

УДК 616-006

DOI: 10.35693/2500-1388-2022-7-4-269-274

Новообразованные (третичные) лимфоидные структуры при опухолевом росте

Р.А. Рустамханов¹, Ш.Р. Кзыргалин¹, Д.Т. Арыбжанов², К.Ш. Ганцев¹, Д.С. Турсуметов¹, Ш.Х. Ганцев¹¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России (Уфа, Россия)²Южно-Казахстанская медицинская академия (Шымкент, Республика Казахстан)

Аннотация

Цель – воспроизвести третичные лимфоидные структуры и изучить их особенности при злокачественном новообразовании в эксперименте.

Материал и методы. Исследование было проведено на белых крысах – самцах стрессоустойчивой линии вистар, которым была проведена перевивка опухолевого штамма саркома М1. С использованием методов микрохирургического препарирования, цветной лимфографии и ультразвуковой сонолипострукции были выделены лимфатические узлы: лимфоузлы без метастатического поражения (в нормальной анатомии описываются как вторичные), лимфоузлы с метастазами саркомы М1 и вновь образованные (внеутробные, или третичные). Лимфатические узлы исследовались макроскопически, проведены микроморфометрические исследования, определены гистологические и иммуногистохимические признаки третичных лимфатических узлов. В результате полученных данных был проведен статистический анализ.

Результаты. В аксиллярной области с правой стороны у 60% крыс кроме вторичных лимфоузлов, описанных «в норме», со стороны опухоли были обнаружены третичные лимфатические узлы. Их расположение было рядом с гистологически верифицированным метастатическим лимфоузлом. В результате исследования основных структурно-функциональных зон третичных лимфатических узлов выявили некоторые различия: увеличение ширины краевых синусов; уменьшение числа лимфоидных фолликулов; увеличение средней суммарной площади кровеносных сосудов на 92% по отношению к лимфоузлам с метастазами и на 78% по отношению к вторичным лимфатическим узлам. По маркерам CD3, CD4, CD20, CD30 были выявлены достоверно значимые различия.

Заключение. Проведенное экспериментальное исследование доказало возможность воспроизведения третичных лимфоидных узлов в эксперименте при злокачественном росте и выявило ряд признаков третичных лимфатических узлов.

Ключевые слова: экспериментальное исследование, третичные лимфатические узлы, неоплазматический лимфоцитоз, саркома М1.

Конфликт интересов: не заявлен.

Для цитирования:

Рустамханов Р.А., Кзыргалин Ш.Р., Арыбжанов Д.Т., Ганцев К.Ш., Турсуметов Д.С., Ганцев Ш.Х. Новообразованные (третичные) лимфоидные структуры при опухолевом росте. *Наука и инновации в медицине*. 2022;7(4):269-274. doi: 10.35693/2500-1388-2022-7-4-269-274

Сведения об авторах

Рустамханов Р.А. – ассистент кафедры онкологии с курсами онкологии и патологической анатомии. ORCID: 0000-0002-0355-1399

E-mail: weather86@mail.ru

Кзыргалин Ш.Р. – канд. мед. наук, доцент кафедры онкологии с курсами онкологии и патологической анатомии. ORCID: 0000-0001-9721-108X

E-mail: ufa.shamil@gmail.com

Арыбжанов Д.Т. – канд. мед. наук, профессор, доцент кафедры хирургических дисциплин. ORCID: 0000-0002-0237-9064

E-mail: davran_a@mail.ru

Ганцев К.Ш. – д-р мед. наук, профессор кафедры онкологии с курсами онкологии и патологической анатомии. ORCID: 0000-0002-7562-5684

E-mail: gantseff@mail.ru

Турсуметов Д.С. – канд. мед. наук, доцент кафедры онкологии с курсами онкологии и патологической анатомии. ORCID: 0000-0003-4069-6594

E-mail: ufa.davlat@gmail.com

Ганцев Ш.Х. – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой онкологии с курсами онкологии и патологической анатомии. ORCID: 0000-0003-2047-963X

E-mail: prfg@mail.ru

Автор для переписки

Рустамханов Расул Айдарович

Адрес: Башкирский государственный медицинский университет, ул. Ленина, 3, г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия. 450008.

