/мл, растворенный в 5 mM фосфатно-солевом буферном растворе (pH=7,4), инкубировали в лунках 96-луночного планшета (100 мкл) в течение 3-х суток при температуре 4-8°C. После соответствующих отмывок в лунки вносили водный раствор (100 мкл) биотинилированного НА (Sigma-Aldrich) в возрастающих концентрациях (10, 100, 200 мкг/мл) и инкубировали 2 ч при комнатной температуре. В качестве блокирующего агента использовали 0,5% раствор (200 мкл) бычьего сывороточного альбумина (BSA) в карбонат-бикарбонатном буферном растворе (pH=8,9). В контрольных ячейках НА не вносили (К-), или вносили 100 мкг/мл НА без предварительного нанесения PL. Отмывали 3 раза и вносили конъюгат «стрептавидин-пероксидаза хрена (Sigma-Aldrich). Через 1 ч инкубирования при 37°C реакцию проявляли добавлением 100 мкл субстрата о-фенилендиамина (Sigma-Aldrich), растворенного в цитратно-фосфатном буферном растворе (pH=5,0), в присутствии H₂O₂. Через 30 мин инкубирования в темноте реакцию останавливали добавлением 50 мкл 4 н H₂SO₄ и измеряли экстинкцию при 492 нм на иммуноферментном анализаторе.

IL-10 в супернатантах культуральной среды определяли с помощью иммуноферментного анализа (ИФА), используя набор реагентов фирмы Diaclone (Франция) согласно прилагаемой инструкции. Для этого клетки подвергали культивированию в ПКС при стандартных условиях в течение 72 ч в присутствии или отсутствии НА (100 мкг/мл). Для оценки влияния НА на продукцию IL-10 вычисляли индекс супрессии продукции IL-10 по формуле: ИСПIL-10 = (K₁+K₂-O)/(K₁+K₂)×100%, где K₁ – концентрация IL-10 в лунке с Treg-клетками, K₂ – концентрация IL-10 в лунке с Tcon_v, O – концентрация IL-10 в опытной лунке (Treg+Tcon_v).

Для статистической обработки использовали прикладную программу Microsoft Excel. Вычис-

ляли среднюю арифметическую, среднюю квадратическую ошибку средней арифметической, коэффициент корреляции (r), достоверность различия средних P по критерию Стьюдента (ТТЕСТ).

Результаты и их обсуждение

«Золотым стандартом» оценки супрессорной

активности Трег-клеток считается тест подавления пролиферации «традиционных» Т-лимфоцитов (Тсopv), стимулированных поликлональными митогенами. Мы изучили влияние НА на супрессорную активность Трег-клеток в отношении пролиферации Тсopv-клеток, стимулированных известными Т-клеточными митогенами РНА или РМА/І, в присутствии или отсутствии НА (таблица 1).

Таблица 1 – Индекс супрессии пролиферации Тсopv, не стимулированных или стимулированных различными митогенами, Трег-клетками в отсутствии или присутствии НА

Вариант эксперимента	Растворенный НА			Иммобилизованный НА
	н/с	РНА	РМА/І	РМА/І
НА-	33,5±12,1	39,9±14,2	21,6±14,6	37,0±6,0
НА+	7,4±3,1	5,9±1,7	26,7±9,0	37,4±5,3
$P_{(НА-НА+)}$	0,157	0,135	0,795	0,956

Статистический анализ показал, что по средним данным ни в одном из случаев не было достоверных различий ИС пролиферации Тсopv, стимулированных или не стимулированных (н/с) любым из использованных митогенов в присутствии или отсутствии НА, хотя наблюдалась тенденция к снижению ИС в ответ на НА при стимуляции РНА и в отсутствии стимуляции.

Для того чтобы приблизить условия взаимодействия Трег-клеток с НА к естественным, мы отработали методику иммобилизации НА на поверхности культуральных планшетов с использованием методологического подхода, предложенного Azze R.O. и соавт. [17], заключающегося в предварительной сорбции PL. Результаты анализа представлены на рисунке 1.

Из рисунка 1 следует, что предварительное покрытие поверхности лунок планшетов PL обе-

спечивает хорошую сорбцию НА в высоких концентрациях ($P < 0,001$), тогда как в отсутствие PL (б/PL) НА не сорбируется совсем ($P = 0,092$), очевидно, из-за отсутствия гидрофобных участков на молекуле и общего отрицательного заряда.

