

Charakterystyka oraz znaczenie prognostyczne regulatorowych limfocytów T w nowotworach układu chłonnego

Characteristics and prognostic significance of T regulatory lymphocytes in lymphoid malignancies

Magdalena Głowala-Kosińska, Sebastian Giebel

Klinika Transplantacji Szpiku i Onkohematologii, Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

Streszczenie

Regulatorowe limfocyty T (Treg) stanowią niewielką subpopulację komórek CD4+ odpowiedzialną za tłumienie nadmiernej odpowiedzi immunologicznej, przyczyniając się tym samym do utrzymania homeostazy układu odpornościowego. Limfocyty Treg można wykrywać na podstawie charakterystycznego immunofenotypu CD4+CD25highFOXP3+. W wielu przypadkach nowotworów litych (np. rak jelita, płuca, jajnika) obserwowano zwiększenie liczby limfocytów Treg i stan ten niekorzystnie wpływał na rokowanie. Limfocyty Treg, poprzez swoje działanie supresorowe na limfocyty T obecne w mikrośrodoisku guza, upośledzają odpowiedź odpornościową skierowaną przeciwko komórkom nowotworowym, a więc utrudniają możliwość ich eliminacji. Sytuacja nie jest tak jasna w przypadkach, w których punktem wyjścia rozwoju nowotworu są komórki układu immunologicznego. Wyniki dotychczasowych nielicznych badań wskazują, że w złośliwych rozrostach z dojrzałych limfocytów B liczba tkankowych lub obwodowych limfocytów Treg może być podwyższona lub obniżona; podobnie ich związek z rokowaniem może być zarówno pozytywny, jak i negatywny. Nie można więc przez prostą analogię do nowotworów litych wnioskować o funkcji limfocytów Treg w chłoniakach. Na podstawie badań in vitro postuluje się wręcz, że limfocyty Treg mogą pełnić funkcję kontrolną wobec chłoniakowych limfocytów B, nie dopuszczając do klonalnego rozrostu tych ostatnich. Wskazywałoby to na zupełnie nową i jeszcze słabo poznaną funkcję limfocytów Treg. Celem pracy jest podsumowanie wyników publikacji, w których oceniano rolę Treg w nowotworach układu chłonnego, oraz omówienie kontrowersji dotyczących związku Treg z rokowaniem w tej grupie nowotworów.

Słowa kluczowe: regulatorowe limfocyty T, chłoniaki

Hematologia 2014; 5, 2: 145–153

Abstract

Regulatory T lymphocytes (Treg) represent a small subpopulation of CD4+ cells responsible for inhibition of excessive immunologic response, contributing in this way to immune homeostasis. Treg cells are characterized by CD4+CD25highFOXP3+ immunophenotype. In many cases of solid

Adres do korespondencji: Magdalena Głowala-Kosińska, Klinika Transplantacji Szpiku i Onkohematologii, Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44–101 Gliwice, tel.: 32 278 98 93, faks: 32 278 91 49, e-mail: mglowala@interia.pl

tumors (e.g. colon cancer, lung cancer, ovarian cancer) the number of Treg cells is increased and its elevation is associated with unfavorable prognosis. Treg cells by their capacity to suppress other T lymphocytes present in tumor microenvironment impair immunologic response against tumor cells thus contributing to immune evasion by malignancies. The matter is more complicated in cases where the tumor originates from immune cells. Results from published studies evaluating Treg cells in B-cell malignancies are scarce and they show that the numbers of tissue or peripheral Treg cells can be either decreased or increased. Similarly, Treg number may be associated with either positive or negative prognosis. Thus, Treg function in lymphomas should not be considered by simple analogy to solid tumors. On the basis on in vitro studies it was postulated that Treg cells can control malignant B cells, preventing clonal proliferation of the latter. Therefore it is possible that Treg cells may play a new, so far poorly understood role in lymphoid malignancies. The aim of this paper is to review the original articles that analyzed Treg lymphocytes in lymphoid neoplasms and to discuss the controversies on associations of Tregs with prognosis in this setting.

Key words: regulatory T lymphocytes, lymphomas

Hematologia 2014; 5, 2: 145–153

Wprowadzenie

Wiadomo, że stan immunosupresji może sprzyjać rozwojowi chorób nowotworowych czy też zwiększać ryzyko ich wystąpienia. W wielu typach nowotworów obserwuje się zwiększoną liczbę regulatorowych limfocytów T (Treg, *T regulatory*), które poprzez swoje hamujące działanie na limfocyty T pomocnicze (Th, *T helper*) i cytotoksyczne (Tc, *T cytotoxic*) sprzyjają ucieczce komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego i tym samym przyczyniają się do progresji nowotworu. Badanie potencjalnego związku Treg z nowotworami może mieć charakter pośredni, czyli dotyczyć analizy ilościowej komórek Treg w takim materiale, jak tkanka guza, węzły chłonne czy płyny ustrojowe. Wyniki uzyskane w ten sposób wskazują jedynie, że danej chorobie towarzyszy zwiększona bądź zmniejszona w stosunku do zdrowych osób liczba komórek Treg, bez określenia, czy stan ten jest przyczyną czy skutkiem nowotworu. Dodatkową wartość mają badania określające związek liczby limfocytów Treg z rokowaniem, a także analizy dynamiczne dotyczące zmian liczby limfocytów Treg w przebiegu choroby.

O ile w badaniach dotyczących guzów litych najczęściej stwierdza się zwiększoną liczbę Treg i niekorzystny wpływ na rokowanie, o tyle wyniki badań dotyczących nowotworów układu chłonnego są niespójne. Liczba limfocytów Treg może być zwiększona lub zmniejszona, a jej wpływ na rokowanie pozostaje niejednoznaczny. Może to wynikać z bardziej złożonej roli komórek Treg w patogenezie chłoniaków. Nowotwory te wywodzą

się bowiem z komórek układu immunologicznego, w skład którego wchodzi również limfocyty Treg. Dlatego postuluje się, że wzajemne oddziaływanie zmienionych nowotworowo limfocytów z komórkami Treg nie musi przebiegać zawsze tak samo i może się różnić w zależności od podtypu choroby. Dotyczy to zarówno linii limfocytów, z których wywodzi się chłoniak (limfocyty B, T, komórki naturalnej cytotoksyczności [NK, *natural killers*]), jak i stadium zróżnicowania.

