

## Характеристика субпопуляций лимфоцитов периферической крови и лимфатических узлов у больных раком яичников

И.Ж. Шубина, А.Н. Грицай, Л.Т. Мамедова, А.В. Сергеев, С.А. Кузнецов,  
Н.Р. Погосян, Н.И. Лазарева, М.В. Киселевский  
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

Контакты: Ирина Жановна Шубина irinashubina@mail.ru

Все больше данных свидетельствуют о том, что рак яичников (РЯ) является иммуногенной опухолью. Проводятся клинические исследования по иммунотерапии на основе активированных натуральных киллеров (НК) и дендритных клеток (ДК). В качестве источника эффекторов иммунитета предлагается использовать мононуклеарные клетки (МНК) как периферической крови, так и лимфатических узлов (ЛУ) пациенток. В данной работе дана характеристика эффекторных клеток периферической крови и ЛУ у больных РЯ. В периферической крови обнаружены субпопуляции Т-клеток: Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов и НК. В ЛУ практически не обнаруживали экспрессию антигенов НК, при этом отмечали экспрессию маркеров ДК и Т-регуляторных клеток. Цитотоксическая активность МНК была выше по отношению к аутологичным опухолевым клеткам, чем к клеткам линии K562. В образцах опухолевой ткани РЯ наблюдали незначительное содержание опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов.

**Ключевые слова:** рак яичников, лимфатические узлы, иммунотерапия, натуральные киллеры, дендритные клетки, опухоль-инфильтрирующие лимфоциты

### Characteristics of lymphocyte subpopulations in the peripheral blood and lymph nodes of patients with ovarian cancer

I.Zh. Shubina, A.N. Gritsay, L.T. Mamedova, A.V. Sergeev, S.A. Kuznetsov,  
N.R. Pogosyan, N.I. Lazareva, M.V. Kiselevsky

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

More and more data suggest that ovarian cancer (OC) is an immunogenic tumor. Clinical trials dealing with immunotherapy based on activated natural killer (NK) cells and dendritic cells (DC) are under way. Mononuclear cells (MNCs) from both peripheral blood and lymph nodes (LN) are proposed to be used as a source of immunity effectors. This paper characterizes peripheral blood and LN effector cells in patients with OC. The peripheral blood displayed T cell subpopulations: T helper cells, cytotoxic T lymphocytes, and NK cells. LN showed virtually no expression of NK cell antigens, but exhibited the expression of markers of DC and T regulatory cells at the same time. The cytotoxic activity of MNCs against autologous tumor cells was higher than that against the K562 cell line. OC tissue samples were observed to contain low tumor-infiltrating lymphocyte counts.

**Key words:** ovarian cancer, lymph nodes, immunotherapy, natural killer cells, dendritic cells, tumor-infiltrating lymphocytes

#### Введение

Если принять во внимание, что рак яичников (РЯ) — это иммуногенная опухоль, то иммунотерапия, направленная на стимуляцию врожденного и адаптивного иммунитета, может вызывать лечебный эффект у пациенток с РЯ [1–3].

Во всем мире проводятся многочисленные клинические исследования различных методов клеточной иммунотерапии. Чаще всего для этих целей используют активированные интерлейкины-2 (ИЛ-2) или другие цитокины лимфоцитов (лимфокин-активированные киллеры (ЛАК), цитокин-индуцированные киллеры (ЦИК), активированные натуральные киллеры (а-НК), опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ) и вакцины, например, разработанные на основе дендритных клеток (ДК)) [4–7]. Однако в связи с невысокой эффективностью эти методы не включены в стандарты лечения.

Действие а-НК (ЛАК, ЦИК) и ДК-вакцин направлено на стимуляцию разных звеньев противоопухолевого иммунитета: врожденного и адаптивного. Для реализации адаптивного иммунитета необходимо наличие на трансформированных клетках опухолевого антигена и молекул МНС (major histocompatibility complex — главный комплекс гистосовместимости), в то время как эффекторы врожденного иммунитета, напротив, действуют независимо от экспрессии антигенов, а сигналом на киллинг является отсутствие или низкий уровень МНС на клеточной мембране. Учитывая гетерогенность популяции опухолевых клеток, весьма вероятно, что в опухоли могут быть представлены различные подтипы клеток с разным уровнем экспрессии опухолевых антигенов и МНС. Следовательно, применение лишь одного из отмеченных методов адаптивной иммунотерапии может оказать воздействие только на определенные субпопуля-

ции злокачественно трансформированных клеток и даже привести к развитию иммунорезистентных клонов за счет избирательной элиминации иммуночувствительных клеток. Поэтому в последние годы появляются работы, посвященные мультицеллюлярной иммунотерапии онкологических больных на основе комбинации активированных киллеров и ДК. Такое сочетание представляется целесообразным также потому, что эффекторы врожденного иммунитета (НК, НК Т-клеток) и ДК способны усиливать эффекты друг друга [8].

