

## СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ОЦЕНКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУНИТЕТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

© *Илья Олегович Ищенко, Михаил Джузеппе Луиджиевич Оппедизано*

Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет 194100, Санкт-Петербург, Литовская ул., 2

**Контактная информация:** Илья Олегович Ищенко — студент 2-го курса, лечебный факультет. E-mail: ilyshaihchenko.2000@gmail.com

**РЕЗЮМЕ.** Применение проточной цитометрии в лабораторных исследованиях на сегодняшний день весьма актуально в связи с высокой точностью измерения физиологических внутриклеточных параметров и скоростью получения данных для каждой конкретной клетки. Данный метод анализа является универсальным для использования как в онкоиммунологии, так и в других смежных областях исследования клеточных образцов и характеристик их отдельных структур. В работе уделено внимание принципам оценки физико-химических параметров клеток, истории создания, а также возможностям клинического применения проточной цитофлюориметрии в определении иммунного статуса онкологических больных.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** проточная цитометрия, иммунный статус, проточный анализатор, иммунодиагностика, онкоиммунология, моноклональные антитела, флюорохромы.

## IMPROVEMENT OF ANTITUMINAL IMMUNITY ASSESSMENT USING THE METHOD OF FLOW CYTOMETRY

© *Ilya O. Ishchenko, Mikhail D.L. Oppedisano*

Saint-Petersburg State Pediatric Medical University. 194100, Russia, Saint-Petersburg, Litovskaya str., 2

**Contact Information:** Ilya O. Ishchenko — 2-year student, medical faculty. E-mail: ilyshaihchenko.2000@gmail.com

**ABSTRACT.** The use of flow cytometry in laboratory research today is very important due to the high accuracy of measuring physiological intracellular parameters and the speed of obtaining data for each specific cell. This analysis method is universal for use both in oncological immunology and in other related fields of study of cell samples and the characteristics of their individual structures. The work focuses on the principles of assessing the physicochemical parameters of cells, the history of creation, as well as the possibilities of the clinical use of flow cytofluorimetry in determining the immune status of cancer patients.

**KEY WORDS:** flow cytometry, immunological status, immunodiagnosis, oncoimmunology, monoclonal antibodies, fluorochromes.

### ВВЕДЕНИЕ

Проточная цитометрия (цитофлюориметрия) — это современная технология быстрого измерения физических и химических параметров клеток, органелл и происходящих в

них процессов [2, 5]. Разработка и внедрение в лабораторную практику данного метода позволили проводить исследования метаболизма каждой клетки в отдельности от всей клеточной субпопуляции с высокой точностью, относительной простотой и в сжатые сроки.

На сегодняшний день имеющиеся на рынке проточные цитометры сделали возможными анализы со скоростью до 100 000 событий в секунду, регистрируя при этом до  $10^6$ – $10^8$  клеток в образце. Такие возможности у метода появились не сразу [2, 4, 5]. Первое упоминание о проточных цитофлюоометрах относится к 1934 году, когда была опубликована статья с упоминанием полуавтоматического проточного оптического счетчика клеток. Позднее, в 1965 году, был создан волюметрический проточный сортер, позволивший разделять клеточные структуры по размеру. Спустя четыре года получил патент первый коммерческий флуоресцентный проточный анализатор, определявший не только размеры клеток, но и концентрацию внутриклеточных органелл за счёт флуоресценции и светорассеяния. Пик развития метода был достигнут только спустя полвека, когда стали разрабатываться анализаторы с потенциальными возможностями детекции до 50 параметров [1]. Благодаря достигнутому данный метод помимо изначально запланированного определения количества клеток позволил проводить также исследования их функционального состояния [2, 3, 4, 5, 6]. Другим преимуществом цитофлюориметрии является её универсальность, позволяющая исследовать форменные элементы периферической крови человека, диссоциированные клетки любых тканей, бактерии, клетки животных и

растений [4, 5, 11]. Помимо этого, с помощью проточной цитометрии можно определять уровень цитокинов — одного из основных показателей функциональной активности дендритных клеток [3, 5, 6, 10].

### ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип метода проточной цитометрии включает в себя три основных этапа (рис. 1) [2, 3, 5]:

- окрашивание проб флуорисцирующими красителями;
- измерение и регистрация оптических параметров клеток в проточной кювете и преобразование света в электрический сигнал;
- определение количественной величины измеряемых параметров.

В основе метода лежит принцип гидродинамического фокусирования. Суспензия клеток, предварительно окрашенных флуоресцентными красителями, под давлением подается в проточную ячейку. За счет разности давлений между образцом и проточной жидкостью происходит гидродинамическое фокусирование струи в струе, вследствие чего образуется два ламинарных потока жидкости и предотвращается их перемешивание (рис. 2). Диаметр внутренней струи соответствует размерам проходящих клеток, поэтому клетки выстраиваются друг за другом [2, 5, 8].