Используя отработанный метод фиксации НА на поверхности планшета через PL, нанесенный на поверхность лунок в концентрации 200 мкг/мл, мы проанализировали влияние НА на индукцию супрессорной активности у Трег-клеток в отношении Тсopv, стимулированных РМА/І, в МТТ-тесте. Как видно из таблицы 1, иммобилизованный НА (крайняя правая колонка), так же, как и растворенный НА, судя по средним данным, не оказывал никакого действия на изменение супрессорной активности Трег-клеток. Следовательно, реакция Трег-клеток на НА не зависела от формы его презентации.

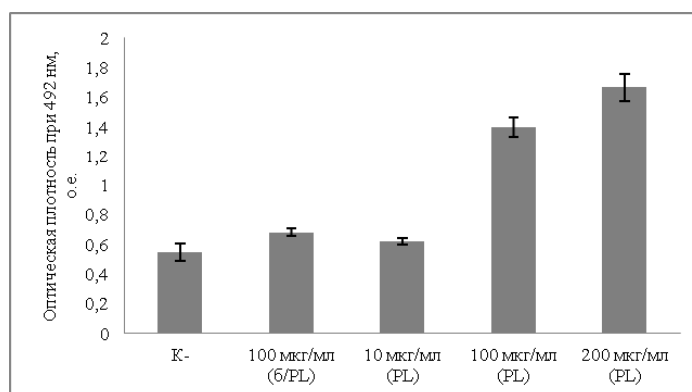


Рисунок 1 – Анализ сорбции гиалуронана на поверхности полистирольного планшета, предварительно покрытого PL

Хотя по средним значениям ИС пролиферации Тсopv-клеток, активированных PMA/I, не зависел от воздействия НА, анализ индивидуальных ИС_п позволил выявить две группы доноров, Трег-клетки которых принципиально различались по реакции на НА. Так, 4 образца из 7 (57,1%) показали усиление супрессорной активности в присутствии НА, а 3 (42,9%), наоборот, снижение (рис. 2 а и б). Объединение данных по этому принципу выявило следующую картину (рис. 3).

I группа доноров характеризовалась широким размахом варьирования значений ИС_п (1,2-43,3%) в отсутствии действия НА и умеренным повышением ИС (18,7-48,5%) при воздействии

НА. В этой группе не было выявлено достоверного влияния НА ($P_t=0,139$) на ИС_п. Во II группе доноров средняя величина ИС в отсутствии действия НА была сопоставима с таковой в I группе при воздействии НА (39,0-49,8%). Воздействие НА приводило к достоверному ($P_t=0,047$) снижению ИС (12,9-30,0%).

IL-10 является одним из медиаторов иммуносупрессорного действия Трег-клеток [18]. Мы определили содержание IL-10 в культуральной среде Трег-клеток, Тсopv-клеток и смеси этих клеток и культивируемых в течение 72 ч в присутствии или отсутствии растворимого НА и различных митогенных стимулов. Результаты анализа представлены на рисунке 4.

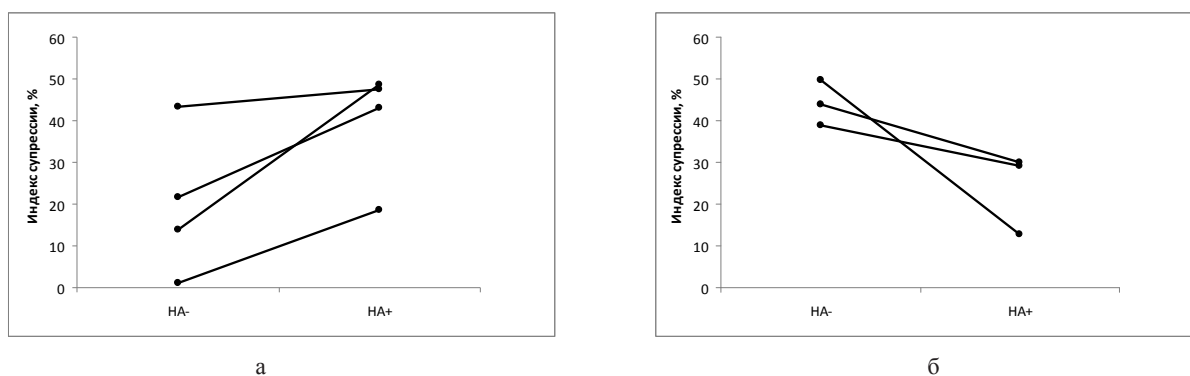


Рисунок 2 – Изменение ИС пролиферации Тсopv-клеток под действием Трег-клеток в присутствии или отсутствии НА без учета стимуляции различными митогенами в группах доноров I (а) и II (б)