Н. Kimura et al. использовали в клинических исследованиях активированные эффекторские клетки, выделенные из интактных лимфатических узлов (ЛУ), дренирующих область опухоли, в которых были и лимфоциты, и ДК [9]. Авторы предположили, что эти ДК примированы опухолевым антигеном и при совместной инкубации с активированными лимфоцитами могут индуцировать опухоль-специфические цитотоксические лимфоциты (ЦТЛ). Например, использование в адьювантном режиме а-НК в комбинации с ДК и 2 курсов карбоплатина в сочетании с паклитакселом позволило повысить 5-летнюю выживаемость у больных немелкоклеточным раком легкого в контрольной группе (2 курса карбоплатин + паклитаксел) с 12,5 до 58,4 % при хорошей переносимости метода.

Режим адьювантной адаптивной иммунотерапии с применением а-НК и ДК из удаленных во время операции ЛУ может быть использован в целях продления безрецидивного периода жизни у больных РЯ после радикального лечения.

### Материалы и методы

В исследование были включены 17 больных в возрасте 46–67 лет с верифицированным диагнозом РЯ, из них 9 пациенток не получали предшествующую неоадьювантную противоопухолевую терапию, а 8 женщин получали ее в режиме паклитаксел 175 мг/м<sup>2</sup> + карбоплатин АУС-6. На момент исследования все больные получили хирургическое лечение по поводу РЯ. Все пациентки давали информированное согласие по форме, утвержденной этическим комитетом ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН.

Выделение мононуклеарных клеток (МНК) из стабилизированной гепарином (25 ед/мл) периферической крови пациенток, полученной перед хирургической операцией, проводили на одноступенчатом градиенте фиколл-урографина с плотностью 1,077 г/см<sup>3</sup> центрифугированием при 1500 об/мин в течение 20 мин по стандартной методике [10].

Удаленные во время операции ЛУ передавали в лабораторию для исследования в течение 30 мин. Полученный материал подвергали механической дезагрегации, получали клеточную суспензию, дважды отмывали центрифугированием при 1500 об/мин по 3 мин в 10-крат-

ном объеме раствора Хэнкса. Центрифугат ресуспендировали в растворе Хэнкса, затем фильтровали через стерильную нейлоновую сетку для клеток с диаметром пор 40 мкм (SPL Lifesciences, Корея).

Полученную после стандартной процедуры выделения суспензию МНК инкубировали в полной культуральной среде (ПКС) – среда RPMI-1640, содержащая 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, L-глутамин (150 мкг/мл), пенициллин (50 Ед/мл), стрептомицин (50 мкг/мл) в объеме 10 мл в культуральных флаконах при 37 °С в атмосфере 5 % СО<sub>2</sub>. Для поддержания клеточной культуры ПКС меняли раз в 3 дня.

Культуру опухолевых клеток РЯ получали из асцитической жидкости, полученной после операции пациенток с данным заболеванием. Опухолевые клетки отмывали от асцитической жидкости центрифугированием при 1500 об/мин в течение 3–5 мин, используя раствор Хэнкса. Затем осадок ресуспендировали в ПКС и опухолевые клетки инкубировали в культуральных флаконах для получения плотного монослоя при температуре 37 °С в атмосфере 5 % СО<sub>2</sub>.