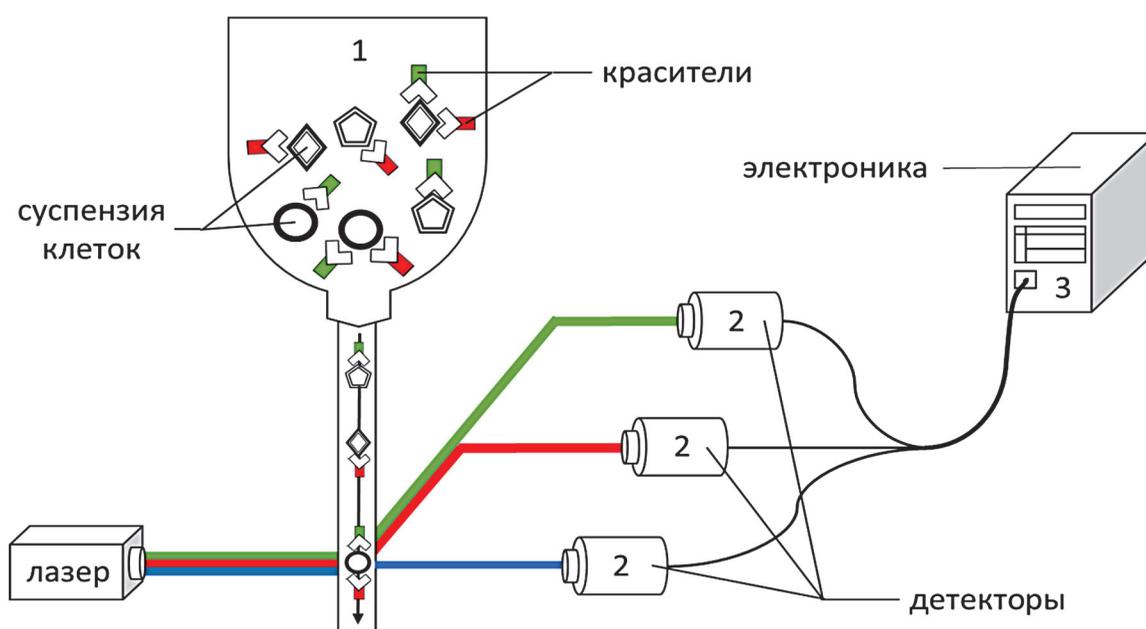


Рис. 1. Принцип проточной цитометрии.

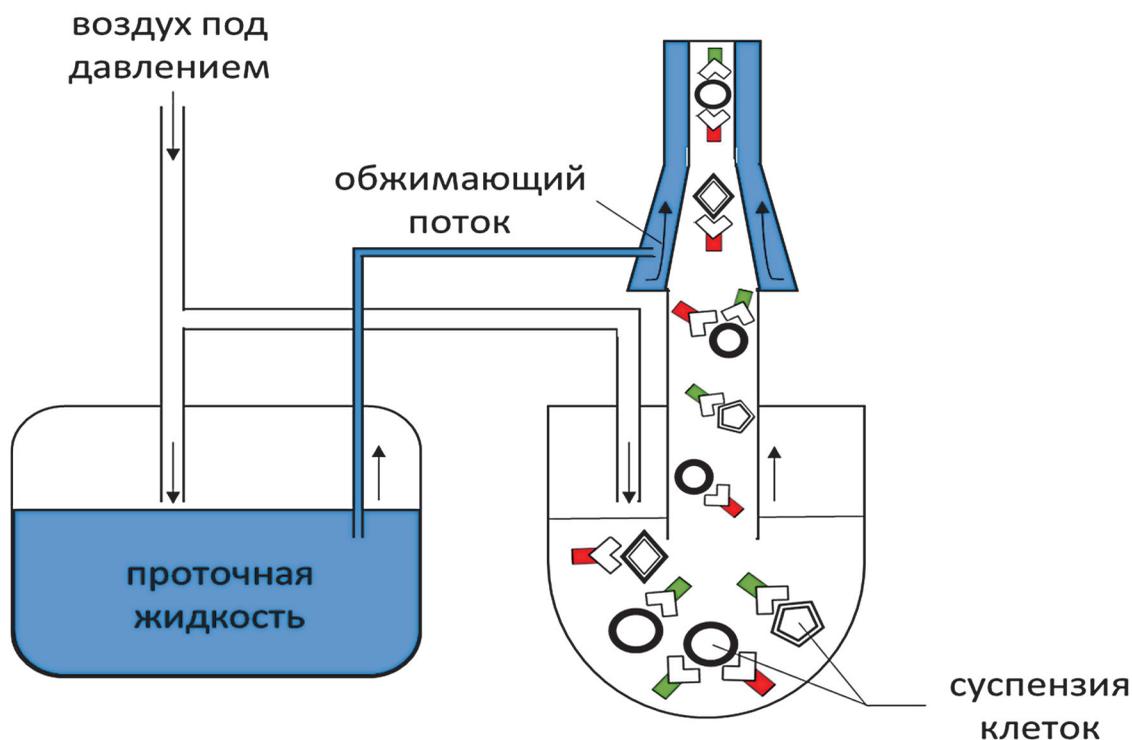


Рис. 2. Схема проточной системы.