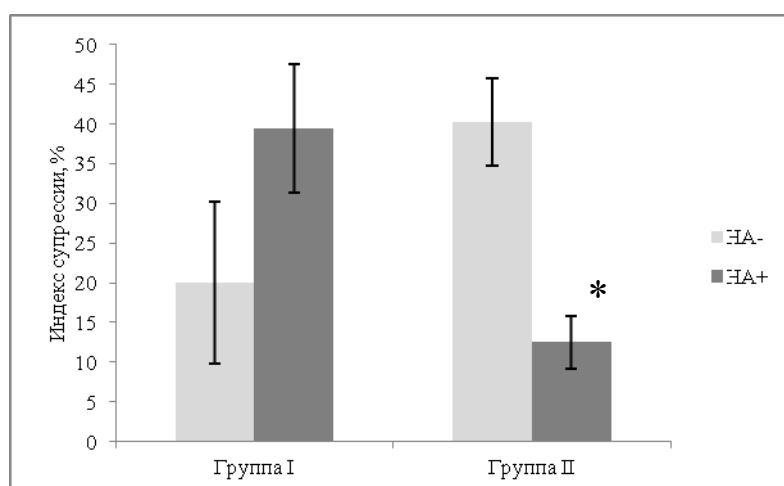


Рисунок 3 – Влияние НА на супрессорную активность Трег-клеток, стимулированными различными митогенами в отношении Тсopv-клеток при совместном культивировании

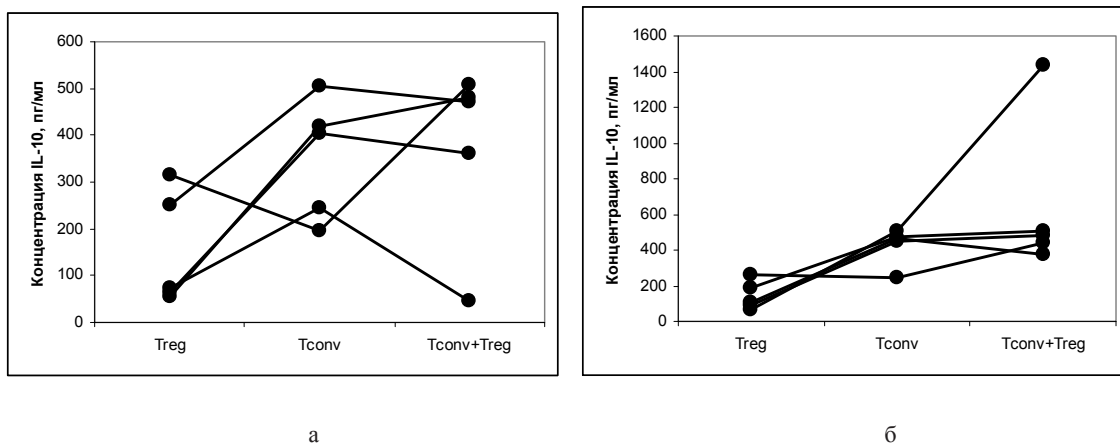


Рисунок 4 – Продукция IL-10 Т-клетками, культивируемыми 72 ч в отсутствие (а) или присутствии (б) высокомолекулярного НА и различных митогенных стимуляторов

Из рисунка 4 видно, что основными источниками продукции IL-10 являются Tconv-клетки. Совместное культивирование Treg-клеток с Tconv-клетками приводило к снижению про-

дукции IL-10, что более выражено на диаграмме средних значений (рис. 5). Из рисунка 5 также следует, что НА никак не влиял на продукцию IL-10.