E-mail: weather86@mail.ru

ВЛО – вторичный лимфоидный орган; ТЛС – третичная лимфоидная структура; ТЛУ – третичный лимфоузел; ЛУ – лимфатический узел; ВЛУ – вторичный лимфатический узел.

Рукопись получена: 16.10.2022

Рецензия получена: 10.11.2022

Решение о публикации принято: 11.11.2022

Newly formatted (tertiary) lymphoid structures in tumor growth

Rasul A. Rustamkhanov¹, Shamil R. Kzyrgalin¹, Dauranbek T. Arybzhonov², Kamil Sh. Gantsev¹, Davlat S. Tursumetov¹, Shamil Kh. Gantsev¹¹Bashkir State Medical University (Ufa, Russia)²South Kazakhstan Medical Academy (Shymkent, the Republic of Kazakhstan)

Abstract

Aim – to reproduce tertiary lymphoid structures and study their features in a malignant neoplasm in the experiment.

Material and methods. Male white rats of the Wistar stress-resistant line were inoculated with the tumor strain sarcoma M1. Using the methods of microsurgical preparation, color lymphography and ultrasonic sonolipodestruction we isolated the lymph nodes without metastatic lesions (described as secondary in normal anatomy), the lymph nodes with metastases of M1 sarcoma, and the newly formed nodes (extrauterine or tertiary). Lymph nodes were examined macroscopically, micromorphometric studies were performed, histological and

immunohistochemical signs of tertiary lymph nodes were determined. The obtained data were subjected to statistical analysis.

Results. In 60% of rats, in the right axillary region, in addition to the secondary lymph nodes described in normal anatomy, the tertiary lymph nodes were found on the side of the tumor. They were located near the histologically verified metastatic lymph node. The studied parameters of the main structural and functional zones of the tertiary lymph nodes had the following features: the enlarged marginal sinuses; a fewer number of lymphoid follicles; the average total area of blood vessels increased by 92% in relation to the metastatic lymph nodes and by 78% in relation to the secondary lymph nodes. The significant differences were registered with CD3, CD4, CD20, CD30 markers.

Объектом исследования являлись третичные лимфоузлы (ТЛУ), индуцированные опухолевым ростом перевивной саркомы М1. Для сравнительного анализа был произведен забор лимфоузлов без метастатического поражения (вторичных) и метастатических лимфоузлов с метастазами саркомы М1.

На 16-е сутки животных выводили из эксперимента путем внутрибрюшинного введения ксилазина гидрохлорида 2% в летальной дозе 1 мл.

В последующем три группы лимфоузлов были исследованы макро- и микроморфометрическим, гистологическим и иммуногистохимическим методами.

Зону подмышечных лимфатических узлов обрабатывали ультразвуковым сонлиподеструктором. Выделение лимфатических узлов и сосудов из тканей подмышечной области производилось с помощью ультразвукового аппарата LySonix 3000® с PulseSelect™ методом, разработанным профессором Ш.Х. Ганцевым (патент №2333776 от 20.09.2008).

После обработки выделенные лимфоузлы измеряли по взаимно перпендикулярным осям X – длина, Y – ширина, Z – высота. Расположение лимфатического узла – параллельно оси X в наибольшем измерении.

Лимфатические узлы (ЛУ) фиксировали в 10% растворе нейтрального забуференного формалина, обрабатывали по стандартной гистологической методике и заливали в парафин. Толщина гистологических срезов 1–3 мкм.

Микроморфометрически исследовали основные структурно-функциональные зоны ЛУ: количество лимфоидных фолликулов в десяти произвольно выбранных полях зрения при увеличении микроскопа 200; среднюю суммарную площадь кровеносных сосудов (мкм²) в двадцати произвольно выбранных полях зрения при увеличении микроскопа 400; ширину промежуточного синуса и краевого синусов (мкм) в двадцати произвольно выбранных полях зрения при увеличении микроскопа 400.

Исследованию подвергались готовые оцифрованные изображения иммуногистохимической экспрессии фиксированной панели антител CD3 (Т-лимфоциты), CD4 (Т-хелперы/индукторы), CD20 (В-лимфоциты), CD30 (активированные лимфоциты), CD68 (все макрофаги).

