

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 618.19-006.6-08:612.112.94:616-006-092.18

*А.И. Черткова, Е.Г. Славина, Л.Г. Жукова, И.П. Ганьшина,
М.А. Окружнова, Э.К. Шоуа, В.А. Нуртдинова, А.А. Борунова, З.Г. Кадагидзе*
**СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ
ПРИ HER2-ПОЛОЖИТЕЛЬНОМ
И ТРИЖДЫ-НЕГАТИВНОМ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**
ФГБНУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина», Москва

Контактная информация

Славина Елена Григорьевна, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии опухолей НИИ КО
адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(499)324-94-14
e-mail: elena.slavina@gmail.com

Статья поступила 16.03.2015, принята к печати 27.04.2015.

Резюме

Целью настоящей работы было исследование связи между исходным количеством основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови и результатами проведенной терапии у больных HER2⁺ РМЖ и Т-Н РМЖ. До начала лечения проводилось иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови пациенток методом проточной цитометрии с использованием панели моноклональных антител к поверхностным маркерам лимфоцитов и внутриклеточному антигену FOXP3 и определение цитотоксической активности НК-клеток с помощью полуавтоматического колориметрического МТТ-теста в отношении клеток К-562. Были выявлены определенные различия в популяционном составе лимфоцитов и количестве регуляторных Т-клеток у больных HER2⁺ РМЖ и Т-Н РМЖ. Обсуждается связь между количеством супрессорных клеток и степенью лечебного патоморфоза опухоли.

Ключевые слова: HER2⁺ рак молочной железы, трижды негативный рак молочной железы, лечебный патоморфоз опухоли, регуляторные Т-клетки.

*A.I. Chertkova, E.G. Slavina, L.G. Zhukova, I.P. Ganshina,
M.F. Okruzhnova, E.K. Shoua, V.A. Nurtdinova, A.A. Borunova, Z.G. Kadagidze*
**LYMPHOCYTE SUBSETS
IN PERIPHERAL BLOOD OF HER2-POSITIVE
AND TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER PATIENTS**
FSBSI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», Moscow

Abstract

The aim of this study was to investigate the relationship between the original amount of basic lymphocyte subpopulations in peripheral blood and the results of therapy in patients with HER2⁺ and triple negative breast cancer. Before treatment was conducted immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes by flow cytometry using a panel of monoclonal antibodies to surface markers and intracellular lymphocyte antigen FOXP3 and determining the cytotoxic activity of NK-cells. Cytotoxic activity was determined with MTT colorimetric test against K-562 cells. Revealed some differences in the composition of the population of lymphocytes and the number of regulatory T cells in patients with HER2⁺ and triple negative breast cancer (BC). Discuss the relationship between the number of suppressor cells and the degree of therapeutic pathomorphosis of tumor.

Key words: HER2⁺ breast cancer, tripl negative breast cancer, pathomorphosis of tumor, regulatory T cells.

Введение

РМЖ является наиболее частым вариантом злокачественных опухолей у женщин во всем мире. Для РМЖ характерна клиническая и молекулярная

гетерогенность. У 20–30 % больных определяется гиперэкспрессия рецептора эпидермального фактора роста 2 (HER2⁺ РМЖ). Приблизительно в 10–20 % случаев диагностируется так называемый трижды-негативный РМЖ (Т-Н РМЖ), который

характеризуется отсутствием рецепторов к эстрогенам и прогестерону, а также отсутствием гиперэкспрессии HER2 [7]. Эффективность различных методов лечения злокачественных опухолей и прогноз заболевания в значительной степени зависят от состояния иммунной системы пациентки [16]. Опухоль активно защищается от иммунной атаки, используя различные механизмы иммуносупрессии, приводящие к развитию толерантности к антигенам опухолевых клеток [10]. В экспериментальных и клинических исследованиях в последние десятилетия активно изучалась роль различных популяций регуляторных клеток, препятствующих развитию эффективного противоопухолевого иммунного ответа. Значительное внимание уделялось CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (Treg) и CD8⁺CD28⁻ Т-клеткам, повышение количества которых в опухолевой ткани и периферической крови (ПК) в большинстве случаев коррелирует с плохим прогнозом заболевания [2; 8]. В настоящей работе у больных HER2⁺ РМЖ и Т-Н РМЖ определяли связь между исходным количеством основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови и результатами проведенной терапии. Особое внимание уделялось популяциям регуляторных Т-клеток с фенотипом CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ и CD8⁺CD28⁻.

