

УДК 577.2

Представленность опухоль-инфильтрирующих В-клеток в злокачественных эпителиальных опухолях человека

Е. А. Петров¹, Д. М. Малабуйок¹, Х. Чженг², Ю. А. Мокрушина^{1,3}, В. А. Абрикосова¹, Ю. Б. Кузьмин⁴, П. В. Царапаев⁴, С. О. Кочкина⁴, И. В. Ельцов⁴, В. Д. Кнорре¹, И. В. Смирнов^{1,3,5*}, С. С. Терехов¹, З. З. Мамедли⁴, Н. Е. Кушлинский⁴, Д. В. Рогожин⁴, В. Б. Матвеев⁴, П. В. Кононец⁴, И. С. Стилиди⁴, Х. Чжанг², А. Г. Габибов^{1,3}

¹ Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

²State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology and College of Life Sciences, Nankai University, 94 Weijin Road, Tianjin, 300071 China

³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

⁴НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, 115522 Россия

⁵НМИЦ эндокринологии Минздрава России, Москва, 117292 Россия

*E-mail: ivansmr@inbox.ru

Поступила в редакцию 13.12.2023

Принята к печати 28.07.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27353

РЕФЕРАТ Онкологические заболевания остаются актуальной проблемой глобального здравоохранения. В число ключевых факторов, влияющих на течение заболевания, входят тип злокачественного новообразования и развитие иммунного ответа пациента на опухоль. Важную роль в формировании противоопухолевого ответа играет степень инфильтрации опухоли лимфоцитами, которая коррелирует с благоприятным прогнозом терапии определенных нозологических форм рака. Мы проанализировали представленность опухоль-инфильтрирующих В-клеток (ТІВ) в солидных опухолях различной нозологии. Показана повышенная представленность ТІВ в образцах рака ободочной и сигмовидной кишки по сравнению с образцами рака слепой и прямой кишки, а также рака почки. Медианные значения и интерквартильные интервалы доли ТІВ составляли соответственно 11.5%, 4–20% при раке ободочной кишки, 6%, 3–11% – раке сигмовидной кишки, 2.7%, 0.7–3.7% – раке слепой кишки, 2.5%, 0.9–3.6% – раке прямой кишки, 1.4%, 1.0–2.3% – раке почки и 3.0%, 1.8–12% – раке легкого. В то же время не выявлено достоверных отличий в представленности ТІВ в образцах рака разной стадии. Полученные результаты представляют особый интерес, указывая на высокий потенциал исследования рака ободочной кишки для поиска потенциальных онкомаркеров, а также изучения противоопухолевого ответа к обнаруженным онкомаркерам. Таким образом, дальнейшее изучение разнообразия ТІВ в злокачественных опухолях ободочной кишки позволит расширить наши знания о патогенезе и клиническом течении заболевания и будет способствовать идентификации новых молекулярных мишеней для направленной противоопухолевой терапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА опухоль-инфильтрирующие В-клетки, колоректальный рак, солидные опухоли.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ КРР – колоректальный рак; НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого; ПЖР – светлоклеточный почечноклеточный рак; ТІВ – tumor infiltrated В-cells (опухоль-инфильтрирующие В-клетки).

ВВЕДЕНИЕ

Злокачественные новообразования представляют одну из важнейших медико-социальных проблем. По данным ВОЗ, показатель заболеваемости раком продолжает неуклонно расти. Наиболее распространенными онкозаболеваниями являются рак молочной железы, рак легкого, рак толстой кишки и рак предстательной железы. Несмотря на улучшение

качества лечения и новые методы терапии, уровень смертности при некоторых видах опухолей, например, при раке легкого, толстой кишки и печени, остается на очень высоком уровне [1].

Опухоль-инфильтрирующие иммунные клетки играют ключевую роль в развитии иммунного ответа организма на опухоль, они способны проявлять как проопухолевое, так и противоопухолевое

действие. Опухоль-инфильтрирующие иммунные клетки представляют собой гетерогенную популяцию, включающую Т-клетки, В-клетки, естественные киллерные (НК) клетки, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки. Субпопуляционный состав и процентное соотношение иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль, могут варьировать в зависимости от вида и стадии рака, а также от пациента к пациенту [2]. Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ТИЛ) включают Т- и В-клетки, которые вышли из кровотока и мигрировали к опухоли. Присутствие ТИЛ в опухоли может быть прогностическим маркером благоприятного течения заболевания и эффективности терапии [3].