Для анализа результатов иммуногистохимической экспрессии проводили подсчет положительно окрашенных клеток на 2000 клеток в десяти случайным образом отобранных полях зрения (при увеличении $\times 40$). Учитывали умеренное и выраженное иммуногистохимическое окрашивание. Сравнительное исследование проводили в следующих группах: (1) метастатические лимфоузлы с метастазами саркомы М1, (2) вторичные лимфоузлы (без метастатического поражения), (3) третичные лимфоузлы (без метастатического поражения).

Положительно окрашенные клетки считали по основным структурно-функциональным зонам лимфоузлов, по каждому маркеру в отдельности: кортикальный синус, промежуточный синус, паракортикальная зона, лимфоидные фолликулы.

В работе использовались антитела, согласно протоколу компании-изготовителя Leica, подходящие для исследования на крысах. Все реакции были проведены при наличии позитивного контроля.

Статистический анализ данных проводили с помощью тестовых версий интегрированного пакета Statistica for Windows, опубликованных в интернете в свободном доступе. Предварительный анализ выборок и групп состоял в оценках выскакивающих значений по тесту Граббса и тестов на нормальность распределения по Колмогорову – Смирнову и Шапиро – Уилку. Также был использован тест Фишера на равенство дисперсий. Рассчитывали следующие статистические характеристики переменных: среднюю арифметическую, стандартное отклонение, ошибку средней, медиану, нижний и верхний квартили.

В зависимости от характера распределения переменных использовали как параметрические, так и непараметрические методы статистической обработки. Для переменных, соответствующих критериям нормального распределения, применяли параметрические методы, в частности, однофакторный дисперсионный анализ с расчетом критерия Фишера и множественное сравнение средних с помощью теста Тьюки. В отдельных случаях после параметрических расчетов анализ проверялся ранговыми методами для исключения возможных ошибок. В случае отсутствия условий для использования параметрических тестов применяли непараметрический (ранговый) дисперсионный анализ Краскела – Уоллиса с расчетом критерия Н и его статистической значимости (р). Для множественного сравнения средних рангов применяли метод Данна. Критический уровень статистической значимости при сравнении характеристик групп принимался за 0,05.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

После перевивки опухоль характеризовалась активным ростом, появление пальпируемого опухолевого узелка у животных наблюдали на четвертый день после введения опухолевого субстрата. К шестнадцатому дню эксперимента (срок плановой эвтаназии) объем опухоли достигал 2 см³.

Гистологическое описание саркомы М1: опухоль имеет солидно-гнездное строение с умеренным клеточным полиморфизмом, со смещением ядерно-цитоплазматического отношения в сторону ядра; с ярко выраженным полиморфизмом ядер с грубыми и хорошо заметными ядрышками; с многочисленными фигурами митозов, в том числе патологическими.

При детальном исследовании опухоли саркомы М1 были выявлены ее отличия от саркомы, которую описывали ученые в 1947 году. Как показали экспериментаторы Л.М. Шабад и М.М. Блох, впервые описавшие новый перевиваемый штамм саркомы крыс М1 в 1947 году, опухоль состояла из разнообразных по форме и величине соединительнотканых клеток, переплетающихся в разных направлениях. Размеры и форма ядер клеток варьировали в зависимости от размера и формы опухолевых клеток. Ядра крупные,