Материалы и методы

В исследование были включены пациентки с HER2⁺ РМЖ с местно-распространенными первично-неоперабельными формами, с изолированными метастазами в л/у и висцеральные органы (n = 24) и Т-Н РМЖ с местно-распространенными первично-неоперабельными формами (n = 31). Контролем служили здоровые женщины (n = 28). Все включенные в исследование пациентки после соответствующей терапии (химиотерапия при Т-Н и химиотерапия и/или таргетная терапия при HER2⁺ РМЖ) получали оперативное лечение и в операционном материале определялась степень лечебного патоморфоза опухоли. Пациенток с каждой формой РМЖ делили на 2 группы в соответствии со степенью лечебного патоморфоза: HER2⁺ РМЖ группа А (n=13) – пациентки с признаками патоморфоза 0–II степени и группа В (n=11) – пациентки с признаками патоморфоза III–IV степени; Т-Н РМЖ: группа С (n=11) – пациентки с признаками патоморфоза 0–2 степени и группа D (n=20) – пациентки с признаками патоморфоза III–IV степени. Иммунологическое обследование больных проводилось до начала лечения. Оно заключалось в иммунофенотипировании лимфоцитов ПК и определении ЦТА естественных киллеров (НК-клеток). Иммунофенотипирование лимфоцитов ПК проводили методом проточной цитометрии с использованием панели моноклональных антител производства компаний eBioscience (USA) и «Сорбент» (Россия) к поверхностным маркерам лимфоцитов и внутриклеточному антигену FOXP3. ЦТА определялась полуавтоматическим колориметрическим МТТ-тестом в отношении клеток К-562 [14]. Для статистической

обработки результатов использовали пакет статистических программ «Статистика 7». Различия между средними значениями показателей определяли с помощью U-критерия Манна-Уитни и t-критерия Стьюдента. Для определения связи между изучаемыми признаками проводился непараметрический корреляционный анализ Спирмена. Различия между показателями считали статистически значимыми при P < 0,05. Результаты представлены в виде среднего арифметического значения показателя ± стандартное отклонение (m±St.Dev).

Результаты и обсуждение

Как видно из представленных в табл. 1 данных, статистически значимые отклонения от нормы субпопуляционного состава лимфоцитов у больных с HER2⁺ РМЖ в большей степени были выражены в группе В (патоморфоз III–IV степени), чем в группе А (патоморфоз 0–II степени). Однако, статистической взаимосвязи между количеством CD3⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺HLA-DR⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺ и CD3⁺CD38⁺ лимфоцитов и степенью лечебного патоморфоза опухоли выявлено не было. Повидимому, указанные выше незначительные нарушения субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови, обнаруженные до лечения у обследованных нами пациенток с HER2⁺ РМЖ, не имели большого значения для эффективности проводимого им лечения. Ранее мы обнаружили тенденцию к нормализации измененных показателей в процессе химио-и/или таргетной (трастузумаб + лапатиниб) терапии больных HER2⁺ РМЖ [3]. Нарушения субпопуляционного состава лимфоцитов ПК у пациенток с Т-Н РМЖ (табл. 2) были менее выражены, чем у больных HER2⁺ РМЖ (табл. 1).

Основными клетками-эффекторами противоопухолевого иммунитета являются CD8⁺ Т-лимфоциты. В то же время, описано несколько популяций CD8⁺ Т-клеток-супрессоров, способных подавлять пролиферативную и цитотоксическую активность Т-клеток-эффекторов. Особый интерес представляют CD8⁺CD28⁻ Т-клетки, повышение количества которых в опухолевом микроокружении и в периферической крови по данным различных авторов ассоциируется с опухолевым ростом. CD8⁺CD28⁻ Т-клетки являются гетерогенной популяцией и включают в себя как клетки-супрессоры, так и клетки-эффекторы. Это подтверждается продукцией ими и супрессорных (IL-10, IL-4, TGF-β) и эффекторных (IFN-γ, TNF-α) цитокинов [8]. Во многих экспериментальных и клинических исследованиях эта популяция характеризуется в основном как супрессорная [8; 9; 13; 18]. Filaci et al. [8] продемонстрировали, что только CD8⁺CD28⁻, но не CD8⁺CD28⁺ Т-клетки, выделенные из опухолевой ткани и метастатических лимфоузлов 42 больных с различными нозологическими формами злокачественных опухолей, обладали супрессорной активностью. Клетки-супрессоры с фенотипом CD8⁺CD28⁻ были обнаружены и в периферической крови этих пациентов.