Исследования адаптивного иммунитета в онкоиммунологии в большей степени сосредоточены на CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитах (CTL). CTL признаются основными эффекторами противоопухолевого иммунного ответа, они обеспечивают прямое уничтожение трансформированных клеток. Высокий уровень инфильтрации опухоли CTL коррелирует с благоприятным прогнозом течения заболевания и увеличением общей выживаемости пациентов с многими видами рака [4]. CD4+ Т-клетки являются неотъемлемой частью адаптивного иммунитета, но роль, которую они играют в формировании иммунного ответа на опухоль, остается предметом споров [5]. Подобно CD8+ Т-клеткам, существуют опухолеспецифичные CD4+ Т-хелперные клетки (Th), способные распознавать опухолевые антигены и эффективно замедлять рост опухоли в модельных животных в отсутствие CTL [6]. Однако основное противоопухолевое действие CD4+ Th-клеток заключается в Th-опосредованной активации CTL для распознавания и уничтожения опухолевых клеток или активации других иммунных клеток, включая В-клеточное звено иммунного ответа [7]. В то же время известно, что субпопуляция CD4+ Т-регуляторных лимфоцитов (Treg) напротив оказывает иммуносупрессивное действие в основном за счет продукции цитокинов (IL-10 и TGFβ) и может подавлять противоопухолевую функцию эффекторных клеток микроокружения опухоли, способствуя злокачественному росту и неблагоприятному исходу [8].

Меньше известно о проникающих в опухоль В-клетках, которые часто колокализуются с Т-клетками, иногда образуя организованные лимфоидные структуры [9]. Опухоль-инфильтрирующие В-клетки (ТИВ) воздействуют на злокачественные новообразования посредством двух противоположных механизмов и могут как способствовать развитию опухоли, так и подавлять ее рост [10]. Противоопухолевое действие В-клеток реализуется различными способами. При развитии гумораль-

ного ответа на опухолевые неоантигены В-клетки дифференцируются в плазматические клетки и секретируют опухолеспецифичные антитела, которые опосредуют антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), комплементзависимую цитотоксичность (CDC) или антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). Помимо продукции антител, В-клетки могут секретировать различные цитокины, влияя на функцию других иммунных клеток в микроокружении опухоли, причем действие может быть разнонаправленным. Так, секреция В-клетками IL-12 опосредует пролиферацию и противоопухолевое действие Т- и НК-клеток, а секреция IL-10 регуляторными В-клетками (Breg), направленная на подавление аутоиммунного ответа, может оказывать проопухолевое действие [11]. Кроме того, В-клетки способны выступать в качестве антигенпрезентирующих клеток (APC), при активации Th2-клеток CD40-лигандом они экспрессируют хемокины и костимулирующие факторы и индуцируют развитие Т-клеточного противоопухолевого иммунного ответа [12]. Таким образом, ТИВ обладают широким потенциалом для уничтожения опухолевых клеток и оказывают значительное влияние на баланс активации или супрессии других иммунных клеток в микроокружении опухоли.

Наиболее широко ТИВ изучали при раке молочной железы, где они найдены в 25% случаев и составляют до 40% популяции лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль. От представленности ТИВ при раке молочной железы зависят прогноз выживаемости пациентов и выбор терапии [13]. На данный момент известна положительная корреляция представленности ТИВ с благоприятным клиническим исходом меланомы [14], рака яичников, немелкоклеточного рака легкого [15], плоскоклеточного рака шейки матки [16, 17].

Цель настоящего исследования состояла в оценке представленности В-лимфоцитов в различных нозологических формах онкологических заболеваний и в анализе ассоциации содержания В-лимфоцитов с клинико-морфологическими характеристиками заболевания.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В исследование было включено 50 пациентов, проходивших хирургическое лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Злокачественную природу опухоли у всех пациентов клинически верифицировали в рамках планового патоморфологического исследования. В исследование вошли доноры, не получавшие химиотерапию перед проведением оперативного вмешательства. Все пациенты дали информированное согласие на участие в исследовании, работа проведена с соблюдением действующих правовых и этических норм.