В определенной зоне клетки пересекают луч источника света, после чего происходит регистрация информации об их параметрах. В ходе цитометрического анализа регистрируются такие показатели, как светорассеяние клеток и интенсивность флюоресценции. Первый включает в себя два компонента: FSC (forward side scatter) — показатель прямого светорассеяния и SSC (side scatter) — показатель бокового светорассеяния (рис. 3) [2, 5].

Прямое светорассеяние (FSC) позволяет определять размеры самой клетки. Отклонения лазерных лучей при этом светорассеянии не должны превышать 9–12 градусов. Боковое светорассеяние (SSC) дает информацию о внутриклеточных параметрах (наличие гранул, клеточных включений, концентрации физиологически значимых химических соединений в цитоплазме клеток. При прохождении сквозь клетку лазерный луч преломляется и рассеивается, затем излучение собирается по детекторам бокового и малоуглового (прямого) светорассеяния. Сам анализ показателей светорассеяния зависит от морфофункциональных особенностей клеток [2, 4, 5].

Предварительно клеточную фракцию нагружают моноклональными антителами (МАТ) и красителями — флюорохромами —

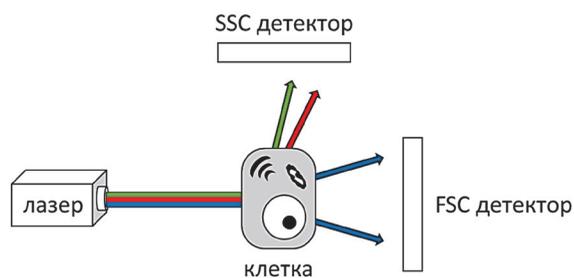


Рис. 3. Светорассеяния клетки.

органическими полимерами, содержащими сопряженные ароматические фрагменты. И только после этого раствор с содержимым подается в проточную кювету цитометра. Моноклональные антитела (МАТ) необходимы в данном анализе, поскольку именно с ними взаимодействуют флюорохромы [2, 5].

Принцип действия флюорохромов следующий: в результате присоединения к МАТ полимерного красителя образуется  $\pi$ -орбитальная система (рис. 4). Для неё характерна большая делокализация электронного облака. За счет флюоресцентного красителя флюорохромы обладают очень высоким квантовым выходом, что позволяет регистрировать даже самые слабые сигналы [2, 4].

Основной параметр, регистрируемый проточными цитометрами — интенсивность флюоресценции исследуемой субпопуляции клеток или внутриклеточных компонентов. В момент пересечения клеткой луча лазера флюорохромы, связанные с моноклональными антителами, переходят в возбуждённое состояние, в результате чего происходит изменение длины волны испускаемых флюоресцентными красителями квантов света. Данное излучение проходит через оптическую систему прибора (рис. 5), после чего происходит регистрация детекторами. Заключительный этап анализа проточного цитометра — преобразование оптических сигналов в электрические с последующим компьютерным анализом полученной информации [2, 4, 5].

Компьютерное отображение результатов цитофлюориметрии представляет собой график зависимости различных клеточных параметров. Ось абсцисс характеризует размеры

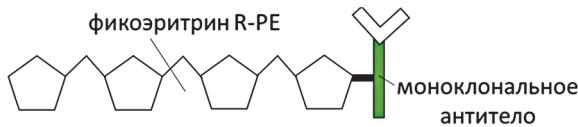


Рис. 4. Принцип действия фикоэритрина R-PE.

клеток, ось ординат — концентрацию клеточного содержимого. Также по осям могут быть заданы другие показатели для исследования, к примеру, по оси абсцисс — наличие на клеточных мембранах определённых кластеров дифференцировки (CD), а по оси ординат структура клеток. На рисунке 6 представлена оценка субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток крови: нейтрофилы имеют большие размеры и количество компонентов внутриклеточного содержимого по сравнению с моноцитами и лимфоцитами, поэтому на графике представлены выше и правее остальных [2]. По такому принципу и происходит анализ полученных данных методом проточной цитометрии. В итоге, из одной пробы материала пациента можно получить информацию о субпопуляционной фракции клеток, а также для каждой популяции из пробы оценить уровень апоптоза, пролиферации, экспрессии клеточных рецепторов, внутриклеточных белков и другие показатели [2, 4, 5, 11].