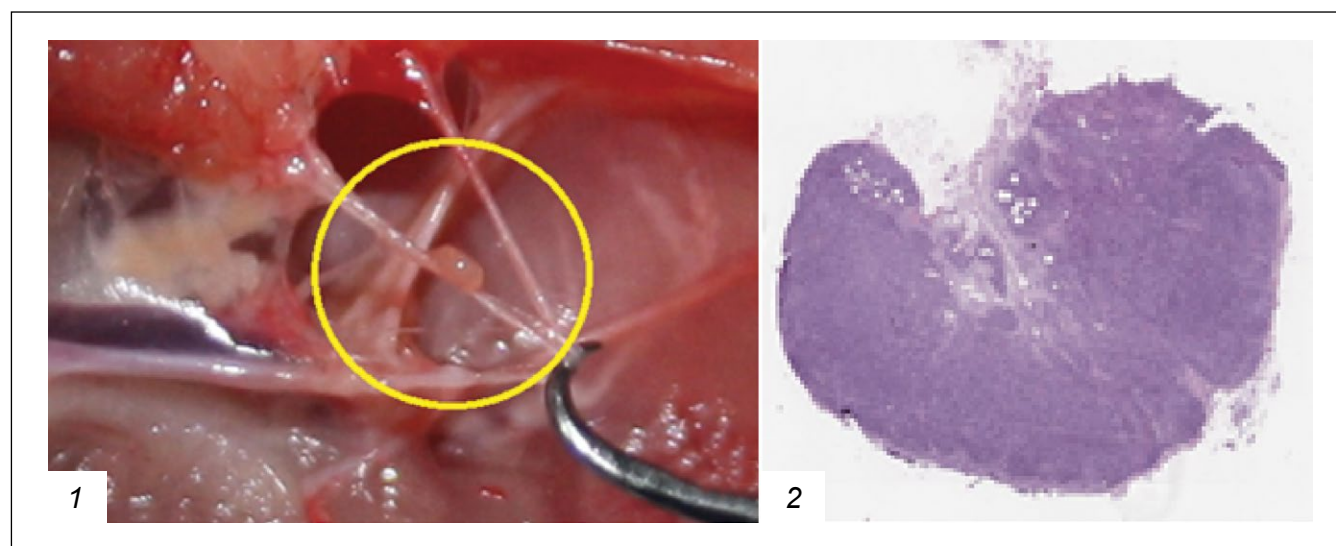


Рисунок 1. Данные исследования, третичный лимфоузел: 1 – макроскопическое строение, масштабный маркер – 3 мм; 2 – гистологическое строение, окраска гематоксилином и эозином, $\times 50$.

Figure 1. Study data, tertiary lymph node: 1 – macroscopic structure, scale marker – 3 mm; 2 – histological structure, staining with hematoxylin and eosin, $\times 50$.

расположены эксцентрично, хроматин в них собран в виде крупных гиперхромных скоплений, которые подчас маскировали ядрышки. Цитоплазма опухолевых клеток отличалась значительной базофилией. Для более детального изучения полученного образца саркомы М1 и оценки потенциала метастазирования мы использовали маркер E-cadherin, который показал фоновое цитоплазматическое окрашивание, что указывало на слабые межклеточные контакты и потенциально высокий риск метастазирования. Также проведена окраска опухоли на наличие виментина, являющегося структурным протеином промежуточных филаментов соединительных тканей, высокая концентрация которого была обнаружена. Таким образом, интенсивная цитоплазматическая экспрессия виментина в опухоли показывает повышенную способность к метастазированию и является показателем особой злокачественности.

Макроморфометрическая характеристика вторичных, метастатических и ТЛУ: подмышечные ЛУ животных в большинстве своем имели бобовидную и овоидную форму, также присутствовали ЛУ округлой формы меньшего и большего диаметра. Количество подмышечных ЛУ варьировало от 3 до 5 в зависимости от наличия или отсутствия процессов метастазирования и неоплиомогенеза.

Вторичные лимфатические узлы (ВЛУ) без очагов метастазирования имели бобовидную форму, несколько приносящих (афферентных) лимфатических сосудов и один выносящий (эфферентный) сосуд. Количество приносящих в лимфатический узел афферентных лимфатических сосудов превышало количество эфферентных лимфатических сосудов в соотношении 3:1, 4:1 и 5:1, что и является общепризнанной нормой.

После тщательной сонолиподеструкции подмышечных зон лабораторных животных были четко

выделены лимфатические узлы. В наибольшем измерении размер метастатических узлов был $8,4 \pm 1,3$ мм, вторичных – $5,6 \pm 0,2$ мм, третичных – $2 \pm 0,6$ мм. Предварительное введение красителя до некропии позволило зафиксировать лимфатический блок. Так, при частичном или полном «метастатическом блоке» лимфатического узла наблюдалось распространение красителя в обход блокированного узла, по коллатеральным лимфатическим сосудам. Особенностью новообразованных коллатеральных сосудов было наличие на них округлых или овальных лимфоидных образований диаметром до 2,5 мм. У 9 из 15 лабораторных животных в правой подмышечной области кроме обычных ЛУ, описанных в нормальной анатомии крыс, со стороны опухоли были обнаружены ТЛУ, они располагались вблизи гистологически верифицированного метастатического лимфатического узла (МЛУ).