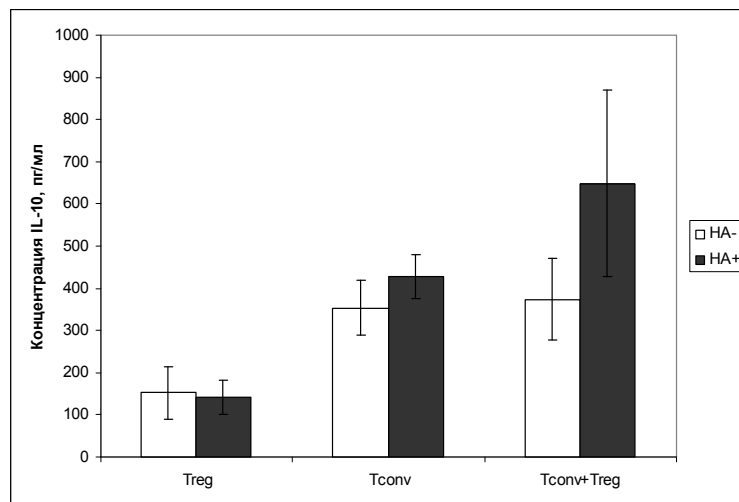


Рисунок 5 – Влияние НА на продукцию IL-10 Т-клетками здоровых доноров

Для оценки связи продукции IL-10 с супрессорной активностью Treg-клеток мы рассчитали ИС продукции IL-10 и провели корреляционный анализ между ИС_п и ИС_{IL-10}. Оказалось, что в условиях инкубации в отсутствие НА наблюдалась положительная корреляция средней степени ($r=0,44$), тогда как при воздействии НА никакой связи между этими показателями не было

выявлено ($r= - 0,18$). Данный факт позволяет заключить, что в отсутствие НА Treg-клетки супрессировали пролиферацию Tconv-клеток и, по-видимому, продукцию ими IL-10. Воздействие НА приводило к нарушению этой закономерности, при очевидном отсутствии влияния НА на продукцию IL-10 Treg-клетками.

Проведенные исследования позволяют пред-

положить, что в норме у здоровых людей в периферической крови циркулирует популяция Трег-клеток, способных связывать высокомолекулярный гиалуронат. Однако способность этой популяции оказывать супрессорный эффект на эффекторные Т-клетки (TconV) после взаимодействия с гиалуронатом была выявлена лишь у 57,1% обследованных здоровых доноров, а у 42,9% обследованных наблюдалось снижение супрессорной активности в ответ на гиалуронат.

Можно предположить, что у доноров I группы эта популяция после связывания с высокомолекулярным НА оказывала супрессорный эффект на Т-клетки, угнетая их пролиферацию. Поскольку связывание гиалуронана Трег-клетками осуществляется через изоформы v9 и v6 поверхностной адгезивной молекулы CD44, экспрессия которых ассоциирована с активацией Трег-клеток, можно заключить, что в норме в периферической крови всегда присутствует определенное количество функционально-активных Трег-клеток. Гораздо сложнее объяснить снижение супрессорной активности Трег-клеток в ответ на НА у доноров II группы. В работе [13] было показано, что у мышей воздействие высокомолекулярного НА на Трег-клетки сопровождалось продукцией IL-2, который сам по себе, как известно, является индуктором пролифера-

ции Т-клеток [19], а также продукцией супрессорного цитокина IL-10. Возможно, II группа доноров отличалась повышенной продукцией IL-2 Трег-клетками при контакте с НА, что приводило к усилению пролиферации клеток-мишеней вместо супрессии. Является ли такое их свойство следствием транзитного физиологического состояния организма или признаком наличия скрытого бессимптомного хронического воспаления у данных индивидуумов, установить на данный момент не представляется возможным. Для ответа на этот вопрос необходимы дополнительные исследования.

Судя по очевидному отсутствию связи уровня продукции IL-10 с наличием контакта Трег-клеток с гиалуронатом в процессе культивирования, IL-10 не участвовал в механизме гиалуронанзависимой супрессии пролиферации эффекторных Т-клеток. Возможно, в данном случае осуществлялся контакт-зависимый механизм супрессии через мембранную форму TGFβ и CTLA-4 [20].

Разработанные нами методические подходы к изучению Трег-клеток с помощью гиалуронана могут быть полезны для исследований нарушения нормальной Трег-зависимой иммуносупрессии при аутоиммунопатологии и при раке.