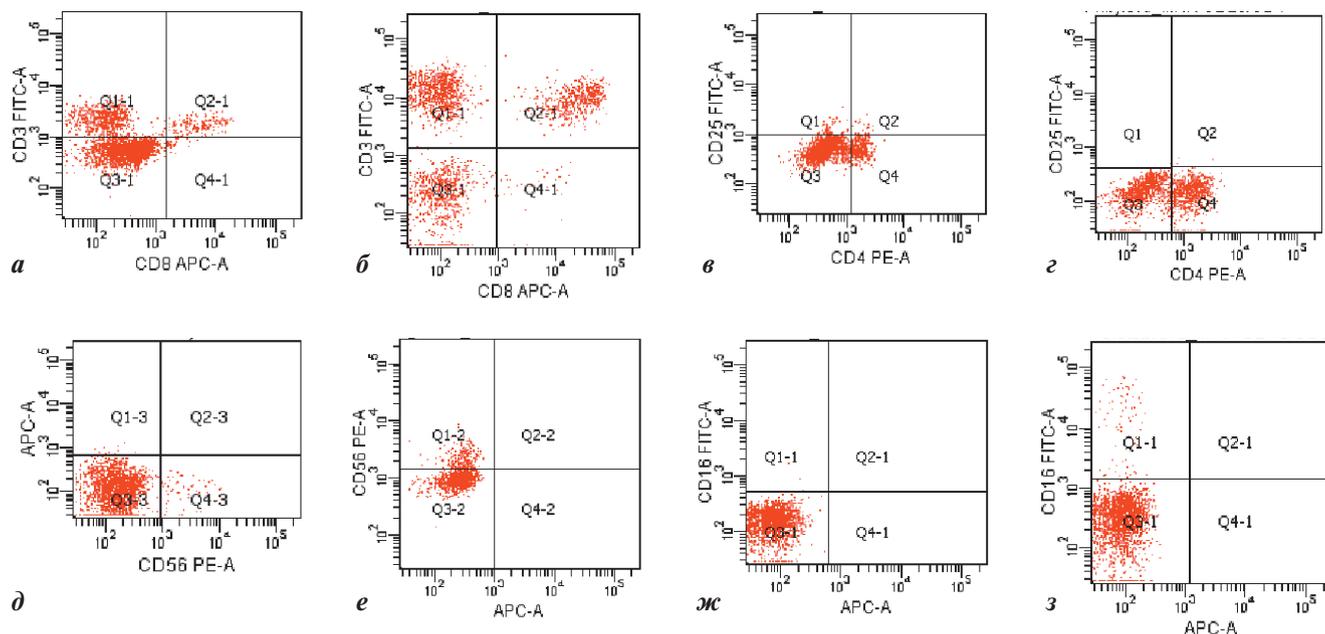
Цитотоксическую активность лимфоцитов определяли с помощью МТТ-теста. В качестве клеток-мишеней использовали опухолевые клетки линии K562 (эритробластный лейкоз человека), а также опухолевые клетки РЯ, выделенные из асцитической жидкости пациента и переведенные в клеточную культуру. Опухолевые клетки (2 × 10<sup>4</sup> в 1 мл) инкубировали в ПКС с МНК в соотношениях клетка-мишень/эффектор, равных 1:5 и 1:2, в плоскостонных 96-луночных микропланшетах в течение 24 ч при 37 °С и 5 % СО<sub>2</sub>. По истечении срока инкубации в каждую лунку добавляли по 20 мкл рабочего раствора витального красителя МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-диметилтетразолий бромид). После этого клетки инкубировали 2 ч в СО<sub>2</sub>-инкубаторе. Надосадочную среду удаляли с помощью шприца, затем в лунки добавляли по 150 мкл диметилсульфоксида (ДМСО). Через 20 мин инкубации при комнатной температуре измеряли оптическую плотность на мультисканере при длине волны 540 нм. Используя эти данные, рассчитывали процент цитотоксичности по формуле:

$$\text{ЦИ} (\%) = (1 - (\text{ОП}_{\text{Э+М}} - \text{ОП}_{\text{Э}}) / \text{ОП}_{\text{М}}) \times 100,$$

где ЦИ – цитотоксический индекс; ОП<sub>Э+М</sub> – значение оптической плотности в лунках изучаемых серий; ОП<sub>Э</sub> – значение оптической плотности в лунках с мононуклеарными лейкоцитами; ОП<sub>М</sub> – значение оптической плотности в лунках с клетками опухоли.

