ИММУНИТЕТ И ТЕРАПИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ

А.И. Агеенко, С.П. Гордиенко,
О.Г. Саканделидзе

КИШИНЕВ „ШТИИНЦА" 1982

А. И. АГЕЕНКО, С. П. ГОРДИЕНКО
О. Г. САКАНДЕЛИДЗЕ

ИММУНИТЕТ И ТЕРАПИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ

КИШИНЕВ «ШТИИНЦА» 1982

616.006.0
A 23
55.6
A 23

V 161635

ADTI
AXB.-RESURS MARKAZI
№ 1991

БИБЛИОТЕКА
Государственного
медицинского института
гор. Андижан

Работу рекомендовали к печати рецензенты
доктор медицинских наук профессор *Г. Г. Автандилов*,
член-корреспондент АН СССР *Л. А. Пирузян*

УДК 616—004.06+616.988.6—085.371

Агеенко А. И., Гордиенко С. П., Саканделидзе О. Г. **Иммунитет и терапия экспериментальных опухолей.** Кишинев, «Штиинца», 1982, 312 с. с рис. Библиогр.: 294—308 с.

В монографии освещены механизмы взаимодействия опухолеродных вирусов и клеток организма на молекулярном уровне, генетические изменения при этом взаимодействии. Изложены иммунологические аспекты вирусного канцерогенеза, дана роль клеточных и гуморальных факторов противоопухолевого иммунитета в данном процессе. Особое внимание уделено современному состоянию терапии экспериментальных опухолей и ее влиянию на иммунитет организма-носителя опухоли. Рассмотрены феномены синергизма и антагонизма химиотерапии и иммунной реакции хозяина. Описаны новые противоопухолевые лекарственные средства, извлеченные из морских организмов.

Книга предназначена для онкологов, вирусологов, иммунологов, генетиков и биологов.

616.006.04+616.013.2

Ageenko A. I., Gordienko S. P., Sakandelidze O. G. **Immunology and therapy of experimental tumors.**

One of the most complicated and current problems of modern biology and medicine is the problem of cancer. The book elucidates the theory of viral etiology of malignant disease and modern viral-genetic conception of cancer. The main task of the book is the analysis of specific and non-specific immunity in patients with different forms of tumors both before and after therapeutic measures. Study of the immunity state in sarcomatous patients has shown that the application of diverse therapeutic methods leads to certain shifts in the immune status on the account of which control over immunological reactions of the tumor-carrier in response to the therapy applied is of great practical importance.

This is one of the first books which generalizes world literature and the authors' own research on the burning problems of cancer virology, immunology, chemotherapy, immunotherapy and other methods of treatment.

This work is intended for oncologists, immunologists, biologists.

$A\frac{51300—101}{M755(12)—82}$-102.82.4116000000

© Издательство «Штиинца», 1982 г.

ВВЕДЕНИЕ

Иммунология сегодня — это стремительно развивающаяся самостоятельная медико-биологическая наука со своими методами исследований, морфологическим субстратом (лимфоидная ткань), законами, проблемами и разнообразными практическими приложениями.

Понятие *иммунитет* в последние годы значительно расширилось. В настоящее время оно включает не только представления о невосприимчивости к инфекционным заболеваниям, но и способность организма распознавать любые генетически чужеродные для него антигены[1] клеток, тканей, в том числе болезнетворных микроорганизмов, и отторгать (элиминировать) их с помощью тех или иных иммунологических реакций. Наиболее всесторонне и полно эти положения были сформулированы в концепции иммунологического надзора, созданной Бернетом в середине 60-х гг. (Burnet, 1970).

Иммунология как наука, возникнув на базе инфекционной патологии, в последние годы не только проникла в разные области неинфекционной патологии (иммунология рака, аутоиммунные заболевания и т. д.), но также стала прочным фундаментом совершенно других областей биологии и медицины, образовав новые разделы иммунологии — иммуногенетику, трансплантационную иммунологию, иммуноморфологию, иммунологию эмбриогенеза, размножения, беременности и т. д.

Естественно, что такая эволюция привела к открытию принципиально новых фактов и закономерностей и потребовала переосмыслить традиционные представления инфекционной иммунологии, согласно которым иммунологические механизмы рассматривались только как защитные. Теперь для решения основных задач неинфекционной иммунологии, в основе которой в большинстве случаев лежит иммунологический конфликт, а также при

[1] Антигены — вещества, несущие признаки генетически чужеродной информации и при введении в организм вызывающие развитие специфических иммунологических реакций.

изучении различных физиологических процессов (размножение, эмбриогенез, старение, беременность и т. д.) необходим иной подход для объяснения иммунологических механизмов и использования методических приемов. Особенно это относится к разделу иммунологии рака, который в последние годы привлекает пристальное внимание исследователей. О первостепенной важности и острой актуальности проблемы прежде всего свидетельствует бурная эволюция взглядов на роль и участие иммунокомпетентной системы в канцерогенезе.

Основной вклад в изучение иммунологии рака был сделан коллективом ИМЭ им. Н. Ф. Гамалеи и МНИОИ им. П. А. Герцена, руководимым Л. А. Зильбером. В возглавляемых им лабораториях начиная с 1948 г. с помощью различных методов (реакция анафилаксии с десенсибилизацией, преципитация в геле, флюоресцирующие антитела, реакция связывания комплемента — РСК — и т. д.) было показано, что опухоли животных и человека (спонтанные, первично индуцированные канцерогенами и вирусами и перевиваемые) содержат антиген или антигены, отсутствующие в тканях нормального организма (Зильбер, 1968). Антигенные изменения структуры опухолевых клеток связаны с внесением дополнительной генетической информации опухолеродными вирусами и с наличием тканевых невирусных опухолеассоциированных антигенов. Организм, как это твердо установлено, не остается безучастным даже к минимальным антигенным изменениям, возникающим при опухолевой трансформации клеток, и отвечает на них иммунологической реакцией. Наличие гуморального и клеточного иммунного ответа на растущую опухоль было достоверно обосновано многочисленными исследованиями, в которых использовались различные высокочувствительные методы, а именно: всевозможные модификации трансплантационного и цитотоксического тестов, угнетение роста колоний опухолевых клеток, РСК, перенос антител и лимфоидных клеток опухоленосителей сингенным реципиентам и т. д. (Зильбер, 1968; Агеенко, 1969, 1974, 1975, 1978; Радзиховская, 1971; Боева, Городилова, 1974, 1979; Уманский, 1974; Говалло, 1977; Грунтенко, 1977).

Особый интерес представляли исследования в аутологичной системе клеточных факторов специфического опухолевого иммунитета, главным образом определяющих судьбу трансформированных клеток в организме. Однако следует подчеркнуть, что они изучены еще недостаточно, а в некоторых же аутологичных тест-системах специфически стимулированные иммунные лимфоциты вообще не обнаружены. Возможно, это объясняется, с одной стороны, особенностями использованных тест-систем, с другой — различными сроками, при которых предпринимались попытки выявления противоопухолевого иммунитета. Вместе с тем в большинстве случаев, несмотря на присутствие в организме опухоленосителей специфических клеточных и гуморальных факторов иммунитета, опухоли прогрессивно растут. Оказалось, что это в

значительной мере обусловлено появлением в сыворотках многих опухоленосителей с быстро развивающимися новообразованиями факторов, блокирующих специфический противоопухолевый иммунитет (blocking antibody). Эти блокирующие комплексы, как их стали называть, препятствовали цитотоксическому действию иммунных лимфоцитов, направленному против аутологичных опухолевых клеток (Hellström e. a., 1971). Далее было обнаружено, что синергический цитопатогенный эффект гуморальных антител и иммунных лимфоцитов зависит от концентрации в сыворотках гуморальных антител. При высокой концентрации наблюдалось синергическое их действие, при низкой — блокирование цитотоксического воздействия лимфоцитов (Skurzak, Klein, 1972). Таким образом, исход опухолевого процесса во многом определяется динамикой накопления и количественным соотношением цитотоксических и блокирующих факторов специфического противоопухолевого иммунитета. Эффект иммунологической компетенции в этих случаях обусловливается характером (синергизмом или антагонизмом) взаимоотношений двух основных механизмов противораковой защиты. Вероятно, в большинстве систем имеется определенная последовательность иммунного ответа на опухолевые специфические антигены трансплантационного типа (tumor specific transplantation antigen — TSTA), определяющие интенсивность иммунологических реакций организма.

Организм-опухоленоситель не остается инертным по отношению к растущим, неопластически трансформированным клеткам. Однако традиционная точка зрения, согласно которой реакции иммунитета направлены только на элиминацию чужеродного, при бластоматозном процессе неадекватна. Это стало особенно очевидным после серии работ Prehn (1971, 1973, 1976), в которых был продемонстрирован двоякий эффект иммунных сингенных лимфоцитов на рост опухоли в зависимости от количественных соотношений опухоль—организм. Низкое соотношение вызывало стимуляцию роста опухоли, то есть ускорение пролиферации определенных клонов трансформированных клеток на фоне специфического иммунного ответа, в то время как соотношение выше определенного критического уровня приводило к подавлению роста опухолевых клеток. Аналогичные данные получены А. И. Агеенко и В. С. Ерховым (1977, 1978) на модели вирусного канцерогенеза. Кроме того было показано, что при некоторых условиях неиммунные, нормальные лимфоциты также ускоряли рост опухоли. Развивая это направление исследований, авторы на основании полученных экспериментальных фактов предложили новую концепцию канцерогенеза, которая представлена в монографии. Таким образом, открытие иммунологической стимуляции роста опухоли значительно усложнило анализ системы иммунологического контроля опухолевого роста. В этом аспекте особенно важно тщательно исследовать функциональные взаимоотношения между трансформированными клетками и иммунокомпетентной

системой организма в латентный (доклинический) период вирусного канцерогенеза, в период становления опухоли, а затем на последующих этапах неопластической прогрессии. Принципиально существенны работы по выяснению участия эмбриональных антигенов в противоопухолевом иммунитете, а также их роли в возникновении и прогрессии злокачественных новообразований.

Первостепенное значение приобрела задача изыскания путей для управления канцерогенезом. Вторая часть монографии посвящена различным современным подходам к терапии экспериментальных опухолей с учетом иммунологических механизмов.

Терапия онкологических больных является одной из наиболее актуальных, неразрешенных проблем современной медицины. В настоящее время злокачественные опухоли лечат хирургическим, лучевым, лекарственным и иммунологическим методами. Все большее значение приобретают сейчас химио- и иммунотерапия. Однако в подавляющем большинстве случаев эти виды лечения пока еще не могут претендовать на самостоятельность. Лечение больных злокачественными новообразованиями должно быть комбинированным, с научно обоснованным использованием всех четырех вышеназванных методов. Вместе с тем, несмотря на большое число экспериментальных и клинических исследований по химиотерапии злокачественных новообразований, до сих пор отсутствует единое мнение о целесообразности применения больших или малых доз цитостатиков.