Выделение клеток из опухоли

Фрагмент опухоли размером $\sim 0.5\text{--}2\text{ см}^3$ помещали в 50-мл пробирку с фосфатно-солевым буфером (PBS) сразу после проведения резекции опухоли, дальнейшую работу с материалом начинали в течение 1.5–3 ч после операции. Биологический материал транспортировали в лабораторию при комнатной температуре. Образец осаждали в настольной центрифуге (Eppendorf, Германия) в течение 5 мин (100 *g*, 24°C). Супернатант декантировали и добавляли 5 мл рабочей среды (смесь сред DMEM F12 и RPMI 1640 («ПанЭко», Россия) в соотношении 1 : 1, 10% бычьей фетальной сыворотки NuClone (Cytiva, США), с добавлением раствора антибиотика-антимикотика (Thermo Fisher Scientific, США) до 1%). Фрагмент опухоли переносили в 60-мм чашку Петри (SPL, Южная Корея) и механически измельчали с использованием медицинского скальпеля № 10 (Arxmed, Индия) на кусочки размером $\sim 1\text{--}3\text{ мм}^3$. Полученную суспензию переносили в 15-мл пробирку и осаждали в настольной центрифуге (Eppendorf) в течение 5 мин (100 *g*, 24°C). Супернатант декантировали и добавляли 2 мл теплой рабочей среды, содержащей смесь ферментов: 0.5 мг ДНКазы I (Sigma, США), по 1 мг коллагеназы I и IV типов (Merck, США) и 2 мг гиалуронидазы (Microgen, Россия). Пробирку с фрагментами ткани помещали на вращающуюся платформу (Biosan, Латвия) и инкубировали в течение 40 мин при 7 об/мин в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C и 8% CO₂. По окончании инкубации раствор с клетками аккуратно перемешивали 25–50 раз с использованием серологической пипетки для разрушения агрегатов до получения однородной суспензии. Клеточную суспензию последовательно фильтровали через клеточные сита с размером пор 100, 70 и 40 мкм, каждый раз дополнительно промывая использованное сито 2 мл рабочей среды. Клетки осаждали в настольной центрифуге (Eppendorf) в течение 15 мин (300 *g*, 24°C). Клеточный осадок обрабатывали 1 мл АСК-буфера (150 мМ хлорид аммония; 10 мМ бикарбонат калия; 0.1 мМ EDTA-Na₂) в течение 1 мин для лизиса эритроцитов в случае необходимости, реакцию останавливали 2 мл рабочей среды. Клетки осаждали в настольной центрифуге (Eppendorf) в течение 7 мин (300 *g*, 24°C). Супернатант декантировали, клеточный осадок ресуспендировали в 2 мл культуральной среды (DMEM advanced 90% (Thermo Fisher Scientific), бычья фетальная сыворотка NuClone 10% (Cytiva, США), L-аланил-L-глутамин (Yeasen, США) до 2 мМ, антибиотик-антимикотик (Thermo Fisher Scientific) до 1%) и оценивали число жизнеспособных клеток методом исключения красителя трипановый синий с использованием автоматического счетчика клеток

CellDrop FL (DeNovix, США). Часть полученных клеток окрашивали с последующим цитометрическим анализом, оставшуюся часть клеток подвергали криоконсервации в среде КриоМед-М («ПанЭко») согласно инструкции производителя.

Оценка количества В-лимфоцитов с использованием проточной цитофлуориметрии

Диссоциированные клетки опухоли (2 млн) осаждали в настольной центрифуге (Eppendorf) в течение 5 мин (350 *g*, 4°C). Среду декантировали, клеточный осадок ресуспендировали в 100 мкл фосфатно-солевого буфера с добавлением 0.5% БСА и 2 мМ EDTA. Окрашивание проводили с использованием моноклонального антитела мыши (клон 2D1) против общего лейкоцитарного антигена CD45 человека, конъюгированного с флуоресцентной меткой APC-Cy7 (Sony, США), в разведении 1 : 300 и моноклонального антитела мыши (клон H1B19) против В-лимфоцитарного антигена CD19 человека, конъюгированного с флуоресцентной меткой PE-Cy7 (BioLegend, США), в разведении 1 : 1000. Инкубацию с антителами проводили в течение 30 мин в темноте при температуре 4°C. Для идентификации мертвых клеток добавляли краситель SYTOX Green (BioLegend, США) в разведении 1 : 3000 и инкубировали дополнительно в течение 15 мин в темноте при 4°C. Далее образец трехкратно отмывали 500 мкл фосфатно-солевого буфера с добавлением 2 мМ EDTA и ресуспендировали в 100 мкл для анализа окрашивания с помощью проточного цитофлуориметра ACEA Novocyte (ACEA Biosciences, США). Статистическую обработку данных проводили с использованием инструментов Python (seaborn, pandas). Оценивали значения медианы в каждой исследуемой группе, решение о достоверности различий, наблюдаемых между рассматриваемыми выборками, принимали на основании непараметрического U-критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследование включено 50 больных злокачественными новообразованиями различных нозологий: КРР ($n = 31$), НМРЛ ($n = 13$) и ПКР ($n = 6$). Выделение клеток из опухолевого материала проводили по протоколу [18] с некоторыми модификациями. Финальная схема получения гомогенной суспензии клеток включала механическое измельчение образца, диссоциацию фрагментов ткани с использованием смеси ферментов и три последовательных этапа фильтрации через клеточные сита с размером пор 100, 70 и 40 мкм (рис. 1).