### ПРЕИМУЩЕСТВА МЕТОДА

Метод проточной цитометрии обладает рядом преимуществ, делающих его востребованным в лабораторной практике. В первую

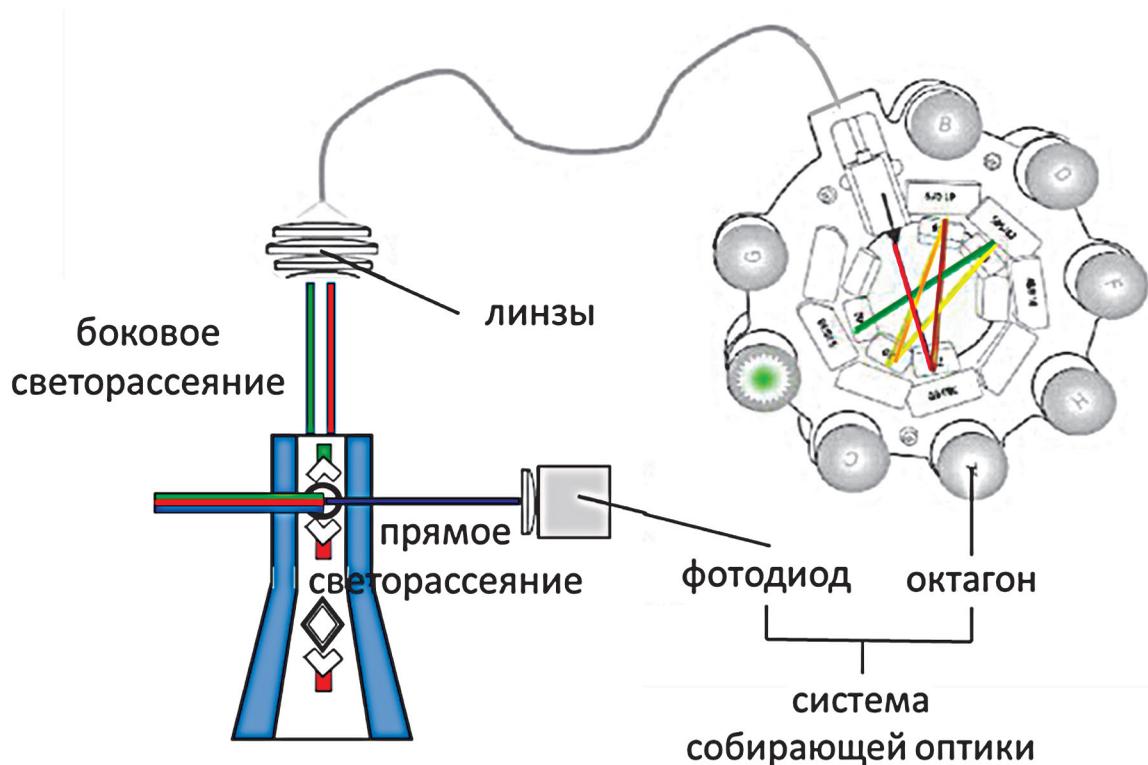


Рис. 5. Схема оптической системы.