Charakterystyka limfocytów Treg — historia odkrycia, cechy immunofenotypowe i mechanizm działania

Limfocyty Treg to subpopulacja limfocytów T wykazujących zdolność do supresji innych komórek immunokompetentnych. Na istnienie takich limfocytów po raz pierwszy wskazali Gershon i Kondo [1] na podstawie obserwacji, że wśród limfocytów T występują również ich nietypowe formy, które — zamiast wywoływać — hamują odpowiedź immunologiczną. Niemalże równolegle Nishizuka i Sakakura [2] wykazali, że tymektomia u mysich noworodków skutkowałą uogólnioną reakcją autoimmunizacyjną, która ulegała zahamowaniu po wstrzyknięciu zwierzętom limfocytów T. Na podstawie powyższych wyników wysunięto hipotezę, że w całej populacji limfocytów T istnieje subpopulacja komórek supresorowych o zdolności do hamowania odpowiedzi autoimmunologicznej. Jako że trudno było określić immunofenotyp tych komórek oraz wykazać ich aktywność supresorową,

prace prowadzone do lat 90. nie przyniosły żadnych nowych informacji. Przełomem było odkrycie Sakaguchiego i wsp. [3] w 1995 roku. Autorzy ci wykazali, że spośród limfocytów Th komórki odpowiedzialne za hamowanie procesu autoimmunizacji mają na swej powierzchni receptor dla interleukiny 2 (IL-2) (CD25). Dokładniejsza charakterystyka Treg była możliwa dopiero w 2001 roku, po odkryciu czynnika transkrypcyjnego *Foxp3* (*fork-head box P3, scurf*) [4]. Okazało się, że jeśli gen *Foxp3* jest zmutowany, to wywołuje ciężkie schorzenie autoimmunizacyjne u myszy, tak zwanych *scurfy mice*. Mutacje w obrębie genu *FOXP3* wykrywano również u ludzi z ciężkimi zaburzeniami immunologicznymi IPEX (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy X-linked*). Czynniki Foxp3 jest kluczowy dla rozwoju limfocytów Treg i nabywania przez nie aktywności supresorowej [5]. Działa on jako aktywator transkrypcyjny dla takich genów, jak CD25 oraz CTLA-4, będąc jednocześnie represorem transkrypcji genów kodujących cytokiny charakterystyczne dla limfocytów Th1 i Th2 [6]. Wykazano, że transfekcja *Foxp3* do limfocytów T dziewiczych CD4+CD25– powoduje ich przejście w stan anergii i nabycie cech fenotypowych oraz czynnościowych komórek Treg, ze zdolnością do hamowania innych komórek układu immunologicznego włącznie [5].

Okazało się, że FOXP3, podobnie jak CD25, ulega przejściowej ekspresji, również w aktywowanych limfocytach niebędących komórkami Treg [7, 8]. Nadal aktualny jest więc problem braku dostatecznie swoistego markera do oznaczania limfocytów Treg. Dlatego używa się kilku markerów, tak aby możliwie precyzyjnie identyfikować te komórki. Spośród limfocytów CD4+ do Treg można zaliczyć tylko komórki, które wykazują jednocześnie bardzo wysoką ekspresję powierzchniowego CD25 oraz wewnątrzkomórkowo FOXP3, czyli o fenotypie CD4+CD25^{high}FOXP3+. Uważa się, że komórki CD4+ o średnio intensywnej ekspresji CD25 (CD4+CD25^{int}) to aktywowane limfocyty Th. W celu identyfikacji Treg coraz częściej oznacza się również receptor dla IL-7 (CD127), który służy jako marker wykluczający [9].

Limfocyty Treg mogą oddziaływać na komórki docelowe pośrednio oraz bezpośrednio. Niektóre z cząsteczek oddziałujących bezpośrednio na tyle dobrze charakteryzują limfocyty Treg, że wykorzystuje się je jako markery pomocnicze do immunofenotypowania tych komórek, na przykład CD152 (CTLA-4, *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen*) czy GITR (*glucocorticoid-induced TNF receptor*). O tym, jak ważna dla

funkcjonowania limfocytów Treg jest cząsteczka CTLA-4, może świadczyć fakt, że zablokowanie ekspresji CTLA-4 w Treg znosi ich właściwości supresorowe w stosunku do limfocytów T efektorowych [10].

Określanie szczegółowego immunofenotypu może być ważne dlatego, że niektóre zaburzenia związane z limfocytami Treg mogą wynikać nie tyle ze zmian ilościowych, czyli niedoboru czy nadmiaru Treg, ale również z nieprawidłowego immunofenotypu tych komórek. We krwi obwodowej limfocyty Treg stanowią 2–10% komórek CD4+. Obecne we krwi limfocyty Treg o fenotypie CD4+CD25^{high}FOXP3+ mogą mieć pochodzenie grasicze — mówi się wtedy o tak zwanych limfocytach Treg naturalnych (nTreg, *natural Treg*). Jednak limfocyty Treg mogą powstawać również w obwodowych narządach limfatycznych z komórek CD4+CD25– w drodze indukcji za pośrednictwem IL-2 oraz czynnika wzrostu nowotworów β (TGF β , *tumor growth factor β*) [11]. Wówczas mówi się o tak zwanych limfocytach Treg indukowanych (iTreg, *inducible Treg*). Bez względu na swoje pochodzenie limfocyty Treg stanowią heterogenną populację komórek złożoną z rozmaitych subpopulacji. Podejrzewa się, że poszczególne subpopulacje mogą pełnić zróżnicowane funkcje, co wynika chociażby z obecności odrębnych receptorów chemokinowych wpływających na drogi migracji, lokalizacji, ułatwiających zasiedlanie oraz kontakt z określonymi komórkami docelowymi. Wobec tego również potencjał supresyjny limfocytów Treg może zależeć od składu ilościowego i jakościowego poszczególnych subpopulacji i stanowić ich wypadkową.