Механическая диссоциация включает измельчение фрагмента опухоли с помощью медицинского скальпеля на небольшие кусочки для увеличения

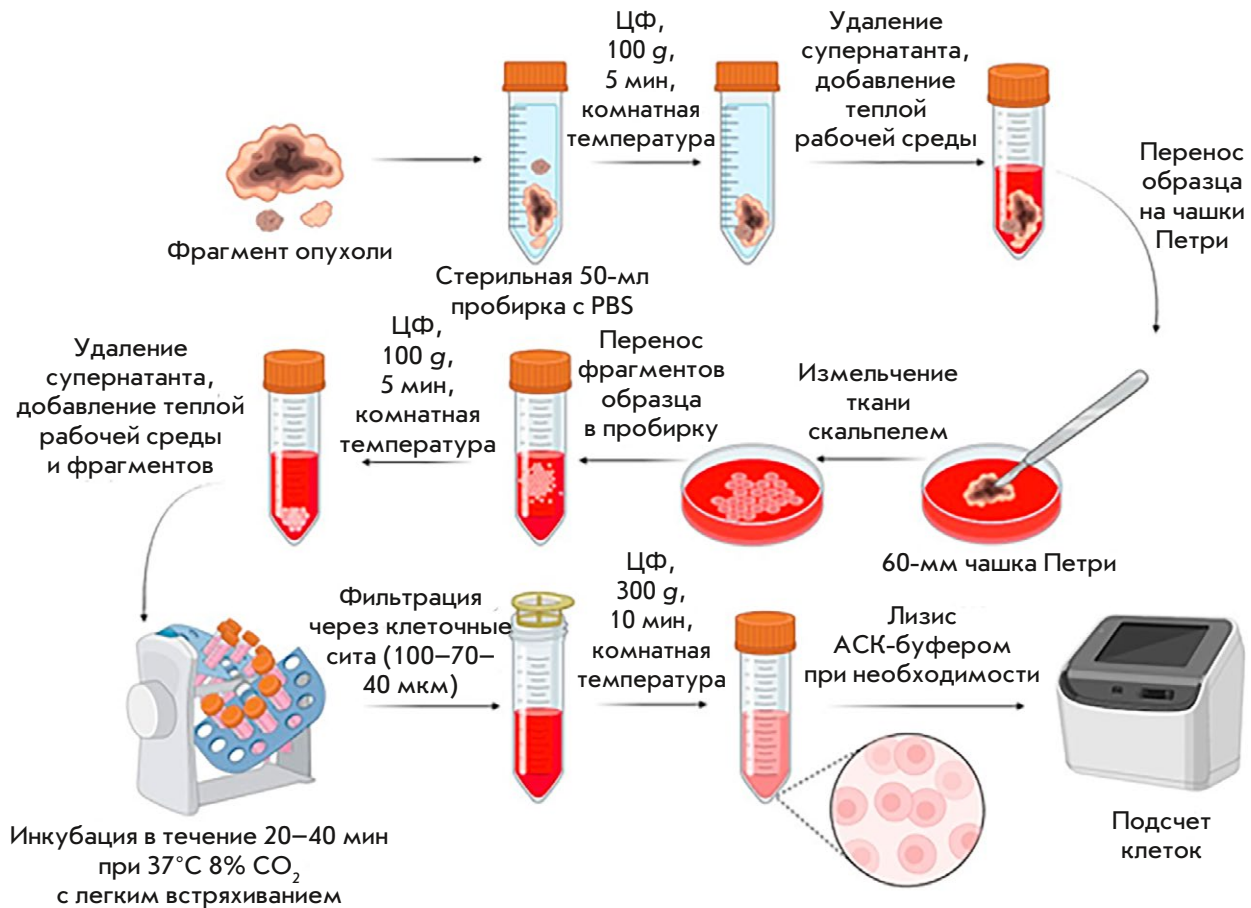


Рис. 1. Схема диссоциации опухолевой ткани

площади контакта ткани с ферментами на следующей стадии. Для разрушения внеклеточного матрикса и получения суспензии клеток опухоли применяют ферментативную диссоциацию с использованием ферментов, обладающих коллагеназной, гликозидазной и протеолитической активностью. Тип ферментов, используемых для диссоциации, может значительно влиять на количественный выход и показатель жизнеспособности получаемых клеток. В ходе исследования была подобрана оптимальная комбинация ферментов, состоящая из гиалуронидазы, ДНКазы I, коллагеназы I и IV типов (1.0; 0.25, 0.5 и 0.5 мг/мл соответственно; см. «Экспериментальная часть»), использование которой приводит к эффективному разрушению клеточных контактов. Эта комбинация позволила нам сократить продолжительность стадии ферментативной диссоциации до 30–40 мин и повысить выход жизнеспособных клеток до 80% и более. Фильтрацию полученной суспензии необходимо для дальнейшей дезагрегации препарата клеток, при этом использование клеточного сита с размером пор 100 мкм позволило эффективно удалять крупные клеточные конгломе-

раты, жировую фракцию и облегчило дальнейшее фильтрование образца через сита с размером пор 70 и 40 мкм для получения гомогенной суспензии клеток. Таким образом, использование сочетания механической и ферментативной диссоциации опухолевой ткани позволило получить однородную суспензию клеток с высоким уровнем жизнеспособности, составляющим в среднем 88%.

Для идентификации и количественной оценки популяции В-клеток, отражающей степень инфильтрации опухолевой ткани, все образцы были проанализированы с помощью проточной цитометрии (рис. 2). Окрашивание проводили с использованием моноклональных антител против общего лейкоцитарного антигена CD45 человека, конъюгированного с флуоресцентной меткой APC-Cy7 (CD45 APC-Cy7), и антител к В-лимфоцитарному антигену CD19 человека, конъюгированному с флуоресцентной меткой PE-Cy7 (CD19 PE-Cy7). На первом этапе на точечной диаграмме FSC (прямое светорассеяние) против SSC (боковое светорассеяние) идентифицировали популяцию клеток из опухоли (рис. 2А), далее отделяли одиночные клетки от кле-