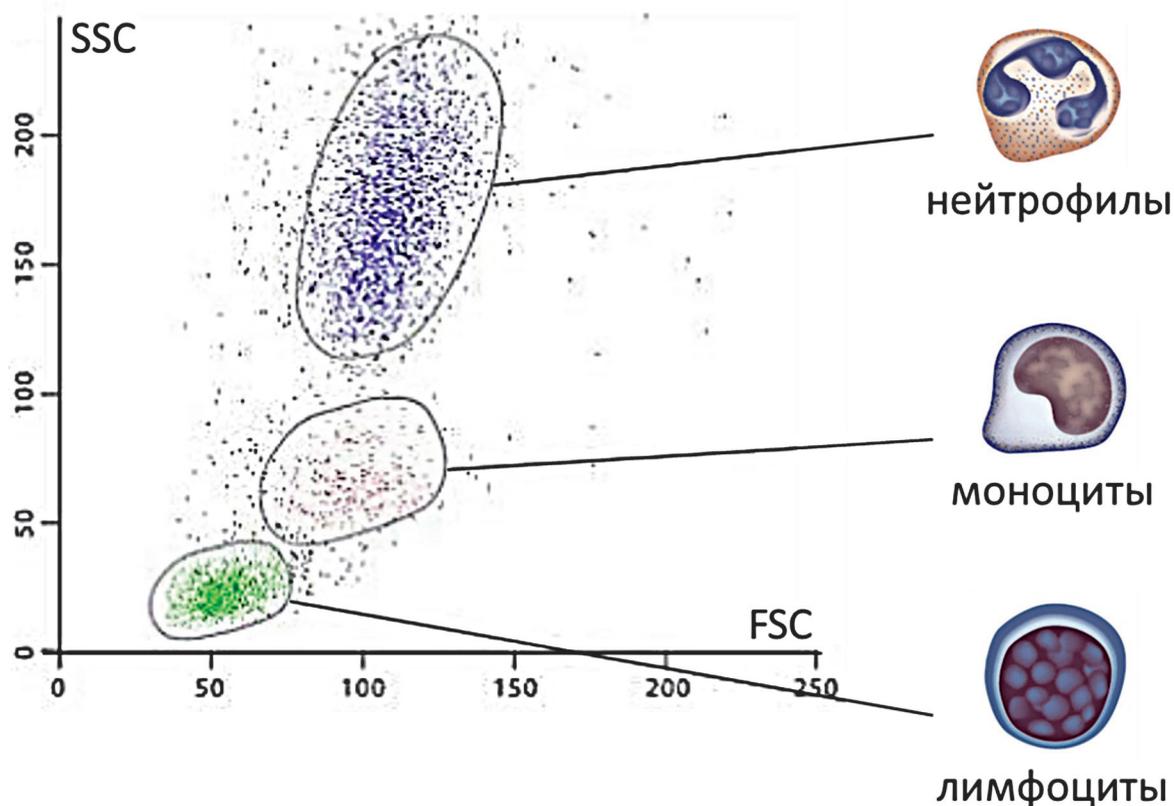


Рис. 6. Диаграмма бокового-прямого (SSC-FSC) светорассеяния для суспензии иммунокомпетентных клеток крови

очередь, этот метод позволяет осуществить быстрый анализ большого количества клеток и определить физико-химические показатели каждой конкретной клетки за счёт количественного измерения интенсивности флуоресценции. Такой результат достигается только при наличии высокоэффективных и высокочувствительных фотоприёмников, регистрирующих сигналы, полученные от оптической системы прибора. Кроме того, с помощью цитометрического анализа можно измерять физиологические внутриклеточные параметры: уровень pH, потенциал клеточной мембраны, концентрацию свободных ионов, а также оценить активность ферментов, входящих в состав клетки. Благодаря подобным возможностям проточная цитофлуориметрия применяется во многих областях медицины и биологии (рис. 7) [6, 7, 8, 9, 17]. К примеру, в биологической химии данный метод используется для определения уровня внутриклеточного кальция и синтеза в клетке активных форм кислорода, генерируемых во время респираторного «взрыва» [5, 13, 14]. Проточная цитометрия может быть использована для количественного анализа питательных веществ,

необходимых организму. Так, флуорохром «нильский красный» позволяет с хорошей воспроизводимостью регистрировать как накопление липидов в небольших по размеру липидных тельцах, так и уменьшение их уровня в живых клетках, не специализированных на создании жирового депо [5, 13, 15]. В цитологии с помощью цитометрического анализа можно исследовать практически все показатели фагоцитарного звена иммунной системы [5, 13]. Помимо этого, описываемый метод используется и в микробиологии при оценке бактерицидной функции фагоцитов периферической крови, причём по сравнению с классическими микробиологическими методами цитофлуориметрия сокращает время анализа в несколько раз [5, 14, 16]. Также на проточном цитометре проводится оценка апоптоза активированных лимфоцитов крови человека. При данном исследовании используется меченый флуорохромом аннексин V. Данный компонент связывается с фосфатидилсерин, который появляется на мембране клеток, подвергающихся апоптозу [5, 13]. Наиболее широко метод используется в иммунологии. Отдельное внимание стоит уде-