Опыт современной химиотерапии злокачественных новообразований показал, что антибластомные лекарственные средства могут быть использованы как самостоятельно, так и в комбинации с другими методами воздействия на неопластический процесс. В то же время не всегда ясно, насколько отдаленные результаты лучевого, химического или комбинированного лечения новообразований лучше или хуже хирургического вмешательства (Бергольц, 1970).

Указанные методы терапии проанализированы с учетом последних достижений экспериментальной и клинической иммунологии. На основании результатов собственных наблюдений и анализа мировой литературы авторы полагают, что все используемые методы следует расценивать как активные факторы, вызывающие сдвиги в иммунологически установившейся к моменту лечения системе опухоль—организм. Знание и учет факторов противоопухолевого иммунитета позволяют создавать более рациональные схемы и эффективнее проводить лечение онкологических больных.

В монографии подробно изложены данные мировой литературы по использованию различных адъювантов в терапии солидных опухолей.

В заключительной главе обобщены достижения современной науки в поиске канцеролитических средств в морских организмах.

Анализ тенденций развития морской фармакологии дает основание надеяться, что в ближайшем будущем будут созданы высокоэффективные противоопухолевые средства. Подводя итоги, авторы приходят к выводу, что дальнейшее выявление биологически активных веществ цитостатического спектра действия позволяет уже говорить о том, что к имеющимся шести группам противоопухолевых препаратов можно присоединить седьмую группу веществ, полученных из гидробионтов.

В книге использована главным образом информация последних лет по общей иммунологии и иммунологии опухолей, в основном для понимания изложенного материала. Иными словами, сконцентрировав внимание на узловых аспектах, авторы не стремились к широкому обобщению и анализу всей проблемы иммунологии. Эти и более ранние сведения, в том числе в отношении антигенов нормальных клеток, в полном объеме можно получить из работ Р. В. Петрова (1976), Б. В. Брондза и О. В. Рохлина (1978), Л. Н. Фонталина и Л. А. Певницкого (1978).

Глава I

БЕЛКИ ОПУХОЛЕРОДНЫХ ВИРУСОВ И АНТИГЕНЫ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ИМИ КЛЕТОК

Открытие Mizutani, Temin (1976) и Baltimore (1970) обратных транскриптаз в составе вирионов онкорнавирусов (онкогенных РНК-содержащих вирусов) ознаменовало бурное развитие онковирусологии и иммунологии опухолей. Накопились новые факты, гипотезы и представления о роли опухолеродных вирусов в возникновении злокачественных новообразований.

Интенсивное исследование генетики РНК-содержащих онковирусов доказало наличие у них полиплоидного генома, а сравнительный анализ дефектных по трансформации или репликации вирусов сарком и лейкозов позволил обнаружить, а затем и выделить дополнительную генетическую информацию (src-специфические последовательности: онкоген — ген src) у вирусов сарком, обусловливающую трансформацию фибробластов in vitro и in vivo. Существенные успехи достигнуты в изучении механизмов транскрипции и трансляции РНК онкорнавирусов и совершенно по-новому переосмыслены представления о белках онкорнавирусов, поскольку оказалось, что с их помощью можно выяснить происхождение вирусов, их генетическое родство и эволюцию.

Открытие эндогенных вирусов привело к новому этапу в развитии вирусогенетической теории возникновения рака, сформулированной Л. А. Зильбером (1968), и потребовало пересмотреть не только проблему онкогенеза в целом, но и само происхождение онкорнавирусов. Появившиеся в последние годы более общие концепции и гипотезы (например, гипотеза вирогена Huebner и Todaro или противовируса Temin) как неотъемлемую часть включают в себя все положения и постулаты вирусогенетической теории.

Исходя из сказанного, нам представляется целесообразным наряду с описанием антигенной трансформации кратко изложить современные представления о проблеме вирусного канцерогенеза. Более полные сведения об опухолеродных вирусах с описанием их

морфогенеза, генетики, структурной и функциональной организаций их геномов можно получить из монографий Л. А. Зильбера (1968), А. И. Агеенко (1969, 1974, 1975, 1978), Gross (1970), В. М. Бергольца (1973), Л. А. Зильбера, И. С. Ирлина, Ф. Л. Киселева (1975).

Молекулярно-биологические механизмы вирусного онкогенеза

Вирусная теория со времени возникновения (Боррель, 1903; Мечников, 1909) претерпела значительную эволюцию: от периода вызывания (индукции) опухолей фильтрующимися агентами до выделения отдельных вирусных онкогенов, ответственных за неопластическое превращение клеток. Начальный, наиболее длительный период исследований онкогенных вирусов показал возможность передачи опухолевых заболеваний фильтрующимися агентами у птиц, млекопитающих и человека (ДНК-содержащий вирус бородавок). Значительный успех в исследованиях опухолеродных вирусов следующего этапа был связан с переходом к экспериментам на новорожденных инбредных (сингенных[1]) животных и в связи с этим с установлением возможности вертикальной передачи вирусов лейкозов у мышей, то есть от родителей потомству. Наиболее плодотворный период онковирусологии знаменуется выделением группы полиомавирусов (вакуолизирующий вирус обезьян SV40 и вирус полиомы мышей) и многих РНК-содержащих онкогенных вирусов у птиц, мышей, крыс, хомяков, кошек, собак, обезьян, а также раскрытием механизмов их репродукции, интеграции (включение одного генома в состав другого) с клеточным геномом и обоснованием их трансформирующего действия. Именно на этих моделях, а также в опытах с онкогенными вариантами ДНК-содержащих аденовирусов человека был достигнут исключительный прогресс в выделении вирусных генов[2]— онкогенов, ответственных за трансформацию[3] и канцерогенез. Важно отметить, что эти работы создали реальную почву не только для определения механизма индуцированной вирусами трансформации, являющейся одной из центральных проблем современной биологии, но и для понимания механизма регуляции

[1] Сингенные — генетически тождественные животные.

[2] Ген — единица наследственности, занимающая в хромосоме определенное место и несущая определенную функцию. Хромосомы представляют собой особые образования, включающие единицы наследственности — гены. У высших форм они состоят из ДНК и белка, у низших — только из нукленновых кислот. Определение локализации генов в хромосоме (у низших форм, например, у вирусов, генетический аппарат (геном) которых состоит либо из ДНК, либо из РНК, — в их нуклеиновых кислотах) получило название картирования или составления генетических карт.

[3] Трансформация опухолевая — изменение свойств клеток, сопровождающееся нарушением контроля над их ростом и делением. При трансформации образуются очаги многослойного роста клеток, и прежде всего нарушается контактное подавление их деления.

клеточного деления, а также молекулярных процессов, происходящих при дифференциации клеток. Решение этих проблем стало возможным, поскольку вирусы в отличие от химических и физических (радиация) канцерогенов представляют собой наиболее удобный инструмент для анализа обсуждаемых процессов ввиду того, что их гены и продукты, обусловливающие трансформацию, могут быть идентифицированы и тщательно функционально исследованы.

В настоящее время известно более 150 опухолеродных вирусов, подразделяющихся на две большие группы: ДНК- и РНК-содержащие. Основным их свойством является способность трансформировать нормальные клетки в опухолевые. РНК-содержащие онковирусы представляют собой многочисленную (больше 100 разных типов вирусов) уникальную группу и являются возбудителями злокачественных новообразований у естественных хозяев, тогда как среди ДНК-содержащих опухолеродных вирусов этим свойством обладают только две группы (вирусы папиллом и группы герпеса).

Интеграция и ДНК-провирус

Центральный постулат вирусогенетической гипотезы происхождения опухолей о необходимости интеграции вирусного генома с клеточным для стабильной опухолевой трансформации можно считать достоверно доказанным в прямых опытах с использованием генетических, физико-химических, вирусологических и молекулярно-биологических методов для мелких ДНК-содержащих полиома-, адено-, онкорнавирусов и некоторых представителей вирусов группы герпеса.

Оказалось, что в одних случаях само присутствие частично или полностью активного генетического аппарата онковируса в клетках хозяина в форме плазмид[1] или эписом[2], то есть не связанного с хромосомной ДНК или ассоциированного с ядерной ДНК лабильными водородными связями, может обеспечивать проявление определенных свойств неопластически трансформированных клеток. Недавно был описан первый пример паповавируса HD, способного персистировать в свободном неинтегрированном состоянии, когда функционирование его генов находилось под неизвестным клеточным контролем, препятствующим синтезу инфекционного вируса (Sauer e. a., 1979).

---

[1] Плазмиды — внехромосомные генетические элементы. Форма вирусной плазмидной ДНК находится под контролем клетки, то есть отсутствует большинство вирусных функций, в частности, синхронное возникновение процесса репликации.

[2] Эписомы — части генома клетки, оторвавшиеся от клеточных ДНК и в некоторых случаях способные к авторепродукции независимо от репликации хромосомной ДНК.

Сейчас для выявления вирусспецифической ДНК в клетках используются ^{3}H-ДНК-продукты различных вирусов (или их отдельных генов) в качестве специфических молекулярных зондов. В основу поиска положен метод молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот. Суть метода сводится к тому, что родственные (гомологичные[1]) нуклеиновые кислоты образуют гибриды, а чужеродные их не образуют. Чтобы определить степень гомологии, достаточно одну кислоту (или ее фрагмент) пометить радиоактивным веществом, например радиоактивным изотопом водорода — тритием (^{3}H), а затем рассчитать степень ее гибридизации с ДНК клетки или ДНК вируса (всего генома или его фрагментов — отдельных генов).

В первоначальных экспериментах в клетках, трансформированных вирусами полиомы и SV 40, были обнаружены вирусные геномы и их вирусспецифические РНК, которые содержали генетическую информацию для синтеза вирусспецифических белков. Эти информационные вирусные РНК имели состав своих субъединиц, который был комплементарен[2] субъединицам вирусной ДНК. Оказалось, что вирусные двойные спирали ДНК встраивались в комплементарные участки клеточных ДНК, прочно с ними связывались и локализовались только в ядерных, хромосомных ДНК трансформированных клеток. В ДНК нормальных клеток они не определялись. Этими работами Dulbecco (1966), Fujinaga, Green (1966, 1967) подтвердили все положения вирусогенетической теории рака, сформулированной Л. А. Зильбером. Но, к сожалению, все первые экспериментальные доказательства ее правильности касались самой немногочисленной группы онкогенных ДНК-содержащих вирусов — группы папова, которые не являлись причиной развития опухолей у животных в естественных условиях.