Таблица 1

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови пациенток с HER2⁺ РМЖ

Маркер	HER2 ⁺ РМЖ			P
	Патоморфоз 0-II степени (группа А)	Патоморфоз III-IV степени (группа В)	Контроль	
	(m±St.Dev.) % n = 13	(m±St.Dev.) % n = 11	(m±St.Dev.) % n = 28	
	1	2	3	
CD3 ⁺	69,4±13,5	67,3±11,5	74,9±6,3	P _{2,3} = 0,012
CD4 ⁺	38,2±12,2	38,3±11,4	44,5±10,4	
CD3 ⁺ CD4 ⁺	37,2±12,3	37,7±11,6	44,2±10,5	
CD8 ⁺	20,9±10,8	20,1±11,5	26,0±8,9	
CD3 ⁺ CD8 ⁺	16,7±10,8	14,7±10,9	20,4±7,8	P _{2,3} = 0,041
CD4/CD8	2,1±0,85	2,7±2,2	1,96±0,95	
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	8,3±4,9	9,8±5,8	6,6±2,7	P _{2,3} = 0,024
CD3 ⁺ CD38 ⁺	6,4±4,1	7,1±4,8	16,4±13,2	P _{1,3} = 0,024; P _{2,3} = 0,039
CD16 ⁺ CD56 ⁺	36,2±22,8	33,6±16,2	24,8±10,7	
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	16,2±18,4	11,6±6,4	9,8±5,6	
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	19,8±13,7	22,0±12,4	15,0±7,7	P _{2,3} = 0,039
CD19 ⁺	5,7±3,8	6,6±5,3	8,0±5,7	
CD8 ⁺ CD28 ⁺	9,5±6,0	5,7±5,2	11,8±5,2	P _{1,2} = 0,048; P _{2,3} = 0,0012
CD8 ⁺ CD28 ⁻	14,0±5,0	17,5±7,4	15,0±9,1	
CD8 ⁺ CD28 ⁺ /CD8 ⁺ CD28 ⁻	0,76±0,57	0,32±0,20	1,15±0,88	P _{1,2} = 0,007; P _{2,3} = 0,0004
ЦТ активность ЕК-клеток	42,3±11,3	42,6±23,9	44,6±12,4 (n=19)	
CD4 ⁺ CD25 ⁺	5,6±3,3	5,8±2,1	9,1±4,3 (n=14)	P _{1,3} = 0,029; P _{2,3} = 0,035
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺	0,23±0,26	0,77±1,1	0,26±0,14 (n = 14)	P _{1,2} = 0,0026; P _{2,3} = 0,005

Таблица 2

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови пациенток с Т-Н РМЖ.

Маркер	Т-Н РМЖ			P
	Патоморфоз 0-III степени (группа С)	Патоморфоз III-IV степени (группа D)	Контроль	
	(m±St.Dev.) % n = 11	(m±St.Dev.) % n = 20	(m±St.Dev.) % n = 28	
	1	2	3	
CD3 ⁺	70,2±9,9	73,3±8,3	74,9±6,3	
CD4 ⁺	42,9±8,7	44,1±7,5	44,5±10,4	
CD3 ⁺ CD4 ⁺	39,5±8,4	45,7±6,0	44,2±10,5	P _{1,2} = 0,03
CD8 ⁺	25,6±11,8	24,1±12,3	26,0±8,9	
CD3 ⁺ CD8 ⁺	21,4±12,2	18,4±12,8	20,4±7,8	
CD4/CD8	1,94±1,17	2,44±1,53	1,96±0,95	
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	6,96±3,3	11,1±6,98	6,6±2,7	P _{2,3} = 0,037
CD3 ⁺ CD38 ⁺	9,7±11,1	5,4±2,9	16,4±13,2	P _{2,3} = 0,009
CD16 ⁺ CD56 ⁺	25,7±8,1	25,9±7,6	24,8±10,7	
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	9,4±6,1	10,4±6,3	9,8±5,6	
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	15,9±6,8	13,1±6,4	15,0±7,7	
CD19 ⁺	7,2±6,0	7,2±3,9	8,0±5,7	
CD8 ⁺ CD28 ⁺	10,1±6,8	7,7±4,5	11,8±5,2	P _{2,3} = 0,009
CD8 ⁺ CD28 ⁻	13,7±10,9	15,9±8,7	15,0±9,1	
CD8 ⁺ CD28 ⁺ /CD8 ⁺ CD28 ⁻	0,997±0,73	0,52±0,27	1,15±0,88	P _{1,2} = 0,019; P _{2,3} = 0,006
ЦТ активность ЕК-клеток	48,5±26,4	57,3±20,8	44,6±12,4 (n=19)	P _{2,3} = 0,036
CD4 ⁺ CD25 ⁺	8,1±3,5	7,4±8,8	9,1±4,3	