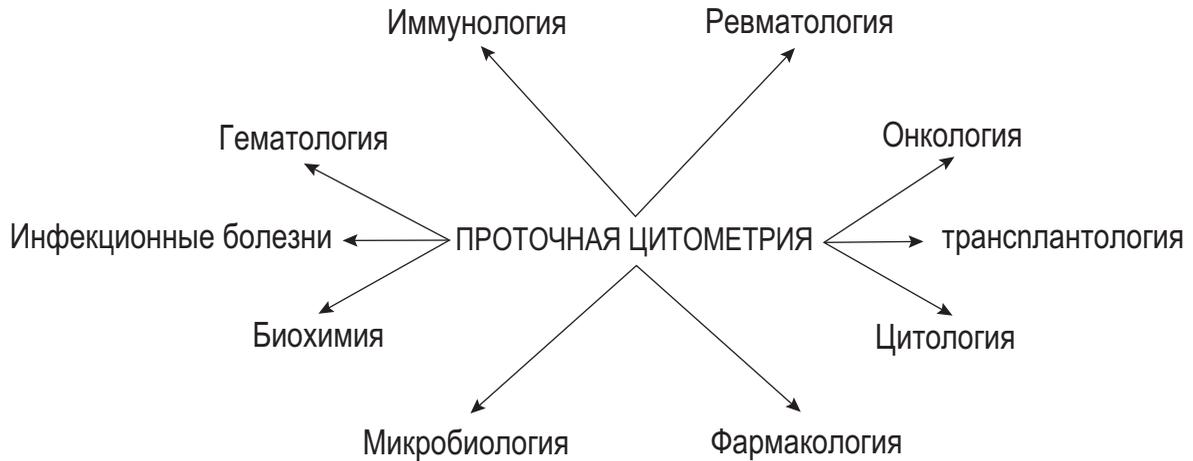


Рис. 7. Области применения проточной цитометрии

лить его применению в онкоиммунологических исследованиях.

### ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ В ИММУНОДИАГНОСТИКЕ

В настоящее время с помощью проточной цитофлуориметрии производится оценка пролиферативной активности лимфоцитов, необходимая для анализа иммунного статуса онкологических больных. Для определения состояния иммунитета необходимо количественное измерение продукции в организме внеклеточных и внутриклеточных цитокинов. Этот процесс осуществляется за счёт связывания конкретных цитокинов с моноклональными антителами: на проточном цитометре отражается интенсивность свечения частиц, коррелирующая с количеством искомого цитокина. Стимуляция цитокинов *in vitro* даёт возможность судить о функциональной активности тех или иных иммунокомпонентных клеток [5, 10, 12, 17]. Цитометрический анализ также позволяет исследовать различные параметры фагоцитарных клеток иммунной системы: он определяет не только поверхностные рецепторные молекулы фагоцитов, но их функциональную активность на этапе самого процесса фагоцитоза. Помимо этого, описываемый метод позволяет изучать активационный апоптоз лимфоцитов. С помощью флуоресцентного красителя PI выявляются гиподиплоидные клетки и анализируется количество клеток с утраченной частью ДНК. С клинической точки зрения исследование уровня апоптоза играет важную роль при оценке иммунного статуса пациента, поскольку апоптоз является одной из форм ответа лимфоцитов на патогенный стимул [5, 9]. Цитоме-

трический анализ может применяться также при исследовании функциональной активности естественных киллерных клеток, осуществляемой по экспрессируемым маркерам или же за счёт меченых радионуклидов. Во втором случае цитофлуориметрический анализ показывает высокую степень корреляции с радиоизотопным тестом оценки функциональной активности естественных киллерных клеток [9, 19]. Отдельно стоит выделить роль проточной цитометрии в иммунофенотипировании лимфоцитов. Основой для данного исследования является взаимодействие моноклональных антител, связанных флуоресцентной меткой. По интенсивности свечения анализируемых клеток иммунной системы определяется выраженность конкретного антигена на поверхности клеточной мембраны [5, 20, 21]. Подобные исследования с применением проточной цитометрии позволяют проводить мониторинг иммунной системы онкологических пациентов, оценивать их противоопухолевый ответ и на основе полученных данных определять стратегию лечения.

### ВЫВОД

На примере вышеописанных данных можно убедиться, что возможности проточной цитофлуориметрии достаточно обширны. При наличии подходящих друг к другу моноклональных антител и флуорохромов можно определить не только концентрацию иммунокомпонентных клеток крови, но и факторы апоптоза и некротических образований, что имеет большое значение в иммунодиагностике онкологических больных. Проточная цитометрия — уникальная методика ла-