Ахиллесовой пятой вирусогенетической теории рака в то время оставались РНК-содержащие вирусы, составляющие основную массу семейства опухолеродных вирусов. Эта группа вирусов прежде всего важна тем, что именно ее представители вызывают опухоли у животных в естественных условиях. Невозможно было представить себе объединение (интеграцию) ДНК клетки с РНК вируса в единую молекулу, а затем кооперативное функционирование их генов. А это лишало вирусогенетическую теорию рака универсальности, делало ее узкоограниченной, то есть применительной только к ДНК-содержащим онкогенным вирусам, поскольку интеграция их геномов, состоящих из ДНК, не вызы-

[1] Гомология нуклеиновых кислот — наличие участков с одинаковой последовательностью нуклеотидов — азотистых оснований: аденилового, гуанинового, цитидилового, тимидилового и уридилового (А, Г, Ц, Т, У).

[2] Комплементарность (дополнительность) — термин молекулярной биологии, означающий, что в цепочках нукленновых кислот отдельные участки соответствуют друг другу по составу нуклеотидов, например, против А (аденилового нуклеотида) всегда стоит Т (тимидиловый), против Ц — Г, против Т — А, против Г — Ц.

вала принципиальных возражений. Считалось, что в живой клетке информация о наследственности всегда передается в одном направлении двойной спирали молекулы ДНК к ее копии информационной или матричной мРНК, управляющей синтезом белка. При этом необходимо иметь в виду следующие процессы: матрирование самого гена или синтез ДНК на ДНК (репликация[1]), синтез мРНК на ДНК (транскрипция[2]) и, наконец, синтез белка на матрице мРНК (трансляция[3]). Итак, основной путь передачи генетической информации, согласно «центральной догме» молекулярной биологии, протекает следующим образом: ДНК⟶РНК⟶⟶белок.

В 1964 г. молодой исследователь из Висконсинского университета Temin высказал предположение, что определенные типы вирусов могут вызывать опухоли, вырабатывая собственную ДНК, как только проникают в клетку. Эта ДНК — копия РНК вирусов — встраивается в ДНК клетки хозяина и начинает функционировать, обусловливая превращение клетки в опухолевую и репродукцию вируса.

Однако «теминизм», как назвали новую концепцию, был встречен скептически и не нашел большой поддержки у ученых, поскольку требовал экспериментального обоснования принципиально нового пути передачи информации с РНК на ДНК. Temin не сдавался: он открыл существование «обратного» направления синтеза белка, что позволило приподнять завесу еще над одной тайной превращения здоровой клетки в раковую, еще на шаг продвинуло человечество на пути к разгадке этого механизма. Mizutani, Temin (1976) удалось доказать, что вирусы сарком птиц в составе РНК содержат особый фермент, получивший название обратной транскриптазы или ревертазы (отсюда и другое название этой группы РНК-содержащих онкогенных вирусов — ретровирусы). С помощью этого фермента происходит «обратный» синтез белка, при котором путь передачи генетической информации протекает следующим образом: РНК⟶ДНК⟶⟶РНК⟶белок. Иначе говоря, «центральную догму» теперь можно дополнить: ДНК⇆РНК⟶белок. Baltimore, коллега Temin и Mizutani, из Кэмбриджа опубликовал в 1971 г. аналогичные данные. Главный вывод его исследований заключался в том, что РНК вирусов, вызывающих злокачественные новообразования у птиц и животных, может синтезировать собственную ДНК, которая получила название ДНК-провируса.

Метод выявления РНК-зависимой ДНК-полимеразы в вышеописанных работах был весьма прост. Очищенный и концентрированный вируссодержащий материал (в концентрации 50—200 мкг вирусного белка на 1 мл) добавлялся к инкубационной

---

[1] Репликация, то есть удвоение (от лат. «replicatio» — складывание в прежнем порядке).

[2] От лат. «transcribo» — переписывать, передавать.

[3] От лат. «translatio» — перенесение, перевод.

смеси, содержащей трис-буфер (pH 8,3), ионы магния, калия (или натрия), дитиотреитол и четыре дезоксинуклеозидтрифосфата (дАТФ, дГТФ, дЦТФ и дТТФ), один из которых (тимидинтрифосфат дТТФ) был мечен по тритию. Смесь инкубировалась при 37—40°С и при этом образовывался радиоактивный кислотонерастворимый продукт, который идентифицировался как ДНК центрифугированием в градиенте плотности сульфата цезия и его отношением к щелочам и ферментам. Частично разрушенные вирионы, содержащие рибонуклеопротеид, служили источником матрицы и полимеразной активности. Обработка вирионов неионным детергентом или эфиром для повреждения их вирусной оболочки значительно повышала их матричную и ферментативную активность, в то время как воздействие РНК-азы предотвращало синтез ДНК. В отсутствие ионов магния, дитиотреитола или одного из дезоксинуклеозидтрифосфатов синтез ДНК также прекращался или резко снижался.

В последующих работах онкорнавирусы исследовали на наличие РНК-зависимой ДНК-полимеразы. Green (1970) показал, что вирусы сарком мышей Молони и Харви после обработки NP-40 включали ^{3}H-дТТФ в кислотонерастворимую фракцию и, следовательно, содержали высокоактивную ДНК-полимеразу. Обратная транскриптаза очищенного вируса была стабильной: после хранения при 4°С в течение 2 мес сохранялось 50% активности. Для проявления максимальной активности требовалось наличие всех четырех нуклеозидтрифосфатов и двухвалентных катионов. Включение было пропорциональным концентрации вируса и линейным в течение 90 мин. Оптимум pH 8,1. При температуре свыше 37°С включение уменьшалось. Матрицей в реакции действительно являлась РНК вируса, так как РНК-аза разрушала полимеразную активность, кроме того, вирусы не содержали примесей ДНК. Синтезируемый с помощью ревертазы продукт гидролизовался ДНК-азой, а не РНК-азой и был стабильным в щелочах. При центрифугировании в щелочном градиенте плотности сахарозы продукт имел константу седиментации 7S, что соответствовало односпиральной ДНК с молекулярной массой 250 000. После денатурации и центрифугирования в равновесном градиенте плотности CsCl плавучая плотность синтезированной ДНК составляла 1,736—1,737 г/мл.

Большинство инфекционных РНК-содержащих вирусов (Сендай, гриппа, болезни Ньюкасла, респираторно-синцитиальный, полиомиелита, лимфоцитарного хориоменингита, везикулярного стоматита и др.) полимеразной активности не содержали. Вместе с тем эта активность была обнаружена в неонкогенных вирусах — Висна, поражающем нервную систему овец, обезьян, вызывающем образование синцития — foamy, Мэди, ящура и в одном из вирусов (австралийском антигене), встречающемся при инфекционном гепатите человека (Parks e. a., 1972). Это типичные инфекционные вирусы, вероятно, за исключением Висна, который

способен морфологически трансформировать клетки. Однако реакция полимеризации, осуществляемая ревертазой вируса Висна, сильно отличается по времени появления двухтяжевой ДНК от такой же реакции, осуществляемой ревертазами онкорнавирусов, например, Раушера и саркомы кошек.

Итак, практически все известные РНК-содержащие онковирусы имеют в составе вириона фермент, осуществляющий транскрипцию ДНК с матрицы РНК. В настоящее время предпринимаются попытки прервать индуцированные синтезы в клетке, не затрагивая нормальные внутриклеточные процессы. Уже удалось найти антибиотик, подавляющий работу обратной транскриптазы. Возможно, в будущем таким способом будет приостановлено превращение нормальной клетки в опухолевую.

Важное открытие сделали Spiegelman e. a. (1971). Оказалось, что обратная транскриптаза из вирусов миелобластоза может использовать любую из природных РНК-матриц не только вирусов, но и разные невирусные РНК, например, рибосомальную 5SРНК и даже синтетические полирибонуклеотиды, стимулируя включение ^{3}Н-дТТФ в кислотонерастворимую фракцию. Во всех случаях РНК-аза подавляла включение. Вновь синтезированную ДНК гибридизировали с гомологичными и гетерологичными РНК и полученный продукт исследовали в градиенте плотности Cs_2SO_4. Выяснилось, что фермент синтезирует ДНК, комплементарную только данной матрице. Таким образом, была продемонстрирована возможность искусственно, вне организма, синтезировать индивидуальные гены, причем в любом количестве копий, с помощью обратной транскриптазы. Переоценить значение этих экспериментов трудно, поскольку быстрый и относительно несложный искусственный синтез любых генов открывает широкие перспективы направленного воздействия на наследственность живых организмов, то есть создания нужных форм, исправления генетических дефектов и т. д. Исследования в этих направлениях начаты, и уже получены первые обнадеживающие результаты.

В 1971 г. Temin выдвинул свою гипотезу возникновения рака — теорию протовируса, фундаментом которой была обратная транскриптаза. Протовирус, как считает Temin,— нормальный компонент клетки, участвующий в дифференциации клеток, которые в начале деления оплодотворенного яйца одинаковы. Затем геном усложняется вследствие многократного переноса информации от протовирусного участка ядерной ДНК к РНК и обратно, от РНК к ДНК с включением вновь синтезированной ДНК с перестроенными нуклеотидами в генетический аппарат клетки. Под влиянием различных внешних воздействий (химических и физических канцерогенов, вирусов и т. д.) дифференциация может нарушаться, что ведет к возникновению новой информации. Следовательно, согласно гипотезе протовируса, нормальная клетка не содержит онкогенов, а сам протовирус лишь обусловливает потенциальную возможность возникновения онкогенной информации. Последова-

тельности нуклеотидов тех или иных протовирусов гомологичны определенным участкам генома ретровирусов. Процесс опухолевой трансформации сам по себе не связан с продукцией вирусных частиц. Вместе с тем вследствие обратной транскрипции, а затем вставки и рекомбинации[1] из вновь образованных ДНК может формироваться полный геном ретровирусов и могут продуцироваться вирусные частицы. При инфекции ретровирусами в клетку вносится готовая онкогенная информация, обусловливающая неопластическое превращение клеток. Однако эти гипотетические представления Temin в отношении протовирусов нуждаются прежде всего в экспериментальном обосновании, пока же ни на одной системе не доказано, что некоторые рибонуклеопротеиды могут быть передатчиками информации в нормальном онкогенезе.

Дальнейшее развитие вирусогенетическая теория рака получила в трудах Huebner и Todaro (1969, 1971, 1972), которые еще до открытия обратной транскриптазы у вирионов ретровирусов сформулировали гипотезу, оказавшуюся весьма своевременной и созвучной расцвету молекулярной биологии. Согласно этой гипотезе, все клетки (в том числе и половые) птиц и млекопитающих изначально содержат геном вирусов (вироген), который передается генетически вертикально от родителей потомству. Предполагают, что вирусные гены попали в клетку извне в результате ее инфицирования, происшедшего более 10—30 млн. лет назад. Лишь после этого клетки приобрели вирусные гены, которые эволюционировали вместе с ними. Следовательно, такие вирусы, названные эндогенными, представляют собой не что иное, как обычные структурные гены, которые в той или иной степени постоянно функционируют (экспрессируются). Второе важное положение, которое выдвигали авторы, заключалось в том, что в составе вирогена каждой нормальной клетки находится ген или гены, ответственные за опухолевое превращение клеток, то есть онкогены. Согласно их мнению, любой опухолевый процесс, чем бы он ни был вызван (ДНК-содержащими вирусами, химическими или физическими канцерогенами), сводится к активации онкогена в составе вирогена.