ТЛУ имели достоверно меньшие размеры (**рисунок 1**) в сравнении с ЛУ, которые были расценены как неизмененные (вторичные, нативные). ТЛУ, как правило, имели округлую форму, как и МЛУ, в отличие от ВЛУ, соответствующих бобовидной форме.

Измеряли линейные размеры ЛУ в трех взаимно перпендикулярных измерениях по осям X – длина, Y – ширина, Z – высота. Ориентация узла – параллельно оси X в наибольшем измерении. Статистическая обработка полученного материала показала статистически значимые различия по всем линейным измерениям. Сравнительная морфологическая характеристика ВЛУ, МЛУ и ТЛУ лабораторных животных выполнялась по результатам анализа гистологических срезов, окрашенных гематоксилином и эозином.

Таким образом, сравнительные микроморфометрические исследования и статистический анализ полученных данных выявили, что группа ТЛУ имеет особенности строения по всем исследованным параметрам: ширине краевого и промежуточного синусов, количеству лимфоидных фолликулов и средней суммарной площади кровеносных сосудов. В частности, у ТЛУ расширены краевые синусы (как и у МЛУ); меньшее число лимфоидных фолликулов; средняя

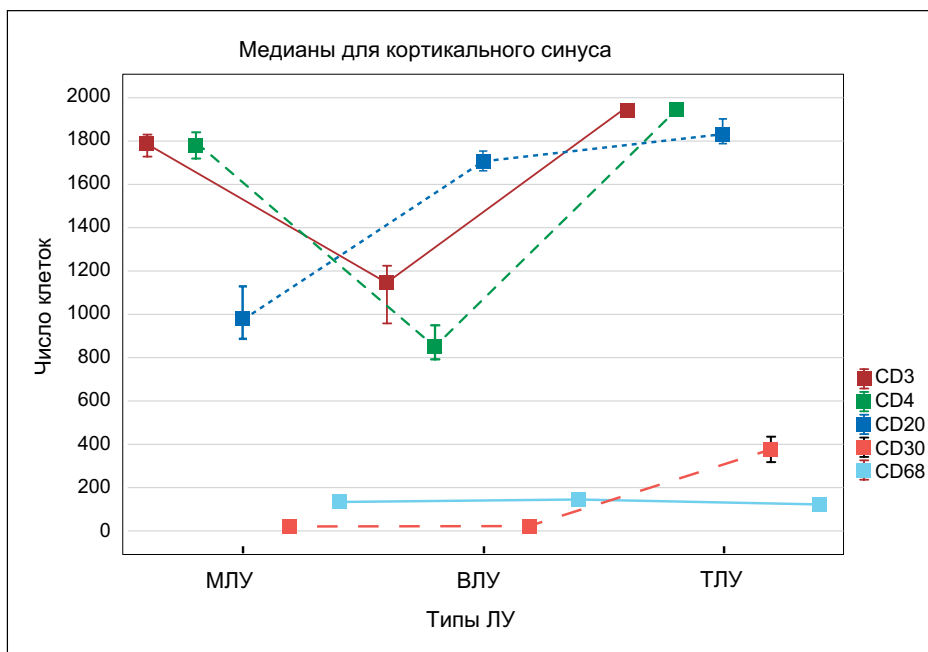


Рисунок 2. Показатели экспрессии CD3, CD4, CD20, CD30, CD68 в кортикальном синусе вторичных, метастатических и третичных лимфатических узлов.

Figure 2. Expression indices of CD3, CD4, CD20, CD30, CD68 in the cortical sinus of secondary, metastatic and tertiary lymph nodes.

суммарная площадь кровеносных сосудов выше на 92% по сравнению с МЛУ и на 78% по сравнению с ВЛУ.

Учитывая полученные результаты, можно сделать вывод о том, что ТЛУ имели все необходимые структурные составляющие лимфатических узлов с определенными особенностями, что, в свою очередь, позволяет предположить отличный функциональный статус ТЛУ от ВЛУ и МЛУ.