### Приготовление цитологического препарата

Для приготовления препарата 10–15 мкл клеточного центрифугата наносили на предметное стекло, фиксировали раствором Май-Грюнвальда в течение 10 мин, отмывали фиксатор дистиллированной водой,



**Рис. 1.** Экспрессия поверхностных маркеров на МНК, выделенных из ЛУ и периферической крови больных РЯ. Экспрессия маркеров CD3 и CD3/CD8 на МНК, выделенных из ЛУ (а); CD3 и CD3/CD8 на МНК периферической крови (б); CD4 и CD25/CD4 на МНК, выделенных из ЛУ (в); CD4 и CD25/CD4 на МНК периферической крови (г); CD56 на МНК, выделенных из ЛУ (д); CD56 на МНК периферической крови (е); CD16 на МНК, выделенных из ЛУ (ж); CD16 на МНК периферической крови (з). CD – кластеры дифференцировки лимфоцитов, FITC – флуоресцеинизотиоцианат, PE – фикоэритрин, APC – аллофикоцианин; график в формате Dot Plot, оси x и y – интенсивность флуоресценции (MFI – mean fluorescence intensity), усл. ед.

окрашивали азур-эозином по Романовскому–Гимзе. Визуализацию и получение фотоснимков осуществляли с помощью системы AxioVision 4 (Carl Zeiss, Германия).

### Проточная цитофлуориметрия

Определение иммунофенотипа МНК проводили при помощи моноклональных антител (МКА) против соответствующих антигенов, конъюгированных с флуоресцентными красителями FITC, PE или APC: CD3, CD8, CD4, CD25, CD45, CD14, CD16, CD56, CD86, CD11c, HLA-DR.

Цитометрические измерения осуществляли на проточном цитофлуориметре, оснащенный 2 лазерами с длиной волны 488 нм и 635 нм. Данные анализировали при выделении соответствующего гейта клеточной популяции в режиме распределения клеток Dot Plot по их линейному прямому и боковому светорассеянию. При учете результатов подсчитывали 5000 событий в гейте.

Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартного пакета статистических программ Excel и BD FACSDiva.

### Результаты и обсуждение

Для определения субпопуляций клеток оценивали экспрессию поверхностных маркеров МНК, выделенных из периферической крови (группа МНК) и ЛУ (группа ЛУ) больных РЯ. На рис. 1а–з представлены

примеры графиков распределения обнаруженных субпопуляций зрелых Т-клеток, ЦТЛ, Т-хелперов, Т-регуляторных клеток, НК.

При сравнительном изучении иммунофенотипа популяции лейкоцитарных клеток (CD45+) было обнаружено, что в ЛУ представлены субпопуляции клеток, несущих поверхностные маркеры CD3 (Т-лимфоциты), от 24,6 до 79,8 % общего пула исследуемых клеток; CD4 (Т-хелперы) – от 13,4 до 55,3 %; CD3/CD8 (ЦТЛ) – от 3,8 до 14,1 %; CD16 (НК-клетки) – от 0 до 0,5 %; CD16/CD56 (НК) – от 0 до 0,8 %; CD56 (НК) – от 0 до 2,4 %; CD86 (ДК) – от 0,5 до 23,5 %; CD11c (ДК) – от 0 до 29,3 %; CD4/CD25 (Т-регуляторные клетки) – от 0 до 12,9 % (группа ЛУ) (рис. 2а).

В группе МНК распределение субпопуляций клеток по экспрессии поверхностных маркеров было следующим: CD3+ – от 18,8 до 74,9 % общего пула исследуемых клеток; CD4+ – от 9,4 до 64,0 %; CD3+/CD8+ – от 4,4 до 30,8 %; CD16+ – от 0 до 7,7 %; CD16+/CD56+ – от 0 до 20,0 %; CD56+ – от 0 до 14,9 %; CD86+ – от 0 до 0,9 %; CD11c+ – от 0 до 7,8 %; CD4+/CD25+ – от 0 до 2,0 % (рис. 2б).

Из представленных данных (см. рис. 2а, б) видно, что в ЛУ практически отсутствует субпопуляция НК-клеток (в норме она может достигать 3 % общего пула МНК в ЛУ [11]). Несмотря на то что в МНК периферической крови эта субпопуляция сохраняется, ее содержание значительно снижено (от 0 до 20 %) по сравне-