Забегая несколько вперед, следует сказать, что многие положения гипотезы Huebner и Todaro уже доказаны. В геноме нормальных клеток птиц и млекопитающих (грызуны, кошки, низшие приматы) действительно имеется геном эндогенного вируса, который интегрирован с клеточным геномом. Сейчас предпринимаются попытки определить место его интеграции. Показано, что вироген передается с половыми клетками вертикально как ген или группа генов. В клетках выявлена система контроля функционирования (экспрессия) и блокировки работы (репрессия) генов вирогена. Вироген может быть активирован полностью или час-

[1] Рекомбинация — взаимный обмен частями между гомологичными нуклеиновыми кислотами, приводящий к образованию новых комбинаций (рекомбинаций) генов и в конечном итоге — к созданию новой гибридной молекулы.

тично, тогда в последнем случае полный вирус не образуется. Обнаружены некоторые факторы активации вирогена, а именно, с помощью различных химических веществ, гормонов и облучения исследователи активизировали заложенную в нормальной клетке вирусную информацию, и клетка начинала производить эндогенные вирусы. Однако предположение Huebner и Todaro о постоянном присутствии онкогена в составе эндогенного вируса не подтвердилось. Оказалось, что выделенные из нормальных клеток животных эндогенные вирусы отличаются от обычных онкогенных РНК-содержащих вирусов слабо выраженными онкогенными свойствами или их отсутствием. Вместе с тем эндогенные вирусы гораздо чаще обнаруживаются у тех животных, которые особенно подвержены лейкозам и сахарозам.

В таком случае возникает вопрос: не может ли рак передаваться по наследству с помощью «бродячих» онкогенов опухолеродных вирусов? Отрицать такую возможность сегодня с прежней категоричностью уже нельзя. Однако, чтобы «запустить» бластоматозный механизм, необходим, по-видимому, ряд внешних факторов (химические канцерогены, радиоактивные излучения и др.). Возрастные изменения, нерациональное питание — все то, что нарушает нормальную работу клетки, тоже может стимулировать начало болезни. Видимо, параллельно протекают два процесса: с годами снижается сопротивляемость организма и, кроме того, под влиянием неблагоприятных внешних факторов подавляется защитный иммунологический механизм, который будет рассмотрен ниже.

Итак, после теоретической разработки проблемы интеграции и прямого экспериментального обоснования интеграции ДНК- и РНК-содержащих опухолеродных вирусов в геном злокачественно трансформированной клетки проблема вирусного канцерогенеза практически свелась к идентификации онкогенов в структуре онковирусов. Само же понятие онкогена с этого времени было положено в основу современного представления о механизме бластомогенного действия опухолеродных вирусов.

Интеграционный принцип взаимодействия вирусного генома с генетическим аппаратом клетки, по-видимому, имеет широкое общебиологическое значение. Вероятно, он, наряду с мутациями и рекомбинациями, является фактором эволюции, обеспечивая обмен генетической информацией в биосфере как внутри видов, так и между особями разных токсономических групп эукариотов и прокариотов. Иногда могут возникать «интегративные» патологические процессы, например, аутоиммунные болезни, опухолевая трансформация, аномальные типы «обычных» и «медленных» вирусных инфекций и т. д.

Установлено, что интеграция имеет место не только при трансформации, но и при продуктивной инфекции опухолеродными вирусами (когда воспроизводится новое вирусное потомство) и, очевидно, является их характерной чертой, а в случае ретрови-

русов — одним из этапов их вегетативного репродуктивного цикла.

Экспериментальные данные позволяют предполагать, что ДНК-копии генома ДНК-содержащих опухолеродных вирусов и ДНК-провирус РНК-содержащих онковирусов могут включаться в разные места клеточного генома; при опухолевой трансформации интеграция, вероятно, осуществляется в специфические, уникальные участки ДНК-клетки.

В настоящее время механизм физической интеграции вирусной и клеточной ДНК практически не исследован, особенно последовательные, промежуточные этапы процесса. До сих пор центральное место в проблеме принадлежит вопросу о специфичности мест интеграции в клеточной ДНК. Значительный интерес в перспективе будут представлять исследования структурной организации вирусных ДНК-копий и их транскрипция в трансформированных клетках. Принципиально важным является решение и таких вопросов: существует ли в вирусной ДНК специфический участок (или точка), который прикрепляется к клеточной ДНК; необходимы ли для интеграции какие-либо вирусспецифические функции и, наконец, какие клеточные ферментные системы участвуют в этом процессе. Понятно, что ответы на данные вопросы вплотную приблизят нас к расшифровке механизма вирусного онкогенеза.

Исследователи, работающие над этой проблемой, располагая пока недостаточным фактическим материалом, считают, что интеграция может носить специфический и неспецифический характер, причем, вероятно, как в первом, так и во втором случае клеточные ферменты (полимеразы, нуклеазы, лигазы и т. д.) участвуют в фиксации вирусного генома. Однако, если весь процесс интеграции осуществляется только клеточными ферментными системами, то, по-видимому, несмотря на его эффективность, точки разрывов вирусной ДНК могут быть в разных участках, в том числе и в области онкогенов опухолеродных вирусов, и присоединение может происходить в различные области клеточной ДНК. Возможно, аналогичный неспецифический процесс имеет место при продуктивной инфекции полиомавирусами, до проявлений определенных функций вирусного генома. В этих случаях, вероятно, трансформации не происходит и она, по-видимому, носит случайный характер, то есть осуществляется только при условии интеграции неповрежденного онкогена с такой областью клеточного генома, где происходит его постоянное функционирование. Специфический процесс, напротив, закономерно приводит к опухолевой трансформации и обусловливается, по-видимому, как вирусными, так и клеточными ферментными системами. В этом процессе обязательно участвует продукт онкогена, например, полиомавирусов; разрыв и фиксация вирусного генома в этом случае происходят так, что онкоген не повреждается и в дальнейшем может функционировать вместе с клеточными генами.

AXB.-RESURS MARKAZI
1991

Многочисленные экспериментальные материалы свидетельствуют о том, что после физической интеграции при опухолевой трансформации вирусная ДНК становится частью клеточного генома, реплицируется вместе с ним и передается дочерним клеткам. Репликация и экспрессия вирусной ДНК частично или полностью регулируются клеточными механизмами. Иными словами, вирусная ДНК воспринимается клеточными защитными механизмами как нормальная составная часть генетического аппарата, и производимые ею продукты — вирусспецифические белки — не повреждают жизнеспособность трансформированной клетки.

Экспрессия интегрированных вирусных ДНК-копий заключается в транскрипции вирусспецифической мРНК на матрице вирусной ДНК и в синтезе вирусспецифических белков. Транскрипция вирусных ДНК-копий начинается на клеточном промоторе, контролируется клеточными механизмами. По-видимому, существуют общие закономерности списывания онкогена трансформирующего вируса, поскольку неопластическое превращение клеток обусловливают только определенные вирусспецифические белки.

Наличие вирусспецифических мРНК в трансформированных и нормальных клетках определяют методом молекулярной гибридизации, используя ^{3}Н-ДНК-транскрипт соответствующего вируса (всего генома или отдельных вирусных генов). Как правило, вирусный онкогенез сопровождается появлением вирусспецифических мРНК и белков в клетках, трансформированных опухолеродными вирусами.

Следует отметить, что существенный прогресс в молекулярно-биологических исследованиях опухолеродных вирусов, и в первую очередь ДНК-содержащих полиома- и аденовирусов, связан с разработкой методов специфической фрагментации (разрезания) ДНК с помощью бактериальных ферментов — рестрикционных эндонуклеаз (рестриктаз). Полученные таким способом фрагменты вирусной ДНК исследуются на биологическую активность, включая выделение минимального участка вирусного генома, способного вызывать трансформацию клеток. Кроме того, такие фрагменты могут использоваться для гибридизации, как отмечалось выше, с целью выявления в клетке вирусных мРНК и т. д. К настоящему времени в результате многочисленных работ этого направления получена подробная информация о функциональной и структурной организациях генома опухолеродных вирусов. Для систематизации всех этих исследований необходимо определить положение того или иного рестриктазного фрагмента в вирусной ДНК, то есть создать физические карты вирусной ДНК, на которых должны быть указаны расположения точек или сайтов рестрикции. В этих точках рестриктазы разрывают (гидролизуют) фосфодиэфирные связи в молекуле вирусной ДНК, причем разные рестриктазы «узнают» различные точки. Первым этапом картирования (составления генетических карт — определение локализации и порядка генов) является выявление числа и моле-

кулярной массы фрагментов вирусной ДНК — продуктов действия рестриктаз. В последнее время исследователи располагают большим числом методов, с помощью которых можно разделять фрагменты ДНК и устанавливать их порядок, при условии, что их общее число не превышает 30—40. Когда молекулярные массы всех фрагментов известны, локализация каждого из них в вирусном геноме может быть выражена в условных единицах карты генома от 0 до 1,0. Составлено уже значительное число физических карт опухолеродных вирусов (в первую очередь относящихся к группам папова,- адено- и герпеса). Вместе с тем многие важные аспекты структурно-функциональной организации их геномов не изучены или недостаточно еще охарактеризованы. Поэтому физическое картирование по-прежнему остается одним из наиболее актуальных разделов молекулярной биологии опухолеродных вирусов.

Вопрос о наличии в вирусной ДНК специфического места для прикрепления к клеточной ДНК был исследован с помощью рестриктаз и электронного микроскопа на модели полиомавирусов в сравнительном аспекте: при литической (продуктивной) инфекции и в процессе трансформации. Chow e. a. (1975) разработали методический прием, который был основан на том, что при высокой множественности заражения в условиях литической инфекции ДНК вируса SV 40 интегрировал с ДНК клетки, после чего вырезался и при этой процедуре нередко включал в свой состав фрагмент клеточной ДНК. При этом в месте включения ДНК клетки образовывались гетеродуплексы с петлей, расположение которых устанавливалось с помощью электронного микроскопа. В случае определенного места интеграции в молекуле вирусной ДНК петли должны были иметь постоянную локализацию. Полученные данные свидетельствовали о полуспецифическом характере при продуктивной инфекции мест прикрепления, которые выявлялись в зоне 0,205—0,312 ед. физической карты (за точку нуль принимался разрыв рестриктазой EcoR 1, которая разрезала кольцевую молекулу ДНК вируса SV 40 в одном строго определенном месте генома вируса SV 40). Авторы предполагают, что существует несколько мест прикрепления, которые соответствуют точкам 0,205; 0,248; 0,312 и, вероятно, 0,59. При разрыве молекулы ДНК вируса SV 40 в указанных точках синтез раннего (осуществляется до репликации вирусной ДНК) белка *А*-продукта гена *А*-онкогена, ответственного за трансформацию (см. ниже), невозможен. Действительно, оказалось, что фиксация и разрыв ДНК вируса SV 40 при опухолевой трансформации происходили в области поздних вирусных генов внутри фрагмента *С* и прилегающего к нему фрагмента *Д* (0,70—0,85 ед. карты) или обычно в районе точки начала репликации ДНК (0,67 ед. карты). Связывание вирусной, двухспиральной молекулы именно в этой точке с хромосомальной ДНК, по-видимому, обусловливает и характерный спектр транскрибируемых вирусспецифических мРНК и со-

ответствующих продуктов их трансляции, играющих, вероятно, первостепенную роль в поддержании трансформированного фенотипа[1] клетки.