Limfocyty Treg, podobnie jak inne limfocyty T, mogą mieć fenotyp komórek dziewiczych CD45RA+ lub komórek pamięci CD45RA-CD45RO+. Ogromna większość komórek Treg (90–95%) wykazuje ekspresję CD45RO, co oznacza, że komórki te uległy już aktywacji i zostały w nich zainicjowane podziały. Doświadczenia wskazują, że nie ma większych różnic w działaniu supresyjnym Treg dziewiczych i Treg pamięci [12]. Stwierdzono natomiast, że tylko Treg dziewicze potrafią długotrwale utrzymać ekspresję FOXP3 oraz CTLA-4, czyli fenotyp typowych limfocytów Treg, a co za tym idzie — wysoką aktywność supresorową. Limfocyty Treg pamięci przeciwnie, dość szybko traciły czynniki FOXP3 i zaczynały produkować IL-2 oraz interferon γ (IFN γ), czyli traciły właściwości komórek Treg, ulegały starzeniu i apoptozie [13, 14]. Tak duże różnice w czasie życia limfocytów Treg dziewiczych i Treg pamięci pozwalają przypuszczać,

że nawet niewielka pula Treg dziewiczych może mieć znaczenie dla odnowy całej populacji Treg w sytuacji, gdy zaczyna brakować limfocytów Treg pamięci. Większość limfocytów Treg dziewiczych po zetknięciu z antygenem daje początek komórkom Treg pamięci. Jednak w ostatnich badaniach uwzględniających profil genetyczny oraz lokalizację tkankową podkreśla się całkowitą wzajemną odrębność limfocytów Treg dziewiczych od Treg pamięci [15].

Limfocyty Treg obecne we krwi obwodowej mogą mieć na swojej powierzchni determinantę DR MHC II (HLA-DR), która jest markerem aktywacji komórek. Wykazano, że limfocyty Treg o fenotypie HLA-DR+ wykazują wyższą niż HLA-DR- Treg ekspresję FOXP3 i są szczególnie aktywne supresyjnie [16].

Ważną cechą limfocytów Treg jest ich zdolność migracji do miejsc objętych procesem zapalnym i tłumienie odpowiedzi immunologicznej. Umożliwiają to receptory chemokin, takie jak CCR5 czy CCR7. Środowisko zapalne jest bogate w adenozyntrifosforan (ATP, *adenosine triphosphate*) uwalniany z rozpadających się komórek. Część komórek Treg (ok. 50%) wykazuje wysoką ekspresję CD39 (*ectonucleoside triphosphate diphosphorhydrolase-1*), ektoenzymu hydrolizującego ATP do adenozyndifosforan (ADP, *adenosine diphosphate*) i adenozymonofosforan (AMP, *adenosine monophosphate*) oraz CD73 (*ecto-5-nucleotidase*), który degradowuje AMP do adenozyyny [17, 18]. Aktywność nukleazowa limfocytów Treg zamienia więc bogate w ATP środowisko zapalne w pozbawione ATP środowisko immunosupresyjne. Uwolniona adenozyyna hamuje aktywację makrofagów i komórek prezentujących antygen (APC, *antigen presenting cells*), dlatego nie dochodzi do pobudzenia limfocytów T. Oprócz tego adenozyyna wiąże się do receptora 2A na limfocytach T efektorowych, co skutkuje zahamowaniem tych ostatnich.

Z kolei tak zwane limfocyty Treg pamięci centralnej z ekspresją CD62L (L-selektyna, *lymph node homing receptor*) stanowią pulę komórek Treg o zdolności do przechodzenia przez żyłki o wysokim śródbłonku (HEV, *high endothelial venules*), co umożliwia im zasiedlanie węzłów chłonnych. Wykazano przy tym, że limfocyty Treg CD62L+ cechuje bardzo duża aktywność supresyjna [19]. Wobec tak dużego zróżnicowania fenotypowego limfocytów Treg szczególnie cenne są badania, w których uwzględnia się poszczególne subpopulacje Treg, chociażby ze względu na to, że mogą one pełnić zróżnicowane funkcje.

Istotą działania limfocytów Treg jest ich zdolność do ograniczania zbyt nasilonej odpowiedzi immunologicznej. Mimo ogromnego postępu wiedzy zarówno procesy aktywacji limfocytów Treg, jak i dokładny mechanizm ich działania supresyjnego nie są jeszcze w pełni poznane. Limfocyty Treg wywierają efekt inhibitorowy na wiele różnych komórek układu immunologicznego. Hamowanie to może mieć charakter bezpośredni lub pośredni. Najpierw jednak same limfocyty Treg muszą ulec aktywacji auto- lub alloantygenem. Dopiero wtedy wydzielają cytokiny inhibitorowe, takie jak TGF β , IL-10 oraz IL-35. W wyniku działania tych cytokin w docelowych limfocytach T efektorowych obserwuje się anergię, zahamowanie produkcji IL-2, obniżenie ekspresji cząsteczek kostymulacyjnych z następowym zahamowaniem ich proliferacji oraz różnicowania. Mechanizm supresji z udziałem cytokin ma jednak drugorzędne znaczenie; większą rolę przypisuje się bezpośrednim kontaktom komórka-komórka. Kluczową rolę w tym przypadku pełni obecny na komórkach nTreg receptor CTLA-4, który z dużym powinowactwem wiąże się do cząsteczek kostymulacyjnych CD80/86 na aktywowanych limfocytach T efektorowych, wywierając na nie działanie supresyjne. Podobnie CTLA-4 blokuje CD80/86 na komórkach dendrytycznych, uniemożliwiając w ten sposób prezentację antygenów limfocytom T, co skutkuje brakiem ich pobudzenia [20]. Ostatnie badania wskazują, że limfocyty Treg mogą dodatkowo kontrolować limfocyty T efektorowe poprzez uwalnianie CD25, który wiąże obecną w środowisku IL-2, ograniczając w ten sposób dostępność tej cytokiny dla innych komórek [21].