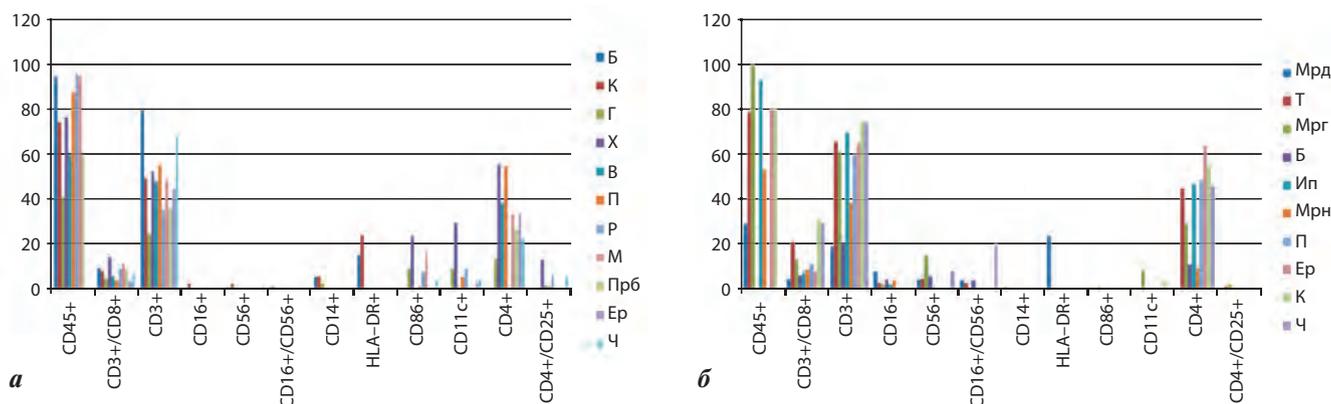


Рис. 2. Распределение субпопуляций лимфоцитов в ЛУ (а) и в периферической крови (б) у больных РЯ. Буквенными сокращениями обозначены разные пациенты

нию с референсными значениями (5–20 %). В ЛУ обнаружен значительный уровень экспрессии маркеров незрелых CD86+ и зрелых CD11c+ ДК. В периферической крови практически не наблюдали экспрессию маркеров ДК, также экспрессию маркеров супрессорной субпопуляции Т-регуляторных клеток CD4+/CD25+, однако эта субпопуляция была зарегистрирована в половине образцов МНК ЛУ.

Представленные результаты демонстрируют различия в субпопуляционном составе ЛУ и МНК периферической крови больных РЯ. Иммунный ответ на опухоль-ассоциированные антигены сначала развивается в дренирующих опухоль ЛУ [12]. Именно в этих вторичных лимфоидных органах может быть эффективно индуцирован иммунный ответ, так как здесь может происходить межклеточное взаимодействие в условиях микроокружения, насыщенного различными цитокинами [13]. На раннем этапе развития опухоли в дренирующих ЛУ происходит первичное распознавание опухоль-ассоциированных антигенов ЦТЛ в результате примирования нативных Т-клеток. ДК являются специфическими антигенпрезенти-

рующими клетками. Незрелые ДК неподвижно инкорпорированы в ткань ЛУ и способны к активному захвату и процессингу антигенов, в то время как зрелые ДК сохраняют мобильность и способны презентировать антиген в комплексе с молекулами МНС II и покоящимися Т-клетками [14].

Таким образом, в условиях дренирующего ЛУ в присутствии ДК и Т-клеток возможна индукция специфического иммунного ответа. Отсутствие субпопуляции НК (см. рис. 2а), играющих одну из главных ролей в развитии реакции врожденного иммунитета, вероятно, является следствием супрессорного воздействия цитокинов, выделяемых Т-регуляторными клетками, обнаруженными в образцах МНК ЛУ (см. рис. 2а) и других иммуносупрессивных факторов, выделяемых опухолью, другими факторами микроокружения, включая ко-стимулирующую молекулу В7.1 (CD80) или В7.2 (CD86) (см. рис. 2а) [15–17].

Выделенные из периферической крови МНК, а также на градиенте фиколл-урографина клетки из асцитической жидкости больных РЯ инкубировали в ПКС RPMI-1640. На рис. 3 представлены цитологи-