Вопрос о специфичности участков (мест) клеточной ДНК, в которые должны встроиться вирусные ДНК-копии с тем, чтобы вызвать трансформацию, пока исследован недостаточно. Можно предполагать, что интеграция вирусного генома при продуктивной инфекции в основном, по-видимому, происходит в повторяющиеся последовательности хромосомальной ДНК; она относительно специфична, так как при этом в генетическом аппарате клетки может обнаруживаться до 20 000 и более копий вирусной ДНК. В то же время интегративная рекомбинация при трансформации, вероятно, высокоспецифична и осуществляется в ограниченное число участков (пока они точно не картированы) в области уникальных последовательностей клеточной ДНК, и количество вирусных ДНК-копий в этом случае в среднем составляет 1—10 в расчете диплоидный[3] геном. Croce e. a. (1977) представили убедительные данные о том, что трансформированные вирусом SV 40 клетки человека содержат вирусный геном в хромосоме *C* 7 или *C* 17. Предполагается, что только при такой локализации вирусной ДНК синтезируется *T*-антиген и проявляется трансформированный фенотип клетки. Вместе с тем Hwang и Kucherlapati (1980) выявили четыре независимых места интеграции последовательностей генома SV 40 в трансформированных фибробластах человека, три из которых локализованы в пятой хромосоме человека. Интегрированные вирусные последовательности перемежаются с клеточными участками. Использование одновременной рестрикции разными ферментами показало, что последовательности, находящиеся внутри вирусного генома, различаются в каждом случае. Какая-либо специфичность интеграции генома SV 40 в клетках человека отсутствует. В клетках крыс и хомяков обнаружено от одного до пяти мест интеграции SV 40 (Chepelinsky e. a., 1980). Выявлены как единичные копии, так и тандемные повторы последовательностей SV 40. В клетках мышей, трансформированных SV 40, интеграция ДНК SV 40 также была неспецифичной, хотя в некоторых линиях вставки вирусной ДНК очень близки по своим свойствам. В подавляющем большинстве исследованных линий вставки вирусной ДНК были в виде тандемных дупликаций геномов. В приведенных выше работах определялся механизм интеграции вирусной ДНК. Вслед за инфицированием мышиных клеток наблюдался синтез длинных тандемно соединенных «голова-хвост» молекул вирусной ДНК, что происходило в условиях репликации вирусной ДНК. С использованием физи-

[1] Фенотип — совокупность свойств и признаков организма (данного индивидуума) и его клеток, которые являются результатами взаимодействия генотипа[2] особи и окружающей среды.

[2] Генотип — совокупность генов в генетическом наборе у данного вида.

[3] Диплоидность — наличие четного (парного) числа хромосом в клетках, при котором каждой хромосоме соответствует ее гомолог..

ческих методов идентификации вирусных геномов установлена активная рекомбинация между полимерами. Это является основанием для предположения об их отношении к пулу предшественников форм интеграции. В ряде лабораторий предпринимаются дальнейшие эксперименты для подтверждения данной гипотезы.

Показано, что клетки клонов, полученных от одной опухоли (опухоль мозга хомяка, индуцированная паповавирусом человека I C), содержат разное число копий вируса (9—10 или 4—5) на клетку, причем, по-видимому, каждый из геномов представлен полной копией (Wold e. a., 1980). В исследованных клональных линиях множественные копии интегрируют тандемно путем соединения «голова-хвост». В клетках вирусная ДНК обнаружена только в ассоциации с хромосомальной ДНК. Каждая клональная линия содержит множественные независимые участки для интеграции вирусной ДНК. Участки интеграции клеточного и вирусного геномов различны в клетках каждого клона. Таким образом, хотя клоны получены из одной и той же опухолевой клеточной линии, они отличаются по количеству копий вирусной ДНК и характеру распределения этих последовательностей.

Сходная картина имеет место и в геноме трансформированных вирусом саркомы Рауса и ревертантных клеток млекопитающих, то есть каждый клон также характеризуется специфическим распределением вирусспецифических последовательностей ДНК (Collins e. a., 1980). В морфологических ревертантах и спонтанных ретрансформантах распределение ДНК-провирусных последовательностей в геноме не отличается от распределения их в трансформированных родительских клетках. Сравнение карт рестрикции клеточных интеграционных фрагментов с использованием нескольких рестриктаз свидетельствует, что интегрированный геном вируса Рауса (штаммы B 77 и SR-RSV) локализован в различных участках ДНК трансформированных клеток мышей и крыс. Выявлено, что лишь одной полной копии вирусного генома достаточно для поддержания трансформированного фенотипа в клетках млекопитающих.

Таким образом, представленные данные согласуются с предположением о наличии множественных мест для интеграции ДНК опухолеродных вирусов в геном клеток-мишеней.

Важно отметить, что во многом пермиссивность клеток, в которых вирус полностью завершает свой репродуктивный цикл, или непермиссивность клеточных систем, где происходит абортивная инфекция, взаимодействующих с онковирусами, определяют количественные и качественные аспекты интеграции: интеграцию полного вирусного генома или только отдельных его фрагментов, или же одновременно как целых молекул, вирусных ДНК-копий, так и их сегментов. Так, в клетках хомяка, трансформированных аденовирусами человека 2-го и 5-го типов (*A*2 и *A*5), выявлено не более 14% вирусного генома (число копий варьировало от 2 до 13 на клетку), а в случае аденовируса 7-го типа — не более

20% (до 300 копий на клетку) (Fujinaga e. a., 1975; Sambrook e. a., 1976). В некоторых случаях отмечена интеграция всего генома аденовируса 5-го типа, причем разные части генома присутствуют в разном числе копий (Фролова, 1978).

Согласно Lee, Mak (1977), в клетках, трансформированных аденовирусом 12-го типа человека (*A* 12), обнаружено 55% генома, а по данным Vano e. a. (1977) — 77%. Установлено также, что в разных линиях клеток, трансформированных аденовирусами, транскрибируются различные по длине участки ДНК-копий, количество копий отдельных фрагментов ДНК может быть разным, причем некоторые фрагменты транскрибируются неполностью (Flint, Sharp, 1976; Vano e. a., 1977). ДНК *A* 12 интегрирует в ограниченное число участков клеточного генома. Возможно, эти точки представляют собой повторяющиеся последовательности в составе клеточной ДНК. В клетках хомяка не обнаружено присутствие свободных полных молекул ДНК *A* 12. Точки интеграции различны в разных линиях трансформированных и опухолевых клеток. В неопластически трансформированных аденовирусами клетках происходит экспрессия преимущественно ранних генов *A* 12, а в опухолевых клетках из мозга крыс — ряда поздних генов (тестировалось по поздним мРНК).

О характере взаимодействия вирусов группы герпеса с геномом клетки достаточно полных сведений еще не имеется. Это объясняется методическими трудностями, связанными, во-первых, с низким титром вируса, например Эпштейна-Барр (ВЭБ), во-вторых, очень большим размером геномной ДНК (молекулярная масса около 100×10^6). Вместе с тем показано, что основная масса ДНК ВЭБ с коэффициентом седиментации 55 S находится в клетках лимфомы в несвязанном с ядром виде в форме плазмид или же объединяется с хромосомной клеточной ДНК лабильными водородными связями. Причем клоны клеток лимфомы Беркитта, не продуцирующие инфекционный ВЭБ, содержат от 8,6 до 60 эквивалентов генома ВЭБ. В клетках карциномы носоглотки определяется в среднем 19,2 копии генома ВЭБ. В перевиваемых клеточных линиях лимфомы, продуцирующих ВЭБ, число геномов резко возрастает, например, клетки линии HPIK содержат 700 копий генома ВЭБ. Важно отметить, что в ядрах клеток исследованных культур присутствует полный вирусный геном, так как в таких клетках можно индуцировать активацию ВЭБ под воздействием аналогов тимидина или путем переноса клеток в среду, обедненную аргинином (Nonoyama, Tanaka, 1975).

Показана идентичность геномов ВЭБ, обнаруживаемых в клетках лимфомы Беркитта, карциноме носоглотки и при инфекционном мононуклеозе. Вирусная ДНК из клеток карциномы носоглотки в градиенте глицерина разделяется на два компонента: 110 S и 64 S, то есть соответственно на ковалентнозамкнутую и открытую циркулярную формы ДНК. Наличие полноценных ковалентнозамкнутых форм вирусной ДНК подтверждено также

электронной микроскопией. Молекулярная масса циркулярных ДНК ВЭБ из клеток карциномы носоглотки составляет около 104×10^6. Анализ ДНК из клеток лимфомы Беркитта, изолированных непосредственно из опухолей больных детей, показывает, что более 70% 105 S ДНК локализуется в зоне градиента, типичной для ковалентнозамкнутых форм ДНК с высокой плотностью сверхспирали. Кроме этого, установлено, что в хромосомальной ДНК из клеток лимфом и карцином с меньшей плавучей плотностью, чем плотность ДНК ВЭБ, присутствуют последовательности вирусного генома. Только с помощью фрагментации высокополимерной ДНК удается разделить клеточные и вирусспецифические последовательности ДНК, что свидетельствует об интегрированном состоянии вирусного генома в клетках лимфомы Беркитта и карциномы носоглотки (Kaschka-Dierich e. a., 1976).

В отношении вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типов получены противоречивые результаты. В большинстве исследований ни геномы этих вирусов, ни их фрагменты не определяются в клеточной ДНК. Лишь в одной работе обнаружено, что значительная часть генома (около 39%) вируса герпеса 2-го типа тесно связана с повторяющимися последовательностями ДНК клеток рака шейки матки человека (Minson e. a., 1976). В то же время кинетика реассоциации ДНК HSV 2, меченной ^{125}J, и ДНК, выделенной из трансформированных этим вирусом клеток, свидетельствует о том, что на ранних пассажах культуры в клеточной ДНК определяется менее одного генома HSV 2 на одну клетку (Thiry, 1976). По мере пассирования культуры уровень выявляемой ДНК HSV 2 снижается до тех пор, пока не перестает обнаруживаться. ДНК HSV 2 отсутствует в клетках всех 20 клонов, полученных из этой культуры. Следовательно, при делении клеток, по-видимому, утрачиваются последовательности клеточной ДНК, комплементарные ДНК HSV 2. Вероятно, для поддержания трансформированного состояния достаточно присутствия в клетке лишь небольшого сегмента геномов вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типов.