бораторной диагностики в биологии и медицине, которая, по нашему мнению, уже в ближайшем будущем займёт место среди передовых технологий наиболее точного клеточного и молекулярного анализа.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность сотрудникам научного отдела онкоиммунологии НМИЦ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова МЗ РФ за предоставленную информацию по основам метода проточной цитометрии и его использованию в лабораторной и клинической диагностике.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Балдуева И.А., Моисеенко В.М., Данилова А.Б., Данилов А.О., Нехаева Т.Л., Георгиев Г.П., Гнучев Н.В., Ларин С.С., Киселёв С.Л. Клеточные технологии в терапии злокачественных опухолей. *Росс. иммун. журнал.* 2008; 2(11), 2–3: 303–4.
2. Балдуева И.А., Нехаева Т.Л., Новик А.В., Данилова А.Б., Авдонкина Н.А., Емельянова Н.В. Дендритноклеточные вакцины в иммунотерапии солидных опухолей: учебное пособие для врачей и обучающихся в системе высшего и дополнительного профессионального образования. М.: НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова; 2019: 130.
3. Битанова Е.Ж., Тарабаева А.С. Проточная цитометрия — преимущества метода и области применения. *Вестник КазНМУ.* 2012; 4: 465–7.
4. Кисиличина Д.Г., Луговская С.А., Наумова Е.В., Почтарь М.Е., Никитин Е.А. Прогностическое значение оценки минимальной резидуальной болезни методом проточной цитофлюориметрии во время проведения терапии хронического лимфолейкоза. *Российский иммунологический журнал.* 2013; 7(16), 2–3: 345.
5. Мазуров Д.В., Дамбаева С.В., Климова С.В., Бахус Г.О., Ярилин А.А., Пинегин Б.В. Применение проточной цитометрии в иммунодиагностике. *Медицинская иммунология.* 2002; 4(4–5): 507–14.
6. Моисеенко В.М., Волков Н.М. История иммунотерапии рака. *Практическая онкология.* 2016; 17(2): 53–61.
7. Нехаева Т.Л. Оптимизация технологии и стандартизация получения противоопухолевых вакцин на основе аутологичных дендритных клеток. Автореферат диссертации на соискание учёной степени кандидата медицинских наук. 2014.
8. Николаева Т.Г., Добрынин Я.В., Басов Б.Н., Чиквашвили Б.М., Воротников И.К., Летягин В.П. Проточная ДНК-цитометрия в прогнозировании течения рака молочной железы. 1994.

9. Солнцева О.С., Калинина Н.М., Сысоев К.А., Калашникова А.А. Методические подходы к оценке синтеза цитокинов с использованием проточной цитометрии. М.: НИО клинической иммунологии Всероссийского центра экстренной и радиационной медицины МЧС России. 2000; 2(1): 97–9.
10. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Проточная цитометрия как современный метод анализа в биологии и медицине. СПб Институт Биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, М.: Медицинская иммунология. 2007; 9(4–5): 373–8.
11. Шмагель К.В., Черешнёв В.А. Клетки врождённого иммунитета. М.: ГОУ ВПО ПГМА им. акад. Е.А. Вагнера. 2011: 242.
12. Banchereau J., and Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998; 392: 245–52.
13. Hed J., Hallden G., Johansson S.G., Larsson P. The use of fluorescence quenching in flow cytofluorometry to measure the attachment and ingestion phases in phagocytosis in peripheral blood without prior cell separation. *J Immunol Methods.* 1987; 101(1): 119–25.
14. Hume D.A., Weidemann M.J. Mitogenic Lymphocyte Transformation. Elsevier. 1980.
15. Jackson A, Warner N. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: *Manual of Clinical Laboratory Immunology.* 3<sup>rd</sup> ed. Washington DC: American Society for Microbiology. 1986: 226–35.
16. Jackson A. Basic phenotyping of lymphocytes: Selection and testing of agents and interpretation of data. *Clin. Immunol. Newslett.* 1990; 10: 43–55.
17. Janeway Ch. Immunobiology 5E: The immune system in health and disease. Garland Publishing. 2001: 307–9.
18. Jung T., Schauer U. et al. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J. Immunol. Meth.* 1993; 159: 197–207.
19. Kaplan D.H., Shankaran V., Dighe A.S., Stockert E., Aguet M., Old L.J., Schreiber R.D. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(13): 7556–61.
20. Redelman-Sidi G., Glickman M.S., Bochner B.H. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer— a current perspective. *Nat Rev Urol.* 2014; 11(3): 153–162.
21. Shankaran V., Ikeda H., Bruce A.T., White J.M., Swanson P.E., Old L.J., Schreiber R.D. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 2001; 410(6832): 1107–11.