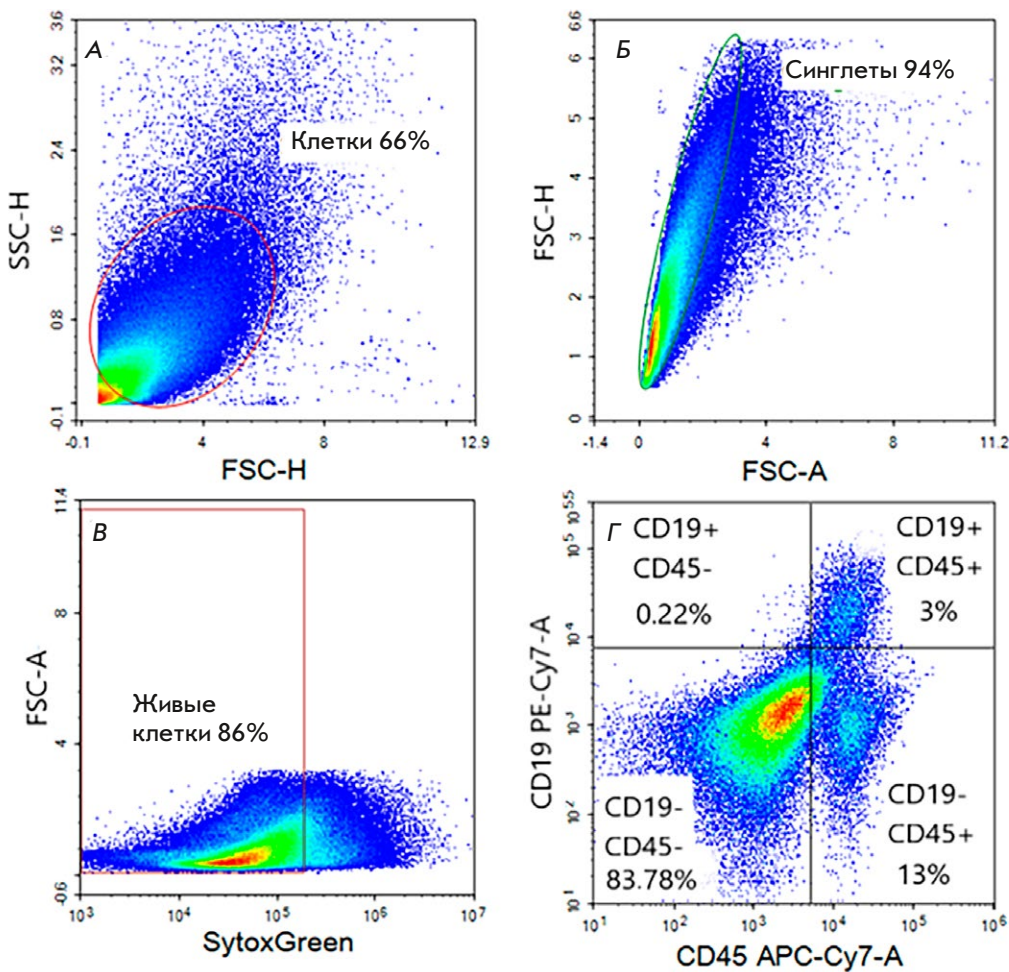


Рис. 2. Стратегия последовательного гейтирования при оценке доли опухоль-инфильтрирующих В-клеток. А – овальной областью выделены клетки, соответствующие по показателям бокового и прямого светорассеяния популяции клеток из опухоли. Б – овальной областью выделены одиночные клетки. В – прямоугольной областью выделена популяция живых клеток. Г – изображение поделено на квадранты, соответствующие субпопуляциям клеток CD45-/CD19-, CD45-/CD19+, CD45+/CD19- и CD45+/CD19+. Субпопуляция клеток CD45+/CD19+ соответствует В-клеткам

точных агрегатов, способных давать завышенное значение флуоресцентного сигнала при дальнейшем определении количества В-клеток (рис. 2Б). На втором этапе проводили гейтирование живых клеток среди одиночных клеток (рис. 2В) по окрашиванию флуоресцентным красителем SytoxGreen, высокоаффинным к нуклеиновым кислотам. Краситель проникает только в клетки с поврежденными плазматическими мембранами, поэтому его используют для оценки жизнеспособности клеток. Затем среди живых клеток выделяли четыре субпопуляции в соответствии с окрашиванием специфическими антителами к поверхностным антигенам CD45 и CD19, где В-клеткам соответствует гейт с двойным положительным окрашиванием (рис. 2Г).

Аналогичным образом были проанализированы образцы клеток образцов всех исследуемых нозологий, содержание количества CD19+ В-клеток значительно варьировало от 0.4 до 40% (рис. 3А).

Наибольшее процентное содержание ТИВ наблюдалось у пациентов с раком ободочной и сигмовидной кишки, медиана значений по группе составила 11.5 и 6% соответственно ($p < 0.05$). Для остальных

групп (рак слепой и прямой кишки, рак легкого) медианное значение доли В-клеток составляло около 3%. Самое низкое содержание доли В-клеток зафиксировано при раке почки – медиана составила 1%.

Интерквартильные интервалы доли ТИВ составляли, соответственно, 4–20% при раке ободочной кишки, 3–11% – раке сигмовидной кишки, 0.7–3.7% – раке слепой кишки, 0.9–3.6% – раке прямой кишки, 1.0–2.3% – раке почки и 1.8–12% – раке легкого.

Проведен анализ представленности ТИВ в образцах рака ободочной кишки в зависимости от стадии заболевания (рис. 3Б).

Полученные результаты не выявили статистически значимых различий в процентном содержании ТИВ на разных стадиях опухолей.

Обобщенный анализ содержания В-лимфоцитов при КРП и клинико-морфологических характеристик заболевания представлен в табл. 1.

Выявлена прямая корреляция между количеством В-клеток и размером опухоли, а именно, опухоли большего размера характеризуются большим содержанием В-клеток. Также стоит отметить, что низкодифференцированные опухоли характеризуются