В случае ретровирусов показано, что уже через 1—9 ч после заражения клетки с помощью обратной транскриптазы вирусспецифическая ДНК синтезируется на матрице вирусной 70 S[1] РНК (Varmus e. a., 1975). ДНК-провирус ретровирусов имеет кольцевую форму и молекулярную массу 6×10^6, то есть соответствует одной субъединице вирионной РНК. Синтез вирусной ДНК происходит в цитоплазме, затем она транспортируется в ядро, связывается с клеточной ДНК и интегрирует с ней. При опухолевой трансформации гомологичных, чувствительных (пермиссивных) для ретровируса клеток (например, куриные клетки для вируса куриной саркомы Рауса) обычно с клеточной ДНК интегрируют 2—10 копий ДНК-провируса. В клетках гетерологичных животных (например, клетки млекопитающих, трансформированные ви-

[1] 70S — коэффициент осаждения нуклеиновой кислоты.

русом саркомы Рауса), где не происходит полного цикла репродукции ретровируса, с клеточным геномом интегрируют обычно 1—2 копии вирусной ДНК (иногда до 20 копий). ДНК-провирус интегрирует, по-видимому, как в специфические (уникальные) участки клеточной ДНК или в тандем с эндогенным ДНК-провирусом в случае гомологичных клеток (происходит добавление вирусспецифической информации), так и в разные места клеточного генома. Клетки гетерологичных животных, в которых ДНК-провирус, родственный трансформирующему вирусу, отсутствует, вследствие интеграции заново приобретают вирусные гены.

Таким образом, в настоящее время имеются достоверные данные относительно конечного этапа перехода (интеграции) вирусспецифической информации от вирионов (вирусных частиц) к геному клетки (наличие генома опухолеродного вируса в хромосомной ДНК клеток). Однако до сих пор последовательные, промежуточные этапы этого перехода остаются невыясненными. Интеграция вирусного генома с клеточной ДНК — первый этап общепринятой современной схемы вирусного онкогенеза. Следующими основными этапами, необходимыми для неопластического превращения клеток, являются: 1) экспрессия интегрированного вирусного генома, то есть его транскрипция и трансляция с образованием вирусспецифических белков и 2) функционирование белка — продукта специфического вирусного онкогена, ответственного за опухолевую трансформацию. Предполагают, что этот белок нарушает регуляцию клеточного деления и поддерживает трансформированный фенотип клеток.

Итак, интеграция является центральным событием и обязательным условием опухолевой трансформации, однако не ее прямой причиной, поскольку она необходима только для включения и передачи последующим популяциям клеток вирусных онкогенов.

Что же мы знаем о раковых генах и их продуктах сегодня?

ДНК-содержащие опухолеродные вирусы и канцерогенез

Паповавирусы (группа полиомавирусов)

Основные положения вирусогенетической теории рака на протяжении 20-летнего периода ее существования способствовали исключительному прогрессу в исследованиях механизмов репродукции ДНК- и РНК-содержащих опухолеродных вирусов, экспрессии их геномов и взаимодействия с клетками-мишенями, в некоторых случаях приводящего к опухолевой трансформации. Сочетание молекулярно-биологических и генетических подходов (анализ с помощью различных бактериальных рестриктаз, моле-

кулярная гибридизация, использование ts-мутантов[1] и генетических мутантов и т. д.) позволило составить весьма полные генетические карты мелких (диаметр вириона — от 43 до 55 нм[2]) ДНК-содержащих онковирусов: полиомы и SV 40 (Khoury e. a., 1976; Ferdinand e. a., 1977; Dhar e. a., 1978). В настоящее время эти вирусы всесторонне исследованы и стали классическими моделями вирусного канцерогенеза.

Капсид[3] полиомавирусов построен из 72 белковых структурных морфологически идентичных единиц — капсомеров. Каждая из этих субъединиц содержит пять или шесть белковых молекул, то есть в оболочке находится 420 полипептидных цепей, которые в большинстве (если не все) представлены структурным белком VP 1. Эта белковая оболочка окружает единственную кольцевую, двухцепочную молекулу ДНК-геном вируса с молекулярной массой $3{,}2\times10^6$ и длиной развернутой цепи 1,6 мкм. Геном полиомавирусов состоит из 5100 пар нуклеотидов (причем сейчас полностью расшифрованы нуклеотидные последовательности ДНК SV 40, что значительно облегчает дальнейший анализ генетических функций) и имеет всего три гена — один ранний (*A*) и два поздних (BC, Д) (Reddy e. a., 1978). Ген *A* кодирует неструктурные, ранние белки, то есть синтезирующиеся до начала репликации вирусной ДНК. Ген *BC* кодирует синтез главного структурного белка оболочки вириона V P1 с молекулярной массой около 47 000 дальтон и составляющего 70% вирусного белка. Наконец, ген *D* содержит информацию на синтез структурных белков V P2 и V P3 (с молекулярными массами приблизительно 37 000 дальтон), нормальное состояние которых необходимо для «раздевания» и транскрипции вирусной ДНК. До недавнего времени считалось, что ранние белки (*T*-антиген) не входят в состав вириона паповавирусов. Однако в работах Mann, Hunter (1979) и Qureshi (1980) было показано, что комплексы вирусных ДНК с белком содержат *T*-антиген (бóльшая его форма — 100 000 дальтон), структурные полипептиды паповавирусов (V P2 и V P3), а также клеточные гистоны (f 3, f2в, f 2a и f $2a_2$). Малый t-антиген (17 000) с этими комплексами не связан. Возможно, *T*-антиген, ассоциированный с нуклеопротеидными комплексами полиомавирусов, вовлечен в инициацию синтеза вирусной ДНК. Действительно, Segawa e. a. (1980) представили данные, указывающие не

[1] ts-мутанты — температурочувствительные мутанты, в отличие от дикого типа вируса при непермиссивных (неразрешающих) температурах, например, при 39°C, не проявляют некоторых функций вирусного генома: синтез определенных белков, инициацию репликации вирусной ДНК и т. д. К настоящему времени получено и охарактеризовано более 200 ts-мутантов вируса SV 40, которые в зависимости от выпадения ранних (инициация репликации вирусной ДНК) или поздних (неспособность синтезировать полноценный главный структурный белок вирусной оболочки) функций вирусного генома разделены на пять групп.

[2] Нанометр (от греч. «nanos» — карлик) равен 1×10^{-9} м.

[3] Капсомер — единица капсида. Капсид (от лат. «capsa» — ящик) — белковая оболочка вируса, предохраняющая его нуклеиновую кислоту от внешних воздействий.

только на вероятную роль *T*-антигена в инициации репликации ДНК вируса, но и в элонгации этого процесса.

Полиомавирусы высокоонкогенны в лабораторных условиях, они легко преодолевают тканевые и видовые барьеры. Вирус полиомы вызывает 23 типа различных опухолей у семи видов животных (мышей, крыс, mastomys, хомяков, кроликов, морских свинок и хорьков), а SV 40 — у трех (хомяков, крыс, mastomys). В культуре ткани эти вирусы трансформируют в опухолевые клетки животных и человека, а в некоторых культурах вызывают литическую инфекцию, то есть гибель клеток. Причем крайне важно следующее: если происходит неопластическое перерождение клеток, проявляются (функционируют) только онкогены вируса; в случае же литической инфекции — экспрессируются гены вируса, участвующие в создании нового вирусного потомства.

Ген A — онкоген полиомавирусов, его функции и кодируемые им белки

На ts-мутантах SV 40 и вируса полиомы было установлено, что клетки, трансформированные этими мутантами при разрешающей температуре, во время переноса в условия неразрешающей температуры теряют трансформирующий фенотип и обретают свойства, характерные для нормальных клеток. При обратном переносе трансформированный фенотип клеток восстанавливается, в результате они опять становятся нормальными. Следовательно, ген *A* является онкогеном паповавирусов, то есть непосредственно участвует в опухолевом перерождении клеток. Детальный анализ на ts-мутантах вирусов полиомы и SV 40 позволяет прийти к заключению, что под контролем ранних белков (*T*-антигена и др.) — продуктов гена *A* этих вирусов находится интеграция вирусного генома с клеточным, что обусловливает стабильную неопластическую трансформацию.

В настоящее время с геном *A* связывают такие функции вирусного генома, как синтез ранних белков, инициацию синтеза вирусной ДНК, активацию ферментов клетки, необходимых для ее перевода из стадии покоя в стадию деления, индукцию синтеза клеточной ДНК, инициацию специфической интеграции, изменение поверхности трансформированных клеток и, наконец, поддержание трансформированного фенотипа клеток, который определяет их способность к росту в агаровой среде, потерю контактного торможения и другие свойства опухолевых клеток (Anderson, Martin, 1976; Dulbecco, 1976).

Оказалось, что клетки, трансформированные вирусом полиомы и SV 40, различаются по фенотипу. Использование в этих экспериментах ts-мутантов позволило определить, что фенотип трансформации контролируется ранними генами обоих вирусов (Perbal, Massoulzadegan, 1980).

Синтез ДНК паповавирусов осуществляется в обе стороны от точки инициации и происходит прерывисто с образованием коротких фрагментов. В небольшой части молекул ДНК может иметь место однонаправленная репликация (Robertson e. a., 1975). Начало репликации вирусной ДНК находится под контролем продукта специального гена-инициатора, функцию которого у паповавирусов выполняет ген *A*. Итак, прерывистый механизм синтеза вирусной ДНК, направление синтеза в обе стороны от точки инициации и завершение его в зоне встречи растущих нитей ДНК, то есть сам характер репликации вирусной ДНК соответствует общим закономерностям синтеза ДНК клетки и осуществляется, вероятнее всего, клеточными ферментными системами (Hand, Tamm, 1974).

Третьим принципиально важным процессом, который удалось связать с функцией гена *A* паповавирусов, является активация синтеза клеточной ДНК. В опытах с микроинъекциями в клетки ранней мРНК SV 40 было показано, что через несколько часов после появления в таких клетках *T*-антигена синтезируется клеточная ДНК. Следовательно, ранние мРНК SV 40 содержат информацию, обеспечивающую синтез *T*-антигена и стимуляцию репликации хроматина клетки (Graessmann, Graessmann, 1976). Аналогичные данные при добавлении *T*-антигена к изолированным ядрам клеток были получены М. А. Шлянкевичем с соавт. (1977).