Znaczenie limfocytów Treg w chłoniaku Hodgkina

Spośród chłoniaków stosunkowo najlepiej udokumentowane badania Treg dotyczą klasycznej postaci chłoniaka Hodgkina (cHL, *classical Hodgkin lymphoma*). Wykazano, że komórki Hodgkina/Reed-Sternberga (HRS), mające stosunkowo niewielki udział w całkowitej masie nowotworu, wydzielają czynniki chemotaktyczne (CCL17, CCL22), dla których receptor (CCR4) jest obecny na powierzchni naturalnie występujących limfocytów Treg [22, 23]. Rzeczywiście, w badaniu zajętych węzłów chłonnych wykazano, że liczba komórek Treg była podwyższona w cHL w stosunku do chłoniaków nie-Hodgkina (NHL, *non-Hodgkin lymphoma*) oraz węzłów chłonnych pochodzących od osób z grupy kontrolnej [24]. Schreck i wsp. [25]

wykazali, że spośród limfocytów naciekających węzły chłonne u chorych na HL najliczniej reprezentowane są komórki Th2 i Treg. Większy odsetek limfocytów Th2 wiązał się z dłuższym przeżyciem wolnym od choroby (DFS, *disease-free survival*) i przeżyciem wolnym od zdarzeń (EFS, *event-free survival*). Z kolei większy stosunek Treg do Th2 w zajętych węzłach chłonnych korelował z mniejszym prawdopodobieństwem DFS. Sugeruje to, że limfocyty Th2 mogą pełnić istotną rolę w odpowiedzi przeciwnowotworowej, natomiast komórki Treg, podobnie jak w guzach litych, mogą tę funkcję hamować. Z kolei z innych badań wynika, że komórki Treg w HL mogą mieć korzystny wpływ na rokowanie. Alvaro i wsp. [26] wykazali w cHL, że niska infiltracja węzłów komórkami Treg (FOXP3+) przy jednoczesnej wysokiej infiltracji komórkami Tc (TIA-1+) jest niekorzystnym markerem predykcyjnym (wyrażonym jako krótszy czas przeżycia całkowitego [OS, *overall survival*], przeżycia wolnego od wznowy [RFS, *relapse-free survival*] oraz EFS) i na odwrót — wysoka infiltracja komórkami Treg jest korzystnym czynnikiem predykcyjnym. Badanie przeprowadzono *in situ* na materiale tkankowym (TMA, *tissue microarrays*) pochodzącym od 257 chorych na cHL. Komórki Treg oraz Tc zliczano w obszarach reprezentatywnych, czyli zajętych przez komórki HRS. Podobnie w badaniu Tzankova i wsp. [27], obejmującego materiał tkankowy od 280 chorych na cHL, większa liczba komórek FOXP3+ w przeliczeniu na mm² była skojarzona z większym prawdopodobieństwem OS i przeżycia wolnego od niepowodzenia leczenia (FFS, *failure-free survival*). Również w badaniach innych autorów mała liczba Treg w nacieku HL korelowała z gorszym rokowaniem [28], a duża liczba Treg — z lepszym rokowaniem [29].

Na podstawie powyższych wyników trudno wyjaśnić, dlaczego duża liczba Treg w cHL w jednych przypadkach związana była z gorszym, a w innych lepszym rokowaniem. Wiadomo, że komórki HRS pochodzą od bardzo dojrzałych limfocytów B, które utraciły dużą część specyficznych dla zdrowych limfocytów B genów związanych z różnicowaniem, czy powstawaniem receptora komórek B [30]. Ponieważ konsekwencje takiej „utrąty tożsamości” przez limfocyty B zostały jeszcze zbyt słabo przebadane, nie można jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie, w jaki sposób limfocyty Treg mogą kształtować przebieg HL. Warto podkreślić jednak, że mikrośrodowisko HL jest na tyle przekształcone przez komórki HRS, że funkcje poszczególnych limfocytów naciekających obszar chłoniaka mogły również ulec pewnym modyfikacjom.

Znaczenie limfocytów Treg w chłoniakach nie-Hodgkina

W NHL wyniki dotyczące ilościowej reprezentacji komórek Treg oraz ich wpływu na rokowanie są również rozbieżne. Ponadto w przypadku NHL badania prowadzono na różnym materiale — nie tylko z zajętych tkanek, ale również z krwi obwodowej, dlatego wyciąganie wniosków na temat roli komórek Treg w NHL jest w znacznej mierze utrudnione.

Większość analiz wskazuje, że u chorych występuje zwiększona w stosunku do osób zdrowych liczba lub odsetek limfocytów Treg w tkankach objętych chorobą czy też we krwi obwodowej. Liczba Treg we krwi chorych na chłoniaka nie-Hodgkina z komórek B (B-NHL, *B-cell non-Hodgkin lymphoma*) była 2-krotnie wyższa niż u osób zdrowych [31]. Również pacjenci z różnymi podtypami NHL (chłoniak rozlany z dużych komórek B [DLBCL, *diffuse large B-cell lymphoma*], chłoniak strefy brzeżnej [MZL, *marginal zone lymphoma*], chłoniak grudkowy [FL, *follicular lymphoma*], chłoniak z komórek płaszczka [MCL, *mantle cell lymphoma*]) mieli wyższy odsetek Treg we krwi oraz węzłach chłonnych niż grupa kontrolna [32]. W badaniu Lin i wsp. [33] także wykazano zwiększoną w stosunku do grupy kontrolnej liczbę Treg we krwi chorych na NHL. Przypuszczalnie zwiększona liczba Treg u pacjentów z NHL może mieć związek z tym, że komórki NHL, podobnie zresztą jak komórki HL, wywołują zmianę fenotypu otaczających limfocytów CD4+CD25⁻ na limfocyty o fenotypie Treg CD4+CD25^{high}FOXP3+, co przynajmniej częściowo mogłoby zwiększać ich liczbę u chorych na NHL [34]. Jednak wtedy liczba Treg we krwi nie powinna się różnić u pacjentów oraz zdrowych osób, ponieważ wpływ mikrośrodowiska nowotworu ma znaczenie lokalne i jest raczej mało prawdopodobne, by komórki chłoniaka mogły w wyżej opisany sposób zmieniać immunofenotyp limfocytów obwodowych. W badaniu obejmującym grupę 27 pacjentów z DLBCL dowiedziano, że — przeciwnie — chorzy mieli znacząco mniejszą liczbę komórek Treg o fenotypie CD4+CD25^{high}FOXP3+ we krwi niż osoby zdrowe [35].