### REFERENCES:

1. Balueva I.A., Moiseenko V.M., Danilova A.B., Danilov A.O., Nekhaeva T.L., Georgiev G.P., Gnuchev

- N.V., Larin S.S., Kiselyov S.L. Kletochnye tekhnologii v terapii zlokachestvennyh opuholej. [Cellular technologies in the treatment of malignant tumors]. *Russ. immun. zhurnal.* 2008; 2(11), 2–3: 303–4. (In Russian).
- Baldueva I.A., Nekhaeva T.L., Novik A.V., Danilova A.B., Avdonkina N.A., Emel'yanova N.V. Dendritnokletochnye vakciny v immunoterapii solidnyh opuholej: uchebnoe posobie dlya vrachej i obuchayushchihya v sisteme vysshego i dopolnitel'nogo professional'nogo obrazovaniya. [Dendritic cell vaccines in immunotherapy of solid tumors: a training manual for doctors and students in the system of higher and additional professional education]. M.: NMIC onkologii im. N.N. Petrova; 2019: 130. (In Russian).
  - Bitanova E.ZH., Tarabaeva A.S. Protochnaya citometriya — preimushchestva metoda i oblasti primeniya. [Flow cytometry — the advantages of the method and scope]. *Vestnik KazNMU.* 2012; 4: 465–7. (In Russian).
  - Kisilichina D.G., Lugovskaya S.A., Naumova E.V., Pochtar' M.E., Nikitin E.A. Prognosticheskoe znachenie ocenki minimal'noj rezidual'noj bolezni metodom protochnoj citofluorimetrii vo vremya provedeniya terapii hronicheskogo limfolejkoza. [The prognostic value of assessing the minimum residual disease by flow cytometry during the treatment of chronic lymphocytic leukemia]. *Rossiyskij immunologicheskij zhurnal.* 2013; 7(16), 2–3: 345. (In Russian).
  - Mazurov D.V., Dambaeva S.V., Klimova S.V., Bahus G.O., YArilin A.A., Pinegin B.V. Primenenie protochnoj citometrii v immunodiagnostike. [The use of flow cytometry in immunodiagnosics]. *Medicinskaya immunologiya.* 2002; 4(4–5): 507–14. (In Russian).
  - Moiseenko V.M., Volkov N.M. Istoriya immunoterapii raka. [History of cancer immunotherapy]. *Prakticheskaya onkologiya.* 2016; 17(2): 53–61. (In Russian).
  - Nekhaeva T.L. Optimizatsiya tekhnologii i standartizatsiya polucheniya protivopuholevyh vakcin na osnove autologichnyh dendritnyh kletok. [Optimization of technology and standardization of the production of antitumor vaccines based on autologous dendritic cells]. Avtoreferat dissertatsii na soiskanie uchyonoy stepeni kandidata medicinskih nauk. 2014. (In Russian).
  - Nikolaeva T.G., Dobrynin YA.V., Basov B.N., CHikvashvili B.M., Vorotnikov I.K., Letyagin V.P. Protochnaya DNK-citometriya v prognozirovaniy tekheniya raka molochnoj zhelezy. [Flow DNA cytometry in predicting the course of breast cancer]. 1994. (In Russian).
  - Solnceva O.S., Kalinina N.M., Sysoev K.A., Kalashnikova A.A. Metodicheskie podhody k ocenke sin-teza citokinov s ispol'zovaniem protochnoj citometrii. [Methodological approaches to the assessment of cytokine synthesis using flow cytometry]. M.: NIO klinicheskoy immunologii Vserossiyskogo centra ekstrennoj i radiacionnoj mediciny MCHS Rossii. 2000; 2(1): 97–9. (In Russian).
  - Hajdukov S.V., Zurochka A.V. Protochnaya citometriya kak sovremennyy metod analiza v biologii i medicine. [Flow cytometry as a modern method of analysis in biology and medicine]. SPb Institut Bioorganicheskoy himii im. akad. M.M. SHemyakina i YU.A. Ovchinnikova RAN, M.: Medicinskaya immunologiya. 2007; 9(4–5): 373–8. (In Russian).
  - SHmagel' K.V., Cheresnyov V.A. Kletki vrozhdyonnogo immuniteta. [The cells of innate immunity]. M.: GOU VPO PGMA im. akad. E.A. Vagnera. 2011: 242. (In Russian).
  - Banchereau J., and Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998; 392: 245–52.
  - Hed J., Hallden G., Johansson S.G., Larsson P. The use of fluorescence quenching in flow cytofluorometry to measure the attachment and ingestion phases in phagocytosis in peripheral blood without prior cell separation. *J Immunol Methods.* 1987; 101(1): 119–25.
  - Hume D.A., Weidemann M.J. Mitogenic Lymphocyte Transformation. Elsevier. 1980.
  - Jackon A, Warner N. Preparation, staining, and analysis be flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: *Manual of Clinical Laboratory Immunology.* 3<sup>rd</sup> ed. Washington DC: American Society for Microbiology. 1986: 226–35.
  - Jackson A. Basic phenotyping of lymphocytes: Selection and testing of agents and interpretation of data. *Clin. Immunol. Newslett.* 1990; 10: 43–55.
  - Janeway Ch. Immunobiology 5E: The immune system in health and disease. Garland Publising. 2001: 307–9.
  - Jung T., Schauer U. et al. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J. Immunol. Meth.* 1993; 159: 197–207.
  - Kaplan D.H., Shankaran V., Dighe A.S., Stockert E., Aguet M., Old L.J., Schreiber R.D. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(13): 7556–61.
  - Redelman-Sidi G., Glickman M.S., Bochner B.H. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer— a current perspective. *Nat Rev Urol.* 2014; 11(3): 153–162.
  - Shankaran V., Ikeda H., Bruce A.T., White J.M., Swanson P.E., Old L.J., Schreiber R.D. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 2001; 410(6832): 1107–11.