Предложены вероятные модели индукции синтеза хромосомной ДНК клетки продуктом гена *A* паповавирусов, в основе которых было предположение о сходном строении репликона вируса и клетки. В силу этого обстоятельства ранний белок — продукт гена *A*, являясь инициатором синтеза вирусной ДНК, может действовать непосредственно на клеточные и вирусный репликаторы[1]. В последнем случае синтез клеточной ДНК, по-видимому, способен протекать анормально, так как инициация его начинается на нетипичном месте и, вероятно, происходит в обход регуляторных систем клетки. При этом в случае обоих вероятных механизмов активации репликации ядерной ДНК возникают повторные синтезы отдельных или всех хромосом клетки с аномальными митозами или вообще без митозов, что приводит, как было показано, к анеуплодии и полиплодии (Weil e. a., 1974). Способность запускать синтез хромосомной ДНК независимо от регуляторных механизмов клетки позволила высказать предположение, согласно которому функция *A*-гена необходима не только для стабильной трансформации, но и для ее поддержания. Однако, хотя в последующих работах на ts-мутантах паповавирусов это предположение было экспериментально обосновано, все же столь многообразную и многоэтапную неопластическую трансформацию невозможно полностью объяснить такой элементарной схемой. В свете обсуждаемой модели опухолевой трансформации

[1] Репликатор — точка на ДНК, с которой происходит инициация репликации.

заслуживает внимания гипотеза, высказанная Martin e. a. (1975), согласно которой большинство свойств трансформированной клетки обусловлено обычными, нормальными процессами, происходящими в *S*-, G_2- и *M*-периодах клеточного цикла[1]. По их мнению, клетки, способные входить в G_0-период хотя бы на минимальный срок, а затем преждевременно покидать его под воздействием продукта *A*-гена, обладают неполно выраженным трансформированным фенотипом. В то же время клетки, непрерывно проходящие клеточный цикл и совершенно не «отдыхающие» в G_0-периоде, приобретают все свойства неопластически трансформированных клеток.

Тщательный отбор и исследование свойств ранних ts-мутантов паповавирусов позволили разделить две функции — инициацию стабильной трансформации и поддержание трансформированного фенотипа — между двумя разными ранними генами опухолеродного вируса (Eckhart, 1969; Kimura, Dulbecco, 1973). В последующем на ts-мутантах паповавирусов удалось определить самостоятельную митогенную функцию (стимуляцию клеточного деления) и тесно связать три функции гена *A* (инициацию синтеза вирусной ДНК, осуществление интеграции вирусного и клеточного геномов и регуляцию транскрипции ранних и поздних вирусных генов). На основании этих данных авторы выдвинули гипотезу о «плейотропных эффекторах», которая основывалась на предположении о том, что различные детерминанты[2] *T*-антигена обладают разной функциональной специфичностью и, взаимодействуя с вирусными и клеточными регуляторными компонентами, вызывают те или иные эффекты. В частности, они инициируют плейотропные модуляции клетки; некоторые из них необходимы для репродукции вируса. Вскоре Gluzman e. a. (1977) были получены ts-*A*-мутанты SV 40, у которых оказалась дефектной функция синтеза вирусной ДНК, однако они обладали способностью трансформировать клетки, то есть эти экспериментальные факты подтверждали предположение Weil e. a. С другой стороны, на системе вирусов полиомы были отобраны ts-мутанты, дефектные по способности трансформировать клетки, но сохранившие способность репликации вируса (Eckhart, 1977). Эти мутанты четко отличались от ts-*A*-мутантов, которые могли поддерживать состояние трансформации при непермиссивной температуре, однако не осуществляли стабильную трансформацию и репликацию вирусной ДНК. Подобные ts-мутанты (in — ts) — 1501 были выявлены и у SV 40 (Lockwood e. a., 1977). Оказалось, что некоторые детерминанты *T*-антигена необходимы для осуществления и поддержания интеграции, в то же время индукция синтеза клеточ-

[1] Клеточный цикл включает следующие периоды: *M* — митоз — деление неполовых клеток, *S* — синтез ДНК, G_2 — период перед митозом, G_0 — период «отдыха» после митоза и G_1 — период перед синтезом ДНК.

[2] Антигенные детерминанты — поверхностно расположенные химические группы, играющие наибольшую роль в определении иммунологической специфичности антигенов.

ной ДНК и *T*-антигена ассоциирована с проявлением разных ранних функций вирусного генома. Одна из зон *T*-антигена обусловливает трансформацию, другая — ответственна за репликацию, транскрипцию и интеграцию вирусной ДНК (Weinberg, 1977).

T-антиген может активировать синтез клеточной ДНК непрямым, опосредованным путем, а недавно были представлены экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что для этого необходимо участие и клеточного компонента (Hiscott, Defendi, 1979).

Итак, возникает принципиальный вопрос: осуществляются ли две основные функции вирусного генома — интеграция вирусного и клеточного геномов и активация синтеза ДНК вируса и клетки — разными ранними белками, или они связаны с различными зонами одного белка — *T*-антигена.

Транскрипция гена *A* начинается в точке 0,67 ед. карты вирусного генома (за точку нуль принимается разрыв рестриктазой EcoRI) и заканчивается в точке 0,16 ед. карты. Матричная РНК (мРНК) этого гена в полисомах определяется в виде ранней 19 SРНК (5′-конец ее молекулы соответствует 0,57—0,59, а 3′-конец — 0,16 ед. карты). Ген *A*, вероятно, кодирует три ранних белка: *T*-антиген, *TSTA*[1] (tumor specific transplantation antigen — опухолевый специфический трансплантационный антиген с молекулярной массой 55—58 000) и *U*-антиген (молекулярная масса 28—30 000), ассоциированный с ядерным матриксом (Deppert, 1979).

TSTA-антигены, их природа и биологические функции. Антигены *TSTA* и *TSSA* (tumor specific surface antigen) или S (surface — поверхностные, невирионные) не зависят от видового происхождения клеток, то есть в клетках различных животных и человека образуются идентичные белки плазматических мембран, специфичность и синтез которых обусловлены вирусом. Вместе с тем установлено, что синтез *TSTA*-антигенов определяется не только опухолеродным вирусом, но и видовой принадлежностью клеток и не коррелирует с их неопластической трансформацией.

TSTA-антиген локализован в плазматической мембране опухолевых, трансформированных и инфицированных клеток. Экспрессируется он в разной степени как при заражении клеток «диким», то есть обычным типом вируса, так и его ts-мутантами в основном при пермиссивной температуре.

На многочисленных тест-системах ДНК- и РНК-содержащих опухолеродных вирусов показаны строгая специфичность в отношении вируса, индуцирующего их синтез, и тождество этих антигенов во всех опухолях, вызванных данным вирусом независимо от их гистологического типа. *TSTA*-антигены определяются с помощью трансплантационного теста, иммунофлюоресценции, ци-

[1] *TSTA* — антиген, ответственный за противоопухолевый иммунитет, то есть определяющий иммунный ответ организма на трансформированные онковирусом клетки.

тотоксического эффекта и в тесте задержки роста колоний опухолевых клеток in vitro, трансформированных тем или иным онковирусом.

Трансплантационный тест выявляет *TSTA*-антигены по резистентности животных, индуцированной гомологичным или близкородственным вирусом, к трансплантации соответствующих опухолевых клеток (вирусиндуцированная резистентность — ВИР). Помимо опухолеродных вирусов, индукция специфической противоопухолевой резистентности может создаваться путем иммунизации животных живыми и убитыми опухолевыми клетками или их экстрактами, а также зараженными опухолеродными вирусами, но не трансформированными клетками. Кроме того, возможен адаптивный перенос этого иммунитета.

Цитотоксические тесты in vitro и in vivo включают: 1) цитотоксическую реакцию с иммунными лимфоцитами в модели Розенау и Мун; 2) цитотоксическую реакцию с гуморальными антителами; 3) торможение роста колоний опухолевых клеток; 4) инкубацию иммунных лимфоцитов с опухолевыми клетками (клетки-мишени) с последующим их введением сингенным животным. Используются также бласттрансформация в смешанной культуре лимфоцитов и иммунофлюоресценция в непрямом тесте с сыворотками иммунных и резистентных сингенных животных, у которых опухоли рассосались или не возникли после введения в состоянии новорожденности опухолеродной дозы вируса.

Кинетика синтеза поверхностных антигенов А12 с помощью иммунофлюоресценции в клетках фибробластов эмбрионов крыс (ФЭК) и хомяков (ФЭХ), зараженных аденовирусом 12-го типа человека, была исследована А. И. Агеенко с соавт. (1972). В аутологичных системах было описано специфическое свечение мембранных антигенов сарком хомяков А12, сарком мышей СВА, индуцированных аденовирусом обезьян SA7 (С8), и ретикулосаркомы крыс 321-КРС (Агеенко с соавт., 1972; Ерхов, 1972; Агеенко, 1974). Адсорбция иммунных сывороток экстрактами и живыми клетками соответствующих сарком снимала специфическую флюоресценцию поверхностных мембран. Кроме того, новый вируєспецифический антиген на поверхностных мембранах клеток сарком мышей СВА, индуцированных вирусом SA7 (С8), был обнаружен с помощью цитотоксического теста с иммунными лимфоцитами в модели Розенау и Мун в сингенной и аутологичной системах in vitro, в экспериментах in vivo по вирусиндуцированной резистентности и в опытах по непрямой иммунофлюоресценции. Однако проведенные исследования не дают полного основания для утверждения идентичности или отличий поверхностных антигенов, выявляемых этими тремя тестами.

Поверхностные вирусиндуцированные антигены А12 в клетках ФЭК появлялись через 12—14 ч после инокуляции вируса А12 в культуру (Агеенко с соавт., 1972). Таким образом, синтез антиге-

нов предшествует репликации вирусной ДНК и индукции синтеза клеточной ДНК. Следовательно, синтез мембранного антигена связан с функционированием ранних вирусных генов.

Вопрос о сходстве или отличии поверхностных мембранных антигенов, обнаруживаемых разными методами в опухолях вирусного происхождения, окончательно не решен. Более вероятно, что эти антигены идентичны, хотя и могут иметь некоторые отличия за счет белков (в том числе и эмбриональных) клеточного происхождения. Серологически поверхностные антигены отличаются как от *T*-, так и от *V*-антигенов (вирусные структурные белки) вирусов. Факт инактивации протеолитическими ферментами позволяет предположить принадлежность поверхностных антигенов к белкам или связь их с белками. Органические растворители также инактивируют мембранные антигены, возможно, за счет реакции с белками. Перйодат Na, ДНК-аза и РНК-аза не влияют на активность поверхностных антигенов.

Обнаружена способность *TSTA*-антигенов к «слущиванию» с клеточной поверхности, то есть трансформированные клетки могут постоянно терять антигенные структуры, возникающие в процессе вирусного онкогенеза.

Экспрессия *TSTA*-антигенов ДНК- и РНК-содержащих опухолеродных вирусов на клеточной мембране зависит от клеточного цикла, при этом максимальное их выявление происходит в G_1-периоде в асинхронных и в синхронизированных культурах. Отмечено уменьшение в три и более раз относительного содержания *TSTA*-антигенов в *S*-периоде по сравнению с G_1-периодом.