Prognozowanie przebiegu choroby na podstawie liczby Treg w przypadku NHL wydaje się bardziej skomplikowane niż w HL. W grupie 45 pacjentów z różnymi chłoniakami NHL liczba Treg we krwi korelowała pozytywnie z odsetkiem całkowitych remisji (CR) i OS [36]. W grupie pacjentów z DLBCL analizowano skład limfocytów naciekających guz i wykazano, że większy odsetek

Treg korelował z lepszym rokowaniem [37]. Podobnie w badaniu jednej z autorek niniejszej pracy i wsp. w grupie DLBCL stwierdzono, że pacjentów z mniejszą liczbą krążących komórek Treg cechuje krótszy DFS niż osoby z większą liczbą Treg [35]. Mimo zbieżności wyników uzyskanych przez powyższe grupy badawcze, trzeba zaznaczyć, że limfocyty Treg wykrywano w różnej lokalizacji (węzłowe *v.* obwodowe Treg). U chorych na różne podtypy NHL Tzankov i wsp. [27] wykazali, że duża liczba komórek Treg w zajętej węzle korelowała z dłuższym OS w podtypie GC-like DLBCL (*germinal center-like DLBCL*) i FL, ale już w podtypie non-GC-DLBCL (*non-germinal center DLBCL*) duża liczba Treg była niekorzystnym czynnikiem prognostycznym. Na podstawie powyższych wyników można wyciągnąć wniosek, że nawet w obrębie jednego typu chłoniaka odsetek komórek Treg może się wiązać z lepszym lub gorszym rokowaniem, w tym przypadku zależnie od podtypu histologicznego DLBCL.

Carreras i wsp. [38] zaobserwowali, że duża liczba limfocytów Treg w węzłach zajętych przez FL korelowała z dłuższym OS, natomiast w przypadku transformacji FL do DLBCL obserwowano zmniejszenie liczby komórek Treg.

Na podstawie powyższych badań prawdopodobne wydaje się, że zmiany ilościowe komórek Treg są specyficzne dla danego typu chłoniaka. Dlatego interpretacja wyników Treg w chłoniakach powinna być ostrożna, a idealnym rozwiązaniem byłaby analiza liczby Treg osobno dla każdego podtypu chłoniaka.

Potencjalne mechanizmy interakcji limfocytów Treg z komórkami chłoniaka

Jak widać z przedstawionych wyżej rozważań, mimo niejednoznacznych wyników, skład jakościowy oraz ilościowy limfocytów naciekających obszar chłoniaka wydaje się mieć znaczenie dla rokowania w tych nowotworach. Warto w tym miejscu się zastanowić, dlaczego w większości badań nad NHL komórki Treg mają korzystny wpływ na rokowanie, natomiast zwiększona liczba komórek Treg w guzach litych korelowała z gorszym rokowaniem.

Wiadomo, że mikrośrodowisko nowotworu sprzyja utrzymaniu i ekspansji komórek Treg z powodu dużych stężeń IL-10, TGF- β oraz obecności niedojrzałych komórek dendrytycznych [39]. Dzieje się tak zarówno w nowotworach litych, jak i układowych. Mało tego; w niektórych chłoniakach, między innymi w MCL, DLBCL i FL, chłoniakowe limfocyty B konwertują sąsiadujące limfocyty CD4+CD25- w limfocyty Treg

CD4+CD25+ z ekspresją FOXP3 [40, 41]. To mogłoby tłumaczyć, dlaczego w obrębie nowotworu obserwuje się zwiększony odsetek komórek Treg. Jeśli jednak założy się, że limfocyty Treg poprzez swoje działanie immunosupresyjne tłumią odpowiedź przeciwnowotworową ze strony limfocytów Tc, to ich zwiększona liczba w tkankach zajętych chłoniakiem (np. węzłach chłonnych) powinna zawsze sprzyjać progresji choroby, a tak nie jest. Jednocześnie obecność limfocytów Treg w węzłach chłonnych nie jest czymś niespotykanym, ponieważ Treg wykrywa się w obszarze centrów rozmnażania oraz na granicy obszaru T-B [42]. Limfocyty Treg biorą udział w regulacji produkcji immunoglobulin (Ig) przez limfocyty B, a niedobór komórek Treg prowadzi do wzmożonej produkcji przeciwciał przez limfocyty B i wiąże się z występowaniem niektórych schorzeń autoimmunizacyjnych [42, 43]. Powyższe obserwacje mogą więc świadczyć o niezbędności limfocytów Treg w prawidłowym wytwarzaniu przeciwciał przez limfocyty B. Nie do końca jednak wiadomo, czy niedobór limfocytów Treg u zdrowego człowieka może się przyczyniać do niekontrolowanego rozrostu limfocytów B. Badania *in vitro* wskazują, że komórki Treg mogą hamować aktywność limfocytów B nie tylko pośrednio poprzez hamowanie limfocytów Th, ale także w sposób bezpośredni, poprzez supresję wytwarzania przeciwciał [42]. Lindqvist i wsp. [44] wykazali, że limfocyty Treg wyizolowane od chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową (CLL, *chronic lymphocytic leukemia*) i od osób zdrowych w równym stopniu ograniczają aktywność limfocytów B w doświadczeniach *in vitro*.