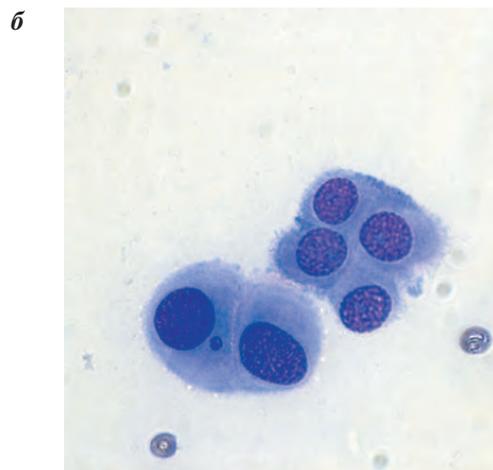
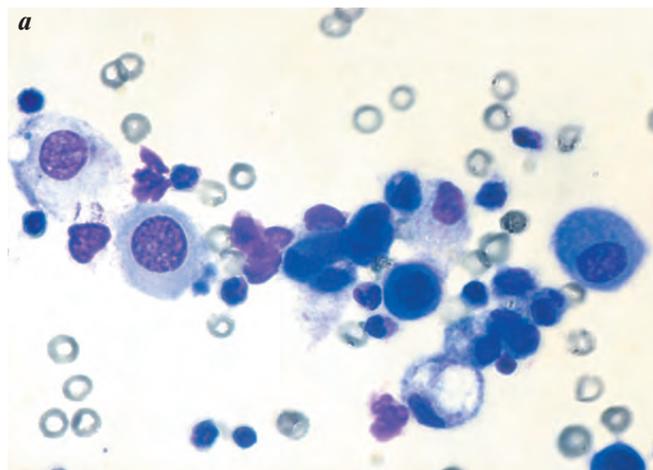


Рис. 3. Цитологический препарат из асцита. Окраска по Романовскому—Гимзе азур-эозином. Ув. 10 × 90. Клетки карциномы яичника: лейкоциты, эритроциты (а); эритроциты (б)

Цитотоксическая активность МНК в отношении опухолевых клеток РЯ и K562 (%) (n = 6)

Соотношение клетка-мишень/клетка-эффектор	Карцинома яичника (РЯ)	K562
1:5	47,3 ± 3,5	37,5 ± 2,8
1:2	25,2 ± 2,7	16,2 ± 3,2

ческие препараты асцита больных РЯ. На препаратах отчетливо видны значительного размера опухолевые клетки, некоторые из них многоядерные (рис. 3а, б), некоторые имеют сильно вакуолизированную цитоплазму (см. рис. 3а). На препарате также определяются лейкоциты (см. рис. 3а) и эритроциты (см. рис. 3а, б).

Клетки, полученные из асцитической жидкости, инкубировали в культуральных флаконах в ПКС при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>, каждые 3 дня меняя среду и поддерживая рост культуры в виде плотного монослоя опухолевых клеток. Клетки карциномы яичника (РЯ) хорошо пролиферировали, было проведено не менее 20 пассажей в течение 4 мес.

Для анализа цитотоксической активности МНК (МТТ-тест) монослой клеток РЯ снимали с пластиковых флаконов раствором Версена, дважды центрифугировали в растворе Хэнкса и использовали для сравнительного МТТ-теста. МНК инкубировали с аутологичными клетками РЯ и с аллогенными клетками эритробластного лейкоза человека K562 в соотношениях 1:2 и 1:5 (клетка-мишень/клетка-эффектор) (таблица).

Из полученных данных видно, что наиболее высокая цитотоксичность наблюдается в отношении аутологичных клеток карциномы яичника по сравнению

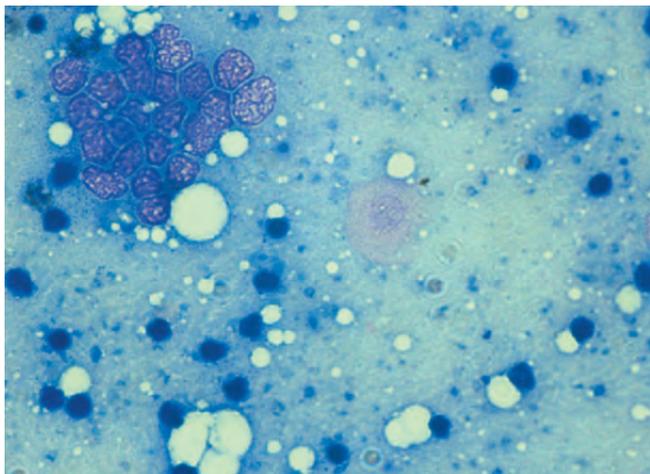


Рис. 4. Отпечаток части ЛУ больной РЯ. Окраска по Романовскому–Гимзе азур-эозином. Ув. 10 × 90