Ни у одного из обследованных здоровых доноров (> 50 человек) эти клетки супрессорную активность не проявляли. При различных патологических состояниях большое значение имеет баланс между $CD8^+CD28^+$ и $CD8^+CD28^-$ Т-клетками [6]. Мы обнаружили у пациенток группы В статистически значимое уменьшение величины соотношения $CD8^+CD28^+/CD8^+CD28^-$ по сравнению с контролем и по сравнению с группой А, которое было главным образом связано со снижением количества $CD8^+$ Т-лимфоцитов, экспрессирующих костимуляторный рецептор $CD28$ ($CD8^+CD28^+$). Среднее значение этого показателя в группе В было в 2 раза ниже, чем в контрольной группе (табл. 1). Непараметрический корреляционный анализ Спирмена выявил умеренную статистически значимую отрицательную связь между степенью лечебного патоморфоза опухоли и величиной соотношения $CD8^+28^+/CD8^+28^-$ в периферической крови больных $HER2^+$ РМЖ (коэффициент корреляции $r=-0,480$, $P=0,0018$). Статистически значимой взаимосвязи между величиной соотношения $CD8^+CD28^+/CD8^+CD28^-$ Т-клеток и количеством $CD3^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD3^+CD16^+CD56^+$ и $CD3^+CD38^+$ лимфоцитов выявлено не было.

Следует отметить, что как и у больных $HER2^+$ РМЖ (группа В), у пациенток с Т-Н РМЖ с высокой степенью лечебного патоморфоза (группа D) было снижено процентное содержание $CD8^+CD28^+$ клеток по сравнению с контролем и величина соотношения $CD8^+CD28^+/CD8^+CD28^-$ по сравнению с контролем и группой С (табл. 2). Однако корреляционный анализ Спирмена не выявил в данном случае связи между степенью лечебного патоморфоза опухоли и соотношением $CD8^+CD28^+/CD8^+CD28^-$ или количеством $CD8^+CD28^+$ Т-лимфоцитов.

Важную роль в обеспечении иммунологической аутоотолерантности и негативном контроле как патологических, так и физиологических иммунных реакций играют регуляторные $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Т-клетки. Они могут подавлять пролиферативную и функциональную активность различных иммунокомпетентных клеток, включая $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки, и наряду с другими иммуносупрессивными факторами обеспечивать прогрессивный рост опухоли [17]. При многих вариантах злокачественных опухолей, в том числе и при РМЖ, повышение количества регуляторных $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Т-клеток в опухолевом узле и периферической крови коррелирует с плохим прогнозом заболевания [2]. Однако при раке толстой кишки [11], сквамозоклеточной карциноме головы и шеи [4] и при некоторых других формах опухолей было обнаружено, что повышенное количество Трег в опухоли может являться благоприятным признаком и ассоциироваться с увеличением выживаемости и продолжительности безрецидивного периода. В то же время, имеются сообщения о корреляции повышенного количества Трег в опухоли и периферической крови больных раком толстой кишки с прогрессивным опухолевым ростом [12].

Проведенное нами исследование показало, что до лечения у пациенток с $HER2^+$ РМЖ с III–IV

степенью лечебного патоморфоза (группа В) среднее количество Трег в периферической крови было в 3,34 раза выше, чем у пациенток с 0–II степенью (группа А) ($P=0,0026$), и в 2,96 выше, чем в контроле ($P=0,005$; табл. 1, рис.).