Uważa się, że komórki Treg mogą pełnić podwójną rolę w patogenezie nowotworów układu chłonnego — poprzez hamujący wpływ na limfocyty Tc/Th mogą utrudniać udział tych ostatnich w odpowiedzi przeciwnowotworowej, a jednocześnie mogą niszczyć komórki chłoniaka, rozpoznając prezentowane przez nie antygeny [45].

Podczas kolejnych stadiów rozwoju limfocytów B, limfocyty T kontrolują proces ich dojrzewania poprzez aktywację czynników pro- lub antyapoptycznych czy też indukcję proliferacji. Nowotwory z limfocytów B mogą być inicjowane na różnych etapach ontogenezy, a kilka z nich wywodzi się z centrów rozmnażania grudek chłonnych. Niektóre chłoniaki wręcz wymagają ochronnego towarzystwa prawidłowych limfocytów do przeżycia. Jako przykład może służyć chłoniak CLL, w którym kontakt nowotworowych limfocytów z limfocytami Th jest niezbędnym elementem progresji nowotworu [46]. Limfocyty Treg, wpływając hamująco na Th, mo-

głyby więc pośrednio pozbawiać komórki chłoniaka ochrony i tym samym ograniczać jego progresję. Wykazano, że limfocyty Treg mogą kontrolować limfocyty B w sposób antygenowo-specyficzny (restrykcja TCR-MHC II), ponieważ nowotworowe limfocyty B mają na swej powierzchni antygeny głównego układu zgodności tkankowej (MHC II, *major histocompatibility complex class II*), a zabijanie za pomocą receptorów śmierci i granzymu jest regulowane na zasadzie rozpoznawania antygeny przez limfocyty T [45]. W ten proces mogą być jednak również zaangażowane inne mechanizmy.

W świetle powyższego logiczny wydaje się wniosek, że limfocyty Treg pełnią rolę w ograniczaniu aktywności czy też nadmiernego rozrostu limfocytów B, gdyż komórki chłoniakowe wydające się z limfocytów B mogą być celem dla inhibitorowej aktywności komórek Treg. Mimo to zwiększona liczba Treg nie zawsze prowadzi do wyeliminowania nowotworowych limfocytów zgodnie z oczekiwaniami wynikającymi z przytoczonych powyższych badań *in vitro*. Jest możliwe, że to same komórki chłoniaka, a nie otaczające limfocyty, mają większy wpływ na możliwość ich eliminacji przez układ immunologiczny. Przynajmniej w niektórych przypadkach chłoniaków zbyt słaba prezentacja nowotworowych antygenów przez nowotworowe limfocyty B sprawia, że stają się one „niewidzialne” dla limfocytów T, w tym Treg, które mogłyby je rozpoznać i ostatecznie uśmiercić. Na przykładzie DLBCL wykazano kilka mechanizmów ucieczki komórek chłoniakowych spod nadzoru immunologicznego, między innymi poprzez obniżenie ekspresji MHC II [47].

Zaproponowano hipotezę, według której u chorych na chłoniaki komórki Treg mogą pełnić cztery różne, czasem przeciwstawne, funkcje [48]:

- supresorowe limfocyty Treg — hamują przeciwnowotworową odpowiedź odpornościową, głównie komórek CD8+, w sposób analogiczny, jak to wykazano w odniesieniu do nowotworów litych. Taką aktywność wykazują Treg w HL oraz w wielu NHL;
- nowotworowe limfocyty Treg — komórki te stanowią punkt wyjścia dla komórek nowotworowych. Pochodzenie komórek chłoniaka z limfocytów Treg wykazano w białaczce/chłoniaku związanym z zakażeniem ludzkim wirusem białaczki z komórek T typu 1 (HTLV-1, *human T-cell leukemia virus type 1*) oraz w chłoniaku skórnym T-komórkowym;
- limfocyty Treg bezpośrednio uśmiercające komórki nowotworowe — niektóre chłoniaki z limfocytów B mogą być celem cytotoksycznej

aktywności komórek Treg, co wiązało się z przeciwnowotworowym działaniem tych ostatnich;

- niekompetentne limfocyty Treg — występują u chorych na chłoniaki z komórek T angioimmunoblastyczne (AITL, *angioimmunoblastic T-cell lymphoma*), w których dysfunkcja komórek Treg może być przejawem zaburzeń immunologicznych, sprzyjających rozwojowi chłoniaka i wystąpieniu autoagresji.

Autorzy tak zaproponowanej klasyfikacji znaczą jednak, że jest to uproszczenie i nie we wszystkich chłoniakach danego rodzaju limfocyty Treg muszą oddziaływać jednakowo. Niewątpliwie problem ma szerszy kontekst, związany ze wzajemnymi interakcjami w mikrośrodkowisku nowotworu. Niestety, za mało jeszcze wiadomo na temat immunologii komórek chłoniaka, ponieważ dopiero zrozumienie podstawowych interakcji między limfocytami T, limfocytami B i komórkami Treg mogłoby dać lepszy wgląd w różnorodność odpowiedzi immunologicznej u pacjentów z nowotworami układu chłonnego.

Trudności w interpretacji wyników Treg w chłoniakach

Analizując wyniki prac na temat limfocytów Treg w nowotworach, można zauważyć, że analiza Treg w guzach litych dotyczyła głównie krwi obwodowej, natomiast w chłoniakach podstawą wyników był materiał tkankowy pochodzący z węzłów chłonnych bądź z innych tkanek zajętych przez chłoniaka, a rzadziej analiza Treg we krwi.

Należy wziąć pod uwagę co najmniej kilka czynników utrudniających jednoznaczną ocenę liczby Treg w lokalizacji tkankowej. Złożoność utkania limfocytarnego w węzłach zajętych przez chłoniaka oraz stan utrwalenia materiału, jak również wielkość analizowanego mikroskopowo obszaru mogą wpływać na ocenę nacieku limfocytów, w tym Treg. Z kolei zaburzenia ilościowe limfocytów Treg we krwi obwodowej nie muszą być związane tylko i wyłącznie z obecnością i progresją chłoniaka, szczególnie jeśli nowotwór jest ograniczony tylko do węzłów chłonnych. Poza tym odsetek Treg w lokalizacji obwodowej niekoniecznie musi odzwierciedlać proporcje Treg w tkance guza, choć w niektórych badaniach obserwowano taką zależność [32].