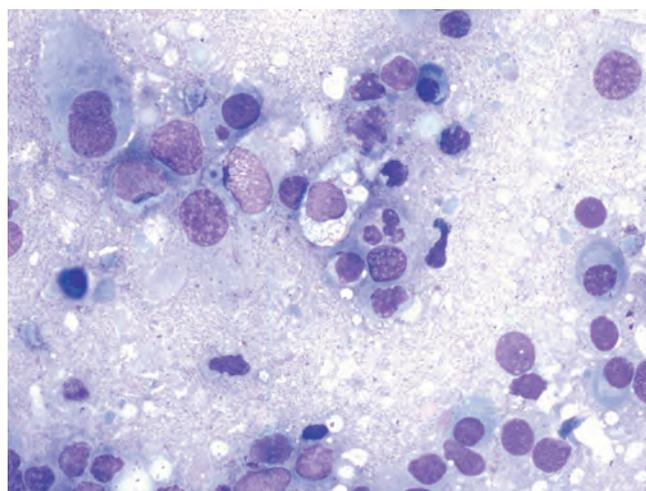


Рис. 5. Отпечаток опухолевой ткани больной РЯ. Окраска по Романовскому–Гимзе азур-эозином. Ув. 10 × 90

с аллогенными клетками K562 (47,3 ± 3,5 и 37,5 ± 2,8 % соответственно) при большем соотношении клетка-мишень/клетка-эффектор 1:5 ( $p < 0,05$ ).

Для того чтобы визуально оценить клеточный состав ЛУ и опухолевой ткани, были сделаны цитологические препараты их отпечатков. На рис. 4 можно видеть отдельную опухолевую клетку и скопление клеток РЯ в виде формирующегося метастаза. Также можно отметить присутствие лимфоцитов на данном препарате отпечатка ЛУ.

На цитологическом препарате отпечатка опухолевой ткани (рис. 5) можно выделить клетки хорошо дифференцированной аденокарциномы яичников, зрелые Т-клетки, активированные Т-клетки, макрофаг, 3 плазматические клетки. Можно предположить, что в опухоли происходит активное взаимодействие ОИЛ и злокачественно трансформированных клеток. Вероятно, в опухолевой ткани могут происходить и непосредственные межклеточные контакты.

Для изучения субпопуляционного состава ОИЛ образцы опухоли механически дезагрегировали, получали клеточную суспензию, дважды отмывали центрифугированием в 10-кратном объеме раствора Хэнкса, центрифугат фильтровали через стерильную нейлоновую сетку с диаметром пор 40 мкм. Полученную таким образом клеточную суспензию инкубировали в ПКС в стандартных условиях. При этом пролиферации лимфоцитов *in vitro* не наблюдали, в то время как опухолевые клетки образовывали плотный монослой в течение непродолжительного периода инкубации.

### Заключение

Изучаемые в настоящее время подходы клеточной иммунотерапии включают использование как активированных *ex vivo* разными цитокинами НК [18–21], так и выделенных из дренирующей опухоль ЛУ МНК [9] и ОИЛ [22, 23].

Результаты, полученные в данном исследовании, позволяют предположить, что ЛУ могут служить источником эффекторных клеток, генерируемых для последующего использования в противоопухолевой иммунотерапии. Субпопуляционный состав МНК ЛУ представлен зрелыми Т-лимфоцитами, Т-хелперами, ЦТЛ, незначительным количеством Т-регуляторных клеток, а также субпопуляцией клеток, экспрессирующих маркеры ДК (CD86, CD11c).

По данным литературы, иммунотерапия с использованием аутологичных ОИЛ представляется одним из наиболее перспективных методов адаптивной кле-

точной терапии [24]. Однако в данном исследовании содержание ОИЛ в опухолевой ткани оказалось недостаточным для получения хорошо пролиферирующей культуры лимфоцитов. Предлагаемые в упомянутых литературных источниках методы иммунотерапии с помощью ОИЛ обычно включают использование также и других активированных эффекторов иммунитета, полученных из периферической крови, таких как НК, Т-клетки, ЦТЛ, а также ИЛ-2 и иных модифицирующих факторов. Возможно, именно эти популяции лимфоцитов следует рассматривать как наиболее функционально активные источники для клеточной иммунотерапии.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