Результаты иммуногистохимических исследований также выявили различия в исследуемых группах лимфатических узлов. Наиболее значимые различия показателей экспрессии изученных маркеров были выявлены в кортикальном синусе лимфатических узлов, где 4 из 5 маркеров показали наивысшее число положительно окрашенных клеток с такими маркерами, как CD3, CD4, CD20, CD30 (**рисунок 2**).

Разработанная методика выделения и визуализации ТЛУ на модели перевиваемой саркомы М1 крысам с последующим проведением иммуногистохимического исследования позволила выявить ряд специфических признаков ТЛУ. Увеличение количества Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD3, в паракортикальных зонах ($p=0,0309$), что в полтора раза больше, чем в МЛУ, и максимальное по сравнению с МЛУ и ВЛУ количество CD3+ клеток в промежуточных синусах ТЛУ. Содержание Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD4, в паракортикальных зонах ТЛУ в 1,2 раза больше, чем в ВЛУ ($p=0,0168$), и в 3,1 раза больше, чем в МЛУ ($p=0,0000$). Число Т-хелперов, экспрессирующих CD4, в краевых (в 2,0 ($p=0,0000$) и в 1,1 ($p=0,038409$) раза больше соответственно) и промежуточных (в 1,1 раза ($p=0,000063$, $p=0,0022$)) синусах ТЛУ максимальное по сравнению с ВЛУ и

МЛУ. Содержание CD20+ клеток в промежуточных синусах и паракортикальных зонах минимальное по сравнению с ВЛУ и МЛУ – не более чем в два раза, и В-лимфоцитов в лимфоидных фолликулах ТЛУ больше в 2,0 раза по сравнению с МЛУ ($p=0,0332$) и в 3,8 раза по сравнению с ВЛУ ($p=0,0000$).

Максимальное по сравнению с НЛУ ($p=0,0063$) и МЛУ ($p=0,0008$) увеличение количества CD30+ клеток в краевых – в 16,0 раза и промежуточных синусах ТЛУ соответственно в 2,4 ($p=0,0118$) и в 3,2 ($p=0,0000$) раза.

Таким образом, результаты исследования и анализ дан-

ных позволяют лучше понять механизмы не только неоплазматического, но и взаимодействия лимфатической, а следовательно, и иммунной системы со злокачественной опухолью и ее метастазами.

Исходя из полученных данных, доказано, что ТЛУ имеют конкретные анатомические особенности структурной организации, что, в свою очередь, позволяет предположить отличные функциональные характеристики новообразованных лимфоидных структур. Учитывая многочисленные публикации, сообщающие о положительных иммунных реакциях и увеличении продолжительности жизни при наличии новообразованных лимфоидных структур у пациентов со злокачественными новообразованиями разных локализаций, можно сделать вывод о высокой противоопухолевой активности ТЛУ.

■ ОБСУЖДЕНИЕ

Впервые выявлен высокий метастатический потенциал саркомы М1, включая лимфогенное метастазирование, в эксперименте на крысах линии вистар, визуализированы опухолевые клетки в пораженных метастазами лимфоузлах. Впервые выявлены морфологические особенности строения ТЛУ: меньший объем их коркового вещества, меньшее количество лимфоидных фолликулов и усиленное кровоснабжение. Средняя суммарная площадь кровеносных сосудов ТЛУ на 78% больше по сравнению с ВЛУ и на 92% больше по сравнению с МЛУ. Образующиеся при подкожной перевивке саркомы М1 ТЛУ имеют специфические иммуногистохимические признаки, заключающиеся в максимальной экспрессии маркеров CD3+, CD4+ и CD30+ клеток. В краевых синусах ТЛУ отмечается максимальное содержание CD4+ клеток (резко выраженная реакция) и 16-кратное увеличение по сравнению с другими группами лимфатических узлов числа CD30+ клеток (слабо выраженная реакция). Паракортикальные зоны ТЛУ содержат в среднем в 1,65 раза больше ($p=0,0309$)

CD3+ клеток (резко выраженная реакция) и в 1,2 ($p=0,0168$) и 3,1 ($p=0,0000$) раза больше по сравнению с ВЛУ и МЛУ CD4+ клеток (резко выраженная реакция). Промежуточные синусы ТЛУ характеризуются максимальной экспрессией маркеров CD3+ и CD4+ (резко выраженная реакция), а также CD30+ клеток (слабо выраженная реакция). В лимфоидных фолликулах ТЛУ CD3+, CD30+ клетки показывают предельно высокие значения.