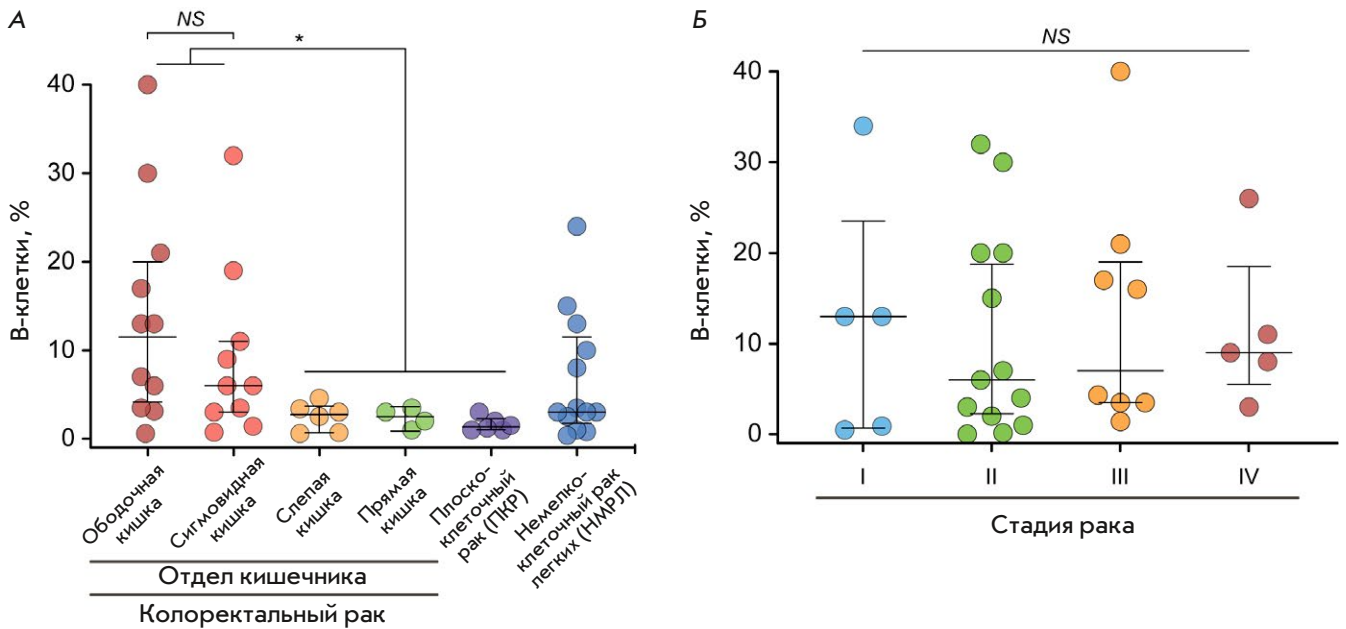


Рис. 3. А – оценка количества опухоль-инфильтрирующих В-клеток в опухолевом материале различной нозологии. Б – представленность опухоль-инфильтрирующих В-клеток в образцах рака ободочной кишки в зависимости от стадии. Статистический анализ проведен с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни. * $p < 0.05$; NS – нет достоверного отличия

Таблица 1. Ассоциация содержания В-клеток при колоректальном раке с клинко-морфологическими характеристиками опухоли

Характеристика	n	CD19+ В-клетки, %		
		медиана	квартили 25–75%	p
Возраст				
≤63	15	7.0	3.5–15.0	0.428
>63	16	3.3	2.1–14.5	
Пол/Gender				
Мужской/male	14	7.0	3.5–20.0	0.135
Женский/female	17	3.5	2.3–8.5	
Стадия/Stage				
I–II	18	6.0	1.8–16.3	0.805
III–IV	13	3.5	2.8–12.0	
Степень дифференцировки опухоли (G)/Grade				
G1	4	3.8	2.1–9.5	0.175
G2–G3	27	15.0	6.0–20.0	
Размер опухоли (T)/Tumor size				
T1–T2	20	1.9	0.2–3.1	0.019*
T3–T4	11	6.0	3.0–16.0	
Наличие регионарных метастазов (N)/Nodal status				
N0	29	5.15	2.0–13.8	0.707
N1	2	4.0	3.0–16.0	
Наличие отдаленных метастазов (M)/Metastasis				
M0	28	4.3	2.3–15.5	0.727
M1	3	6.0	4.0–8.0	
Локализация				
толстая кишка	27	6.0	2.5–16.0	0.255
прямая кишка	4	3.25	2.3–3.9	
Отдел толстой кишки				
левый	14	5.15	1.7–9.3	0.296
правый	13	8.0	2.8–18.5	

большим содержанием В-клеток, однако эти результаты не достигали статистической значимости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По данным 2020 года, в мире зарегистрировано 1.9 млн новых случаев колоректального рака. По некоторым оценкам, в России ежегодное увеличение составляет около 50 тысяч новых случаев в год. Колоректальный рак достаточно поздно выявляется, поэтому летальность от него довольно высока и достигает 40% в течение года с момента обнаружения опухоли [19] и, по данным Всемирной организации здравоохранения, он является второй по значимости причиной смерти от рака во всем мире [20]. В связи с этим поиск терапевтически значимых онкоспецифических антигенов и/или терапевтических антител к ним становится важнейшей задачей.

Полученные в ходе исследования данные позволяют расширить знания о представленности Т1В в различных нозологических формах онкологических заболеваний. Установлено, что рак ободочной кишки характеризуется наибольшим процентным содержанием Т1В. Забор материала для исследо-

ваний можно проводить независимо от стадии заболевания, поскольку не выявлено достоверных различий в представленности В-клеток на разных стадиях прогрессии опухолей. Однако есть противоречивые данные, что количество Т1В при колоректальном раке зависит от стадии развития опухоли [21]. Известно также, что число внутриопухолевых В-клеток обратно коррелирует со стадией рака легкого [22].