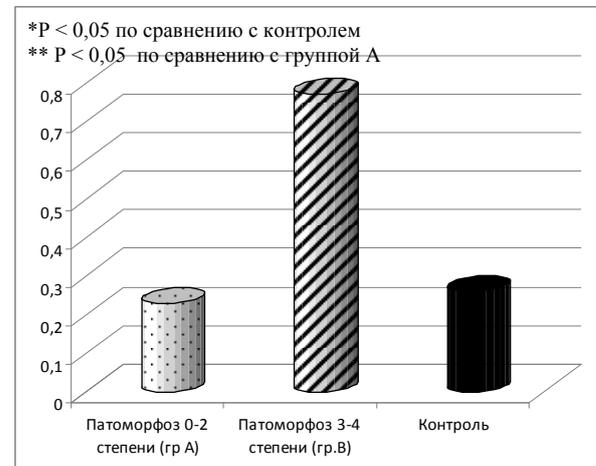


Рис. Количество регуляторных $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Т-клеток у пациенток с $HER2^+$ РМЖ с различной степенью лечебного патоморфоза опухоли.

Непараметрический корреляционный анализ Спирмена выявил умеренную положительную связь между степенью лечебного патоморфоза опухоли и процентным содержанием Трег в периферической крови больных $HER2^+$ РМЖ (коэффициент корреляции $r=0,547$ $P=0,0069$). По мнению различных авторов, положительная роль Трег в определенных ситуациях может быть связана с их влиянием на воспаление, которое сопровождает опухолевый рост и является одним из важных факторов, способствующих пролиферации опухолевых клеток, ангиогенезу и метастазированию [4; 5; 11]. С другой стороны, повышение количества Трег может отражать реакцию клеток-супрессоров на эффективный противоопухолевый иммунный ответ, существующий до лечения у пациенток с высоким ответом на противоопухолевую терапию. У больных с различными вариантами злокачественных опухолей, включая рак молочной железы, часто обнаруживаются спонтанно возникшие активированные Т-клетки и антитела к различным опухолеассоциированным антигенам [15]. Ранее мы продемонстрировали значительно более выраженное снижение количества Трег у эффективно леченных больных $HER2^+$ РМЖ (с высокой степенью лечебного патоморфоза опухоли), по сравнению с пациентками с низкой степенью, после 2–4 курсов химио-и/или таргетной (трастузумаб + лапатиниб) терапии [3]. Можно предположить, что уменьшение опухолевой нагрузки под действием терапии и эффективного иммунного ответа приводит к снижению активности последнего и соответственно снижению количества регуляторных Т-клеток. Частично это подтверждается обнаруженной нами статистически значимой положительной корреляцией

между уровнем Трег в периферической крови у больных HER2⁺ РМЖ и степенью лечебного патоморфоза опухоли. Полученные нами результаты и данные других авторов позволяют сделать вывод о том, что повышенное по сравнению с нормой количество регуляторных CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Т-клеток в опухолевом узле и периферической крови до лечения не во всех случаях следует рассматривать как отрицательный фактор прогноза заболевания. Необходимо изучать динамику изменений этого показателя в процессе лечения и корреляцию этих изменений с выживаемостью и продолжительностью безрецидивного периода.

В исследованиях нашей лаборатории у больных первично-операбельным РМЖ мы обнаружили, что количество регуляторных НКТ и CD8⁺CD28⁻ лимфоцитов зависело от стадии заболевания: оно было выше нормы на ранних и снижалось до нормы на поздних стадиях заболевания [1].

Определение ЦТА НК-клеток у всех обследованных пациенток до лечения показало, что у больных HER2⁺ РМЖ ЦТА НК-клеток была практически одинаковой у больных обеих групп (А и В) и не отличалась от контроля.

В то же время, при Т-Н РМЖ среднее значение показателя в группе пациенток с высокой степенью патоморфоза было выше, чем в контроле (p=0,036) и в группе с низкой степенью патоморфоза, хотя в последнем случае различие не было статистически значимым (табл. 1 и 2).