Nie do końca wiadomo, czy tkankowe limfocyty Treg różnią się w jakiś sposób od obwodowych. Jedna grupa badawcza odnotowała różnice między limfocytami Treg naciekającymi węzeł chłonny

a tymi, które krążą we krwi obwodowej. Według Han i wsp. [41] limfocyty Treg pochodzące z lokalizacji węzłowej wykazują większą aktywność supresorową (hamowanie komórek CD4+CD25–) niż Treg wyizolowane z krwi obwodowej czy szpiku tych samych pacjentów oraz osób zdrowych.

Rozbieżności w wynikach uzyskiwanych przez różne grupy badawcze mogą mieć podłoże metodyczne. Autorzy prac posługiwali się często niejednorodną metodyką, czyli na przykład jedni wykrywali Treg za pomocą cytometrii przepływową, inni w barwieniach i w ocenie mikroskopowej. Szczególnie w tym ostatnim przypadku wykorzystywano pojedyncze barwienie na obecność FOXP3, a nie pełen panel CD4+CD25^{high}FOXP3+, jaki powinno się zastosować, aby mieć pewność, że wykrywa się limfocyty Treg, a nie na przykład aktywowane limfocyty T (o których wiadomo, że mogą mieć podwyższoną ekspresję FOXP3).

Poważną przeszkodą w możliwości porównywania prac różnych autorów jest też przewaga badań prowadzonych w odniesieniu do różnych grup chłoniaków, w których w związku ze zróżnicowaniem wyników Treg dla każdego typu chłoniaka trudno jest ocenić wpływ Treg na całą grupę NHL.

Podsumowanie

Niewątpliwie prace, w których oceniano wpływ limfocytów Treg na występowanie oraz przebieg kliniczny HL i NHL, wnoszą wiele nowych informacji, ale jednocześnie są stosunkowo nowym obszarem badań. Obecność limfocytów Treg w niektórych nowotworach limfoproliferacyjnych jest związana z korzystnym, w innych zaś z niekorzystnym rokowaniem u chorych. Z powyższych prac wynika, że nie można rozumieć funkcji limfocytów Treg w chłoniaku przez prostą ekstrapolację z badań na nowotworach litych. W badaniach *in vitro* wykazano, że limfocyty Treg mogą eliminować chłoniakowe limfocyty B. Mimo obiecujących wyników badania te powinny być interpretowane ze szczególną ostrożnością, gdyż ich rezultaty nie są spójne. Wynikać to może zarówno z samej metodyki badania (liczba Treg w tkance chłoniakowej *v.* we krwi obwodowej), ze zróżnicowanych metod oraz markerów użytych do immunofenotypowania limfocytów Treg, jak i z analizowanych podtypów chłoniaków. Ewentualne wykorzystanie Treg w diagnozowaniu oraz prognozowaniu przebiegu tych nowotworów musi być poparte dalszymi rzetelnymi badaniami opartymi na spójnej metodyce i trafnie dobranym materiale.

Piśmiennictwo

1. Gershon R.K., Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 1970; 18: 723–737.
2. Nishizuka Y., Sakakura T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 1969; 166: 753–755.
3. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M. Immunologic tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 1995; 155: 1151–1164.
4. Brunkow M.E., Jeffery E.W., Hjerrild K.A. i wsp. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* 2001; 27: 68–73.
5. Hori S., Nomura T., Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299: 1057–1061.
6. Yagi H., Nomura T., Nakamura K. i wsp. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int. Immunol.* 2004; 16: 1643–1656.
7. Walker M.R., Kasprzewicz D.J., Gersuk V.H. i wsp. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25– T cells. *J. Clin. Invest.* 2003; 112: 1437–1443
8. Pillai V., Ortega S.B., Wang C.K., Karandikar N.J. Transient regulatory T-cells: a state attained by all activated human T-cells. *Clin. Immunol.* 2007; 123: 18–29.
9. Liu W., Putnam A.L., Xu-Yu Z. i wsp. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4 Treg cells. *J. Exp. Med.* 2006; 203: 1701–1711.
10. Read S., Greenwald R., Izcue A. i wsp. Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo. *J. Immunol.* 2006; 177: 4376–4383.
11. Zheng S.G., Wang J., Wang P., Gray J.D., Horwitz D.A. IL-2 is essential for TGF- β to convert naive CD4+CD25– cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *J. Immunol.* 2007; 178: 2018–2027.
12. Santner-Nanan B., Seddiki N., Zhu E. i wsp. Accelerated age-dependent transition of human regulatory T cells to effector memory phenotype. *Int. Immunol.* 2008; 20: 375–383.
13. Hoffmann P., Eder R., Boeld T.J. i wsp. Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25^{high} T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon *in vitro* expansion. *Blood* 2006; 108: 4260–4267.
14. Vukmanovic-Stejić M., Zhang Y., Cook J.E. i wsp. Human CD4+CD25^{hi} Foxp3+ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations *in vivo*. *J. Clin. Invest.* 2006; 116: 2423–2433.
15. Booth N.J., McQuaid A.J., Sobande T. i wsp. Different proliferative potential and migratory characteristics of human CD4+ regulatory T cells that express either CD45RA or CD45RO. *J. Immunol.* 2010; 184: 4317–4326.
16. Baecher-Allan C., Wolf E., Hafler D.A. MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *J. Immunol.* 2006; 176: 4622–4631.
17. Borsellino G., Kleinewietfeld M., Di Mitri D. i wsp. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 2007; 110: 1225–1232.