С фундаментальной точки зрения глубокое профилирование Т1В расширяет знания о закономерностях иммунного ответа на раковые клетки и открывает новые возможности для поиска потенциальных маркеров злокачественной трансформации. С практической точки зрения опухоль-инфильтрирующие В-клетки можно использовать для создания библиотек антител с целью дальнейшей разработки CAR-T-терапии и других подходов персонализированной терапии. ●

Исследование поддержано совместным грантом РФФ № 23-44-00043 и грантом Национального фонда естественных наук Китая 82261138553.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Всемирная организация здравоохранения. Официальный сайт ВОЗ. Доступно по: <https://www.who.int/>
2. Kim S., Kim A., Shin J.Y., Seo J.S. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 9536.
3. Brummel K., Eerkens A.L., de Bruyn M., Nijman H.W. // *Br. J. Cancer.* 2023. V. 128. № 3. P. 451–458.
4. Yu P., Fu Y.X. // *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 2006. V. 86. № 3. P. 231–245.
5. Tay R.E., Richardson E.K., Toh H.C. // *Cancer Gene Ther.* 2021. V. 28. № 1–2. P. 5–17.
6. Perez-Diez A., Joncker N.T., Choi K., Chan W.F., Anderson C.C., Lantz O., Matzinger P. // *Blood.* 2007. V. 109. № 12. P. 5346–5354.
7. Fearon E.R., Pardoll D.M., Itaya T., Golumbek P., Levitsky H.I., Simons J.W., Karasuyama H., Vogelstein B., Frost P. // *Cell.* 1990. V. 60. № 3. P. 397–403.
8. Pati S., Chowdhury A., Mukherjee S., Guin A., Mukherjee S., Sa G. // *Appl. Cancer Res.* 2020. V. 40. № 1. P. 7.
9. Sharonov G.V., Serebrovskaya E.O., Yuzhakova D.V., Britanova O.V., Chudakov D.M. // *Nat. Rev. Immunol.* 2020. V. 20. № 5. P. 294–307.
10. Zhang E., Ding C., Li S., Zhou X., Aikemu B., Fan X., Sun J., Zheng M., Yang X. // *Biomark. Res.* 2023. V. 11. № 1. P. 28.
11. Li Q., Teitz-Tennenbaum S., Donald E.J., Li M., Chang A.E. // *J. Immunol.* 2009. V. 183. № 5. P. 3195–3203.
12. Guo F.F., Cui J.W. // *J. Oncol.* 2019. V. 2019. P. 2592419.
13. Marsigliante S., Bisozzo L., Marra A., Nicolardi G., Leo G., Lobreglio G.B., Storelli C. // *Cancer Lett.* 1999. V. 139. № 1. P. 33–41.
14. Willsmore Z.N., Harris R.J., Crescioli S., Hussein K., Kakkassery H., Thapa D., Cheung A., Chauhan J., Bax H.J., Chenoweth A., et al. // *Front. Immunol.* 2021. V. 11. P. 622442.
15. Federico L., McGrail D.J., Bentebibel S.E., Haymaker C., Ravelli A., Forget M.A., Karpinetz T., Jiang P., Reuben A., Negrao M.V., et al. // *Ann. Oncol. Off J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 2022. V. 33. № 1. P. 42–56.
16. Reuschenbach M., von Knebel Doeberitz M., Wentzensen N. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2009. V. 58. № 10. P. 1535–1544.
17. Coronella-Wood J.A., Hersh E.M. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2003. V. 52. № 12. P. 715–738.
18. Leelatian N., Doxie D.B., Greenplate A.R., Sinnaeve J., Ihrie R.A., Irish J.M. // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2017. V. 118. P. 25C.1.1–25C.1.23.
19. Avksentyeva M. // *Eur. J. Health Econ. HEPA Health Econ. Prev Care.* 2010. V. 10. Suppl 1. P. S91–98.
20. Всемирная организация здравоохранения. Официальный сайт ВОЗ. Доступно по: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/colorectal-cancer>.
21. Bindea G., Mlecnik B., Tosolini M. // *Immunity.* 2013. V. 39. № 4. P. 782–795.
22. Gottlin E.B., Bentley R.C., Campa M.J., Pisetsky D.S., Herndon J.E., Patz E.F. // *J. Thorac. Oncol. Off Publ. Int. Assoc. 2011. V. 6. № 10. P. 1687–1690.*