- Zhang L., Conejo-Garcia J.R., Katsaros D. et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003;348(3):203–13.
- Chu C.S., Kim S.H., June C.H., Coukos G. Immunotherapy opportunities in ovarian cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008;8(2):243–57.
- Kandalaf L.E., Powell D.J. Jr., Singh N., Coukos G. Immunotherapy for ovarian cancer: what's next? *J Clin Oncol* 2011;29(7):925–33.
- Адоптивная клеточная терапия: клинические исследования. В кн.: Биологические методы лечения онкологических заболеваний. Под ред. В.Т. ДеВита, С. Хеллман, С.А. Розенберг. Пер. с англ. М.: Медицина, 2002. С. 504–22.
- Hontscha C., Borck Y., Zhou H. et al. Clinical trials on CIK cells: first report of the international registry on CIK cells (IRCC). *J Cancer Res Clin Oncol* 2011;137(2):305–10.
- Моисеев В.М. Вакциноterapia при меланоме кожи. *Рос онкол журн* 2005;3:52–6.
- Sabado R.L., Bhardwaj N. Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment. *Immunotherapy* 2010;2(1):37–56.
- Valteau-Couanet D., Leboulaire C., Maincent K. et al. Dendritic cells for NK/LAK activation: rationale for multicellular immunotherapy in neuroblastoma patients. *Blood* 2002;100(7):2554–61.
- Kimura H., Iizasa T., Ishikawa A. et al. Prospective phase II study of post-surgical adjuvant chemo-immunotherapy using autologous dendritic cells and activated killer cells from tissue culture of tumor draining lymph nodes in primary lung cancer patients. *Anticancer Res* 2008;28(2B):1229–38.
- Шубина И.Ж., Титов К.С., Лебединская О.В. и др. Сравнительная характеристика лимфокин-активированных киллеров, генерированных из различных источников. *Рос биотер журн* 2006;3:43–50.
- Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П. Физиология естественных киллеров. М.: Медицина–Здоровье, 2005. С. 456.
- Vuylsteke R.J., van Leeuwen P.A., Meijer S. et al. Sampling tumor-draining lymph nodes for phenotypic and functional analysis of dendritic cells and T cells. *Am J Pathol* 2002;161(1):19–26.
- Santin A.D. Lymph node metastases: the importance of the microenvironment. *Cancer* 2000;88(1):175–9.
- De Vries I.J., Krooshoop D.J., Scharenborg N.M. et al. Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. *Cancer Res* 2003;63(1):12–7.
- Tanaka H., Tanaka J., Kjaergaard J., Shu S. Depletion of CD4+ CD25+ regulatory cells augments the generation of specific immune T cells in tumor-draining lymph nodes. *J Immunother* 2002;25(3):207–17.
- Ishigami S., Natsugoe S., Hokita S. et al. Intranodal antitumor immunocyte infiltration in node-negative gastric cancers. *Clin Cancer Res* 2000;6(7):2611–7.
- Dong H., Strome S.E., Salomao D.R. et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002;8(8):793–800.
- Jiang J., Xu N., Wu C. et al. Treatment of advanced gastric cancer by chemotherapy combined with autologous cytokine-induced killer cells. *Anticancer Res* 2006;26(3B):2237–42.
- Hui D., Qiang L., Jian W. et al. A randomized controlled trial of postoperative adjuvant cytokine-induced killer cells immunotherapy after radical resection of hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2009;41(1):36–41.
- Weng D.S., Zhou J., Zhou Q.M. et al. Minimally invasive treatment combined with cytokine-induced killer cells therapy lower the short-term recurrence rates of hepatocellular carcinomas. *J Immunother* 2008;31(1):63–71.
- Титов К.С., Демидов Л.В., Киселевский М.В. и др. Внутривлепральная иммунотерапия метастатических плевритов у больных раком молочной железы. *Опухоли женской репродуктивной системы* 2009;(3–4):29–33.
- Nguyen L.T., Yen P.H., Nie J. et al. Expansion and characterization of human melanoma tumor-infiltrating lymphocytes (TILs). *PLoS One* 2010;5(11):e13940.
- Brunner A., Hinterholzer S., Riss P. et al. Immunoeexpression of B7-H3 in endometrial cancer: relation to tumor T-cell infiltration and prognosis. *Gynecol Oncol* 2012;124(1):105–11.
- Wu R., Forget M.A., Chacon J. et al. Adoptive T-cell therapy using autologous tumor-infiltrating lymphocytes for metastatic melanoma: current status and future outlook. *Cancer J* 2012;18(2):160–75.