Литература

- 1 Wing K., Fehervari Z., Sakaguchi S. Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells // *International Immunology*.-2006.-Vol.18.-No.7.-P. 991-1000.
- 2 Baatar D., Olkhanud P., Sumitomo K., Taub D., Gress R., Biragyn A. Human peripheral blood t regulatory cells (Tregs) functionally primed CCR4+ Tregs and unprimed CCR4+ Tregs, regulate effector T cells using FasL//*J.Immunol.*-2007.-No.178.-P.4891-4900.
- 3 Liu W., Putnam A.L., Xu-yu Z., Szot G.L., Lee M.R., Zhu S., Gottlieb P.A., Kapranov P., Gingeras T.R., Fazekas de St Groth B., Clayberger C., Soper D.M., Ziegler S.F., Bluestone J.A. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ Treg cells//*JEM.* – 2006.-No3. – P.1701-1711.
- 4 Asano M., Toda M., Sakaguchi N., Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation//*J. Exp. Med.*-1996.-Vol.106.-P.387-396.
- 5 Cools N., Ponsaerts P., van Tendeloo V.F.I., Berneman Z.N. Regulatory T cells and human disease//*Clin. Develop. Immunol.* – 2007. – Vol.2007. – P.1-11.
- 6 Yang Z.-Z., Novak A.J., Stenson M.J., Witzig T.E., Ansell S.M. Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma//*Blood.* -2006.- No.9(107). – P.3639-3646.
- 7 Железникова Г.Ф. Регуляторные Т-лимфоциты в иммунном ответе на инфекцию//*Ж. инфектол.* – 2011. – №1(3). – С.6-13.
- 8 Sakaguchi S., Wing K., Onishi Y., Prieto-Martin P., Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses?//*Int. Immunol.* – 2009. – Vol.21. – P.1105-1111.
- 9 Adair-Kirka T.L., Senior R.M. Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation//*Int. J. Biochem. Cell. Biol.*-2008.-N40 (6-7).-P.1101-1110.
- 10 Bollyky P., Falk B.A., Wu R.P., Buckner J.H., Wight T.N., Nepom G.T. Intact extracellular matrix and the maintenance of immune tolerance: High molecular weight hyaluronan promotes persistence of induced CD4+CD25+ regulatory T cells//*J. Leukocyte Biol.* – 2009. – Vol.86. – P.1-6.

- 11 Sherman L., Sleeman J., Herrlich P., Ponta H. Hyaluronate receptors: Key players in growth, differentiation, migration and tumor progression//*Curr. Opin. Cell Biol.*-1994.-No.6.-P.726-733.
- 12 Bollyky P.L., Lord J. D., Masewicz S.A., Evanko S.P., Buckner J.H., Wight T.N., Nepom G.T. Cutting edge: High molecular weight hyaluronan promotes the suppressive effects of CD4+CD25+ regulatory T cells//*J. Immunol.*-2007.-No.179.-P.744–747.
- 13 Bollyky P.L., Falk B.A., Long S.A., Preisinger A., Braun K.R., Wu R.P., Evanko S.P., Buckner J.H., Wight T.N., Nepom G.T. CD44 costimulation promotes FoxP3 regulatory T cell persistence and function via production of IL-2, IL-10, and TGF- β //*J. Immunol.*-2009.-No.183.-P.2232–2241.
- 14 Pure E., Cuff C.A. A crucial role for CD44 in inflammation//*Trends Mol. Med.*-2001.-No.5(7).-P.213-221.
- 15 Ponta H., Sherman L., Herrlich P.A. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators//*Nature Rev.*-2003.-Vol.4.-P.33-45.
- 16 Carmichael J., DeGraff W.G., Gazdar A.F., Minna J.D. Mitchell J.B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing//*Cancer Res.*-1987.-Vol.47.-P.936-942.
- 17 Azze R.O., Olivares M.N., Rodríguez J.C.M. Use of poly-l-lysine precoating in an ELISA for the detection of antibodies against serogroup C *Neisseria meningitidis* capsular polysaccharide//*Biotecnol. Aplicada.*-1999.-Vol.16.-No.3.-P.173-175.
- 18 Pierson W., Liston A. A new role for interleukin-10 in immune regulation// *Immunol. Cell Biol.*-2010.-Vol.88.-P.769–770.
- 19 Stern J.B., Smith K.A. Interleukin-2 induction of T-cell G1 progression and c-myc expression//*Science.*- 1986.-Vol.233.-P.203–206. http://en.wikipedia.org/wiki/Digital_object_identifier
- 20 Thornton A.M., Shevach E.M. CD4+CD25+Immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation *in vitro* by inhibiting interleukin 2 production//*J. Exp. Med.*-1998.-No.2.-P.287–296.