Литература

1. Кадагидзе З.Г., Черткова А.И., Заботина Т.Н. и др. Основные субпопуляции регуляторных лимфоцитов у больных злокачественной меланомой и раком молочной железы // Иммунология. – 2014. – 35. – С. 64–67.
2. Кадагидзе З.Г., Черткова А.И., Славина Е.Г. Регуляторные Т-клетки и их роль в противоопухолевом иммунном ответе // Вопр. Онкол. – 2009. – 55 – С. 269 – 77.
3. Черткова А.И., Славина Е.Г., Ганьшина И.П. и др. Популяционный состав лимфоцитов периферической крови больных РМЖ с гиперэкспрессией HER-2 в процессе таргетной терапии трастузумабом и лапатинибом // Вестник «РОНЦ им. Н.Н. Блохина». – 2014. – 25. – С. 59–63.
4. Badoual C., Hans S., Rodriguez J. et al. Prognostic value of tumorinfiltrating CD4(+) T-cell subpopulations in head and neck cancers // Clin. Cancer Res. – 2006. – 12. – P. 465–72.
5. Colotta F., Allavena P., Sica A. Cancer related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability // Carcinogenesis. – 2009. – 30. – P. 1073–81.
6. Dai S.X., Wu G., Zou Y. et al. Balance of CD8⁺ CD28⁺/CD8⁺ CD28⁻ T lymphocytes is vital for patients with ulcerative colitis // Dig. Dis. Sci. – 2013. – 58. – P. 88–96.
7. de Ruijter T.C., Veeck J., de Hoon J. P. J., van Engeland M. Characteristics of triple-negative breast cancer // J Cancer Res. Clin.Oncol. – 2011. – 137 – P. 183–92.
8. Filaci G., Fenoglio D., Fravega M. CD8⁺CD28⁻ T regulatory lymphocytes inhibiting T cell proliferative and cytotoxic functions infiltrate human cancers // J. Immunol. – 2007. – 179. – P. 4323–34.

Выводы

1. У больных HER2⁺ РМЖ с высокой степенью лечебного патоморфоза опухоли до лечения выявляется повышение количества регуляторных CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Т-клеток по сравнению с пациентками с низкой степенью патоморфоза и с контролем.
2. У больных HER2⁺ РМЖ и Т-Н РМЖ с высокой степенью лечебного патоморфоза опухоли до лечения определяется уменьшение величины соотношения CD8⁺CD28⁺/CD8⁺CD28⁻ Т-клеток.
3. У больных Т-Н РМЖ с высокой степенью патоморфоза до лечения наблюдается повышение цитотоксической активности естественных киллеров.
4. Определение связи между состоянием иммунной системы до лечения и эффективностью проводимой терапии, продолжительностью безрецидивного периода, развитием метастазов и общей продолжительностью жизни пациентов может помочь в разработке индивидуальных подходов к терапии больных злокачественными новообразованиями.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-00867.

9. Karagöz B., Bilgi O., Gümüs M. et al. CD8⁺CD28⁻ cells and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the peripheral blood of advanced stage lung cancer patients // *Med.Oncol.* – 2010. – 27. – P. 29–33
10. Kim R., Emi M., Tanabe K. Cancer immunosuppression and autoimmune disease: beyond immunosuppressive networks for tumour immunity // *Immunology.* – 2006. – 119. – P. 254–64.
11. Ladoire S., Martin F., Ghiringhelli F. Prognostic role of FOXP3⁺ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: the paradox of colorectal cancer // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2011. – 60. – P. 909–18.
12. Liu Z., Huang Q., Liu G. et al. Presence of FOXP3⁺Treg cells is correlated with colorectal cancer progression // *Int. J. Clin. Exp. Med.* – 2014. – 7. – P. 1781–85.
13. Meloni F., Morosini M., Solari N. et al. Foxp3 expressing CD4⁺CD25⁺ and CD8⁺CD28⁻ T regulatory cells in the peripheral blood of patients with lung cancer and pleural mesothelioma // *Hum. Immunol.* – 2006. – 67. – P. 1–12.
14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay // *J. Immunol. Meth.* – 1983. – 65. – P. 55–63.
15. Nagorsen D., Scheibenbogen C., Marincola F.M. et al. Natural T Cell Immunity against Cancer // *Clin. Cancer Res.* – 2003. – 9. – P. 4296–03.
16. Quezada S.A., Peggs K.S., Simpson T.R., Allison J.P. Shifting the equilibrium in cancer immunoediting: from tumor tolerance to eradication // *Immunol. Rev.* – 2011. – 241. – P. 104–18.
17. Shevach E.M. Mechanisms of Foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression // *Immunity.* – 2009. – 30. – P. 636–45.
18. Urbaniak-Kujda D., Kapelko-Słowik K., Wołowicz D. et al. Increased percentage of CD8⁺CD28⁻ suppressor lymphocytes in peripheral blood and skin infiltrates correlates with advanced disease in patients with cutaneous T-cell lymphomas // *Postepy Hig. Med. Dosw.* – 2009. – 63. – P. 355–59.