Полученные в данном исследовании результаты соотносятся с работами ученых, занимающихся изучением функционального и прогностического статуса третичных лимфоидных структур. ТЛС анатомически напоминают ВЛО, и первоначально предполагалось, что их образование в значительной степени будет индуцироваться одними и теми же стимулами. Однако пулы клеток и сигналы, которые обеспечивают индукционные стимулы для образования ТЛС, по крайней мере, частично отличаются. Например, несколько наблюдений показывают, что опухолеспецифический Т- и В-клеточный иммунитет может индуцировать

некоторые молекулярные факторы, необходимые для образования и поддержания ТЛС, а гетерогенность этих драйверов может приводить к различным состояниям ТЛС [14].

■ ВЫВОДЫ

1. Проведенное исследование доказывает возможность воспроизведения третичных лимфатических узлов на модели экспериментальных животных с использованием перевивной саркомы М1.

2. Впервые выявлены анатомические особенности новообразованных лимфатических узлов в эксперименте.

3. По результатам морфометрических и иммуногистохимических исследований выявлены специфические характеристики ТЛУ, что может говорить о высоком противоопухолевом потенциале новообразованных структур. ■

Конфликт интересов: все авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Sautès-Fridman C, Cherfils-Vicini J, Damotte D, et al. Tumor microenvironment is multifaceted. *Cancer Metastasis Rev.* 2011;30(1):13-25. doi: 10.1007/s10555-011-9279-y
2. Maman S, Witz IP. A history of exploring cancer in context. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(6):359-376. doi: 10.1038/s41568-018-0006-7
3. Drayton DL, Liao S, Mounzer RH, Ruddle NH. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nat Immunol.* 2006;7(4):344-353. doi: 10.1038/ni1330
4. Dieu-Nosjean MC, Giraldo NA, Kaplon H, et al. Tertiary lymphoid structures, drivers of the anti-tumor responses in human cancers. *Immunol Rev.* 2016;271(1):260-275. doi: 10.1111/imr.12405
5. Gantsev Sh, Gantsev K, Kzyrgalin Sh. *Atlas of Lymphatic System in Cancer.* Springer Cham, 2020. doi: 10.1007/978-3-030-40967-8
6. Pipi E, Nayar S, Gardner DH, et al. Tertiary Lymphoid Structures: Autoimmunity Goes Local. *Front Immunol.* 2018;9:1952. Published 2018 Sep 12. doi: 10.3389/fimmu.2018.01952
7. Sautès-Fridman C, Petitprez F, Calderaro J, Fridman WH. Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2019;19(6):307-325. doi: 10.1038/s41568-019-0144-6
8. Ruddle NH. Basics of Inducible Lymphoid Organs. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2020;426:1-19. doi: 10.1007/82_2020_218
9. de Leur K, Clahsen-van Groningen MC, van den Bosch TPP, et al. Characterization of ectopic lymphoid structures in different types of acute renal allograft rejection. *Clin Exp Immunol.* 2018;192(2):224-232. doi: 10.1111/cei.13099
10. Sautès-Fridman C, Lawand M, Giraldo NA, et al. Tertiary Lymphoid Structures in Cancers: Prognostic Value, Regulation, and Manipulation for Therapeutic Intervention. *Front Immunol.* 2016;7:407. doi: 10.3389/fimmu.2016.00407
11. Goc J, Fridman W-H, Sautès-Fridman C, Dieu-Nosjean M-C. Characteristics of tertiary lymphoid structures in primary cancers. *Oncol Immunology.* 2013;2:12. doi: 10.4161/onci.26836
12. Helmink BA, Reddy SM, Gao J, et al. B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. *Nature.* 2020;577(7791):549-555. doi: 10.1038/s41586-019-1922-8
13. Petitprez F, de Reyniès A, Keung E.Z, et al. B cells are associated with survival and immunotherapy response in sarcoma. *Nature.* 2020;577:556-560. doi: 10.1038/s41586-019-1906-8
14. Schumacher TN, Thommen DS. Tertiary lymphoid structures in cancer. *Science.* 2022;375(6576):eabf9419. doi: 10.1126/science.abf9419