References

- 1 Wing K., Feherrvari Z., Sakaguchi S. Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells // *International Immunology.*-2006.-Vol.18.-No.7.-P. 991-1000.
- 2 Baatar D., Olkhanud P., Sumitomo K., Taub D., Gress R., Biragyn A. Human peripheral blood t regulatory cells (Tregs) functionally primed CCR4+ Tregs and unprimed CCR4+ Tregs, regulate effector T cells using FasL//*J.Immunol.*-2007.-No.178.-P.4891-4900.
- 3 Liu W., Putnam A.L., Xu-yu Z., Szot G.L., Lee M.R., Zhu S., Gottlieb P.A., Kapranov P., Gingeras T.R., Fazekas de St Groth B., Clayberger C., Soper D.M., Ziegler S.F., Bluestone J.A. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ Treg cells//*JEM.* – 2006. – No3. – P.1701-1711.
- 4 Asano M., Toda M., Sakaguchi N., Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation//*J. Exp. Med.*-1996.-Vol.106.-P.387-396.
- 5 Cools N., Ponsaerts P., van Tendeloo V.F.I., Berneman Z.N. Regulatory T cells and human disease//*Clin. Develop. Immunol.*-2007.-Vol.2007. – P.1-11.
- 6 Yang Z.-Z., Novak A.J., Stenson M.J., Witzig T.E., Ansell S.M. Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma // *Blood.* – 2006. – No.9(107). – P. 3639-3646.
- 7 Zheleznikova G.F. Reguljatornye T-limfocity v immunnom otvete na infekciju//*Zh. infektol.* – 2011. – №1(3). – С.6-13.
- 8 Sakaguchi S., Wing K., Onishi Y., Prieto-Martin P., Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses?//*Int. Immunol.* – 2009. – Vol.21. – P.1105-1111.
- 9 Adair-Kirka T.L., Senior R.M. Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation//*Int. J. Biochem. Cell Biol.*-2008.-N40 (6-7).-P.1101–1110.
- 10 Bollyky P., Falk B.A., Wu R.P., Buckner J.H., Wight T.N., Nepom G.T. Intact extracellular matrix and the maintenance of immune tolerance: High molecular weight hyaluronan promotes persistence of induced CD4+CD25+ regulatory T cells//*J. Leukocyte Biol.*-2009.-Vol.86.-P.1-6.
- 11 Sherman L., Sleeman J., Herrlich P., Ponta H. Hyaluronate receptors: Key players in growth, differentiation, migration and tumor progression//*Curr. Opin. Cell Biol.*-1994.-No.6.-P.726-733.
- 12 Bollyky P.L., Lord J. D., Masewicz S.A., Evanko S.P., Buckner J.H., Wight T.N., Nepom G.T. Cutting edge: High molecular weight hyaluronan promotes the suppressive effects of CD4+CD25+ regulatory T cells//*J. Immunol.*-2007. – No.179. – P.744–747.
- 13 Bollyky P.L., Falk B.A., Long S.A., Preisinger A., Braun K.R., Wu R.P., Evanko S.P., Buckner J.H., Wight T.N., Nepom G.T. CD44 costimulation promotes FoxP3 regulatory T cell persistence and function via production of IL-2, IL-10, and TGF- β //*J. Immunol.*-2009.-No.183.-P.2232–2241.
- 14 Pure E., Cuff C.A. A crucial role for CD44 in inflammation//*Trends Mol. Med.* – 2001. – No.5(7). – P.213-221.
- 15 Ponta H., Sherman L., Herrlich P.A. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators//*Nature Rev.* – 2003. – Vol.4. – P.33-45.
- 16 Carmichael J., DeGraff W.G., Gazdar A.F., Minna J.D. Mitchell J.B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing//*Cancer Res.* – 1987. – Vol.47. – P.936-942.
- 17 Azze R.O., Olivares M.N., Rodríguez J.C.M. Use of poly-l-lysine precoating in an ELISA for the detection of antibodies against serogroup C *Neisseria meningitidis* capsular polysaccharide//*Biotecnol. Aplicada.* – 1999. – Vol.16. – No.3. – P.173-175.
- 18 Pierson W., Liston A. A new role for interleukin-10 in immune regulation// *Immunol. Cell Biol.* – 2010. – Vol.88. – P.769–770.
- 19 Stern J.B., Smith K.A. Interleukin-2 induction of T-cell G1 progression and c-myc expression//*Science.* – 1986. – Vol.233. – P.203–206.
- 20 Thornton A.M., Shevach E.M. CD4+CD25+Immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation *in vitro* by inhibiting interleukin 2 production//*J. Exp. Med.* – 1998. – No.2. – P.287–296.