18. Deaglio S., Dwyer K.M., Gao W. i wsp. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* 2007; 204: 1257–1265.
19. Fu S., Yopp A.C., Mao X. i wsp. CD4+ CD25+ CD62+ T-regulatory cell subset has optimal suppressive and proliferative potential. *Am. J. Transplant.* 2004; 4: 65–78.
20. Schmetterer K.G., Neunkirchner A., Pickl W.F. Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. *FASEB J.* 2012; 26: 2253–2276.
21. Lindqvist C.A., Christiansson L.H., Simonsson B. i wsp. T regulatory cells control T-cell proliferation partly by the release of soluble CD25 in patients with B-cell malignancies. *Immunology* 2010; 131: 371–376.
22. Ishida T., Ishii T., Inagaki A. i wsp. Specific recruitment of CC chemokine receptor 4-positive regulatory T cells in Hodgkin lymphoma fosters immune privilege. *Cancer Res.* 2006; 66: 5716–5722.
23. Niens M., Visser L., Nolte I.M. i wsp. Serum chemokine levels in Hodgkin lymphoma patients: highly increased levels of CCL17 and CCL22. *Br. J. Haematol.* 2008; 140: 527–536.
24. Bosler D.S., Douglas-Nikitin V.K., Harris V.N., Smith M.D. Detection of T-regulatory cells has a potential role in the diagnosis of classical Hodgkin lymphoma. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2008; 74: 227–235.
25. Schreck S., Friebel D., Buettner M. i wsp. Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. *Hematol. Oncol.* 2009; 27: 31–39.
26. Alvaro T., Lejeune M., Salvadó M.T. i wsp. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 1467–1473.
27. Tzankov A., Meier C., Hirschmann P. i wsp. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2008; 93: 193–200.
28. Koreishi A.F., Saenz A.J., Persky D.O. i wsp. The role of cytotoxic and regulatory T cells in relapsed/refractory Hodgkin lymphoma. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2010; 18: 206–211.
29. Wahlin B.E., Aggarwal M., Montes-Moreno S. i wsp. A unifying microenvironment model in follicular lymphoma: outcome is predicted by programmed death-1-positive, regulatory, cytotoxic, and helper T cells and macrophages. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16: 637–650.
30. Kuppers R. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat. Rev. Cancer* 2009; 9: 15–27.
31. Liu L., Yao J.X., Ding Q., Huang S.A. [CD4+ CD25high regulatory T cells in peripheral blood of patients with B cell non-Hodgkin's lymphoma]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2006; 14: 119–122.
32. Mittal S., Marshall N.A., Duncan L. i wsp. Local and systemic induction of CD4+CD25+ regulatory T-cell population by non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2008; 111: 5359–5370.
33. Lin H., Sun X.F., Zhen Z.J. i wsp. Correlation between peripheral blood CD4+CD25high CD127low regulatory T cell and clinical characteristics of patients with non-Hodgkin's lymphoma]. *Ai Zheng* 2009; 28: 1186–1192.
34. Yang Z.Z., Novak A.J., Ziesmer S.C., Witzig T.E., Ansell S.M. CD70+ non-Hodgkin lymphoma B-cells induce Foxp3 expression and regulatory function in intratumoral CD4+CD25 T-cells. *Blood* 2007; 110: 2537–2544.
35. Głowala-Kosińska M., Chwieduk A., Nieckula J. i wsp. Association of circulating regulatory T cell number with the incidence and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma. *Eur. J. Haematol.* 2013; 91: 122–128.
36. Dehghani M., Sharifpour S., Amirghofran Z., Zare H.R. Prognostic significance of T cell subsets in peripheral blood of B cell non-Hodgkin's lymphoma patients. *Med. Oncol.* 2012; 29: 2364–2371.
37. Lee N.R., Song E.K., Jang K.Y. i wsp. Prognostic impact of tumor infiltrating FOXP3 positive regulatory T cells in diffuse large B-cell lymphoma at diagnosis. *Leuk. Lymphoma* 2008; 49: 247–256.
38. Carreras J., Lopez-Guillermo A., Fox B.C. i wsp. High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood* 2006; 108: 2957–2964.
39. Croci D.O., Zacarias Fluck M.F., Rico M.J. i wsp. Dynamic cross-talk between tumor and immune cells in orchestrating the immunosuppressive network at the tumor microenvironment. *Cancer Immunol. Immunother.* 2007; 56: 1687–1700.
40. Ai W.Z., Hou J.Z., Zeiser R. i wsp. Follicular lymphoma B cells induce the conversion of conventional CD4+ T cells to T-regulatory cells. *Int. J. Cancer* 2009; 124: 239–244.
41. Han Y., Wu J., Bi L. i wsp. Malignant B cells induce the conversion of CD4+CD25- T cells to regulatory T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *PLoS One* 2011; 6: e28649.
42. Lim H.W., Hillsamer P., Banham A.H., Kim C.H. Cutting edge: Direct suppression of b cells by cd4+ cd25+ regulatory t cells. *J. Immunol.* 2005; 175: 4180–4183.
43. Curotto de Lafaille M.A., Lafaille J.J. CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Curr. Opin. Immunol.* 2002; 14: 771–778.
44. Lindqvist C.A., Christiansson L.H., Thörn I. i wsp. Both CD4+ FoxP3+ and CD4+ FoxP3- T cells from patients with B-cell malignancy express cytolytic markers and kill autologous leukaemic B cells in vitro. *Immunology* 2011; 133: 296–306.
45. Lindqvist C.A., Loskog A.S. T regulatory cells in B-cell malignancy — tumour support or kiss of death? *Immunology* 2012; 135: 255–260.
46. Schulz A., Toedt G., Zenz T. i wsp. Inflammatory cytokines and signaling pathways are associated with survival of primary chronic lymphocytic leukemia cells in vitro: a dominant role of CCL2. *Haematologica* 2011; 96: 408–416.
47. Procházka V., Jarošová M., Prouzová Z. i wsp. Immune escape mechanisms in diffuse large B-cell lymphoma. *ISRN Immunology* 2012; 2012: 208903.
48. Wang J., Ke X.Y. The four types of Tregs in malignant lymphomas. *J. Hematol. Oncol.* 2011; 4: 50.