Время максимального накопления *TSTA*-антигенов в клетках, трансформированных ДНК-содержащими опухолеродными вирусами, совпадает со временем накопления *T*-антигена, причем количество *TSTA* в клетках пропорционально множественности инфекции. Установлено, что иммунизация животных убитым вирусом или только очищенными структурными белками вириона не создает специфической резистентности к трансплантации соответствующих опухолей, а вакцинация зараженными, но не трансформированными клетками, свободными от вирусных *V*-антигенов, вызывает специфический противоопухолевый иммунитет. Отмечен эффект стимуляции опухолевого роста при инактивации *TSTA*-антигена прогреванием или обработкой глутеральдегидом. Вирусспецифический поверхностный антиген, выявляемый флюоресцирующими антителами, отличается от вирусного *V*-антигена, так как сыворотки к этим антигенам не дают перекрестных реакций, а сыворотки, полученные при иммунизации мышей опухолевыми клетками, свободными от полного инфекционного вируса полиомы, не содержат вируснейтрализующие, комплементфиксирующие и задерживающие гемагглютинацию антитела (Агеенко, 1974, 1978; Зильбер, Ирлин, Киселев, 1975; Dulbecco, 1976; Anderson e. a., 1977).

Были предприняты попытки исследовать природу *S*- и *T*-ан-

тигенов. С этой целью определяли наличие генома вируса SV 40 в разных линиях клеток хомяка, трансформированных этим вирусом, и связь такого интегрированного генома с *S*- и *T*-антигенами SV 40. Для этого из очищенного вируса выделяли ДНК и на ней как на матрице в системе in vitro с помощью РНК-полимеразы из E. coli синтезировали вирусспецифическую мРНК. Эту мРНК использовали для гибридизации с ДНК из нормальных и трансформированных клеток. Оказалось, что клетки, синтезирующие *T*-антиген, содержали интегрированную ДНК, специфичную для вируса. Однако линии клеток, синтезирующие только *S*-антиген, не содержали заметного количества SV 40-специфической ДНК. В то же время процесс гибридизации был специфичным, так как мРНК, синтезируемая in vitro на ДНК аденовируса 2-го типа, не гибридизировалась с ДНК из S^+T^+-клеток. SV 40-специфическая мРНК была неспособна гибридизироваться с ДНК вируса полиомы.

Следовательно, продукция вирусспецифического *S*-антигена не зависит от сохранения заметных количеств ДНК SV 40 в трансформированных клетках, а синтез *T*-антигенов осуществляется только в тех клетках, в которых присутствуют вирусспецифические мРНК и определенное число эквивалентов вирусных геномов. Весьма вероятно, что большая часть генетической информации для синтеза *S*-антигена транскрибируется с дерепрессированных вирусом локусов клеточного генома. При этом, очевидно, какая-то незначительная информация считывается и с вирусной ДНК, которая может находиться в клеточном геноме в количествах, не улавливаемых при гибридизации.

Информация для синтеза *T*-антигенов транскрибируется с ранних вирусных генов, при этом также возможно частичное считывание с прилегающих участков клеточной ДНК. В том и другом случае вирусспецифические мРНК претерпевают процессинг (модификацию), прежде чем они достигают цитоплазмы, где осуществляется трансляция *S*- и *T*-антигенов. Важно отметить, что вирусная ДНК, включенная в геном клетки, приобретала после этого устойчивость к действию интерферона. Кроме того, синтезированные на нем мРНК также приобретали указанное свойство.

Ингибиторы синтеза клеточных и вирусных ДНК (5-фтор-5-йод-5-бромдезоксиуридин, митомицин *C*, цитозинарабинозид), блокирующие репликацию ДНК, синтез структурных вирусных белков и образование зрелого вируса не влияли на продукцию вирусспецифических мембранных *T*-антигенов SV 40 вирусов, полиома- и аденовирусов. Следовательно, синтез *S*- и *T*-антигенов не требует предварительной репликации вирусной ДНК. Актиномицин D, тормозящий продукцию ДНК-зависимой РНК, и ингибиторы синтеза белка (цилогексимид и пуромицин) полностью подавляли синтез поверхностных вирусспецифических *T*-антигенов, *S*-антигенов и зрелых вирусных частиц. Таким образом, мат-

рицей для синтеза *S*- и *T*-антигенов является вирусспецифическая ранняя мРНК, которая транскрибируется с родительской ДНК до начала репликации вирусной ДНК. Поэтому ингибиторы синтеза ДНК не блокируют продукцию новых вирусспецифических белков и в то же время подавляют образование *V*-антигенов. Матрицей для последних является поздняя вирусспецифическая мРНК, которая синтезируется после репликации вирусной ДНК.

В отношении количественного определения *TSTA*-антигенов и их молекулярной массы до сих пор имеются весьма противоречивые сведения. По данным большинства авторов, молекулярная масса *TSTA*-антигена полиомавирусов составляет около 50—60 000 дальтон (Luborsky e. a., 1976). Другие исследователи (Ito e. a., 1977; Schmid-Ullrich e. a., 1977) определяли от двух до трех вирусспецифических трансплантационных белков в плазматических мембранах при литической инфекции и трансформации с разными молекулярными массами: в системе SV 40 — 90—110 000 (авторы связывают этот белок с *U*-антигеном) и 58 000, а в случае вируса полиомы — 55 000, 61 000 и 28 000 (наиболее стабильным из них был белок в 55 000). 55 000 *TSTA*-антиген интересен тем, что на его синтез влияют обе известные мутации в ранней области генома вируса полиомы: ts-A- и hr-t-мутации (Ito, 1979). С помощью метода пептидных карт продемонстрирована идентичность 55 000 белка из плазматических мембран с ядерным *T*-антигеном. Deppert e. a. (1980) разработали процедуру фиксирования клеток, которая в сочетании с двойным окрашиванием позволяет при иммунофлюоресценции одновременно выявлять поверхностный и ядерный *T*-антигены. Эти данные свидетельствуют, что один из *T*-антигенов ассоциирован с клеточной мембраной. Вероятно, на уровне плазматической мембраны осуществляются первые этапы вирусного онкогенеза.

Анализ имеющегося экспериментального материала позволил отдать предпочтение предположению, согласно которому все ранние белки полиомавирусов, несущие несколько антигенных детерминант: *U*-, *T*- и *TSTA*-антигенов, являются продуктами одного гена *A*. Считают, что мембранный *TSTA*-антиген возникает вследствие частичного действия на ядерный *T*-антиген протеолитических ферментов и посттранскрипционной модификации, а его антигенная специфичность, вероятно, проявляется только при взаимодействии с плазматической мембраной. Это предположение подтверждается биохимическими исследованиями по совместной очистке *T*- и *TSTA*-антигенов, наличию двух детерминант (*U* и *T*) в одном полипептиде, а также иммунологическими исследованиями, показавшими возможность создания противоопухолевого иммунитета (к введению опухолевых клеток) очищенным иммунохимическими методами до высокой степени *T*-антигеном (Anderson e. a., 1977; Chang e. a., 1977; Robb, 1977).

T-антигены. *T*-антигены — продукты гена *A* мелких ДНК-содержащих онковирусов — представляют собой растворимые вы-

сокомолекулярные кислые белки, отделимые от структурных компонентов клетки, не осаждающиеся при 60 000—105 000 и инактивирующиеся при 56°С. *Т*-антигены выявляются прямыми иммунологическими реакциями (реакция связывания комплемента РСК и непрямая иммунофлюоресценция) с сыворотками крови животных-опухоленосителей. Препараты *Т*-антигенов в чистом виде, без примеси клеточных белков, пока не получены. Эти антигены присутствуют в клетках в форме высокомолекулярного комплекса, состоящего, по-видимому, из нескольких субъединиц простых белков с разной молекулярной массой.

Специально проведенные исследования позволили выявить три формы ядерного *Т*-антигена: большой (*Т—А*) — с молекулярной массой 75 000—94 000 дальтон (или, по данным некоторых авторов, 105 000), средний — с молекулярной массой 56—63 000 и малый (t—*А*) — с молекулярной массой 15—22 000 дальтон (Smith e. a., 1978; Linzer e. a., 1979; Michel e. a., 1979; Israel e. a., 1980; Pöckl, Wintersberger, 1980). Показано, что все формы *Т*-антигена синтезируются только при пермиссивной температуре (Deppert, 1980).

Предполагают, что *Т—А* транслируется с помощью мРНК, образованной в результате «сшивания», вследствие которого ковалентно соединяются РНК-последовательности, транскрибируемые с разных участков гена *А*. Иными словами, непрерывной транскрипции мРНК для *Т—А* с области *А* гена не происходит, поскольку списывание информации прерывается в терминирующих триплетах вокруг точки 0,545 ед. карты генома SV 40 (эта область соответствует hr-t-мутации вируса полиомы), то есть около 25% ранней области вирусного генома не кодирует большой *Т*-антиген. Установлено, что на ранней стадии литической инфекции и в трансформированных клетках синтезируется два класса вирусных мРНК, транскрипция которых начинается в общей для них точке 0,67 ед. карты. 5′-конец одной и, по-видимому, другой мРНК картированы в области 0,66 ед. карты поблизости от участка начала репликации ДНК, а 3′-концы обеих молекул мРНК — в участке 0,16 ед. карты. «Бессмысленные» участки ДНК в вирусном геноме — интроны (от лат. intra — внутри), не несущие генетической информации и удаляющиеся из мРНК в процессе «сшивания», локализуются для одной мРНК в области 0,585—0,53 и для другой — 0,535—0,53 ед. карты. Следовательно, ранняя область вирусного генома ген *А* содержит как минимум два самостоятельных гена, кодирующих большой *Т*- и малый *t*-антигены. Сегмент ДНК для малого *t*-антигена локализован в области 0,535—0,600 ед. карты (Thimmappaya, Shenk, 1979).

Важно отметить, что полученная недавно новая информация о строении и функционировании генов высших организмов и вирусов, очевидно, не только изменит наши представления о синтезе белка, но, по-видимому, разрушит центральную догму молекулярной биологии, которая гласит: «один ген — один белок». Оказа-

лось, что гены птиц и млекопитающих содержат целые участки «бессмысленной» ДНК и, следовательно, имеют мозаичную структуру. Вначале с них делается промежуточная копия генетической информации, а затем специальные ферменты вырезают из нее «бессмысленные» куски, после чего сшивают их в одно целое. Только после этой процедуры мРНК поступает на рибосомы и управляет синтезом белка. Вероятнее всего, один ген кодирует несколько белков. Правда, пока со всей категоричностью это утверждать преждевременно. Вместе с тем, по-видимому, вирусы, в том числе и опухолеродные, имеют аналогичное строение генов и идентичный механизм образования их мРНК. В настоящее время интенсивно исследуются интроны на различных системах, в частности, изучается принципиальный вопрос — как монтирующие ферменты различают участки генов, несущие информацию и интроны. Эти исследования важны не только для расшифровки механизмов онкогенеза, но и для практики генной инженерии.

Методом электрофореза в полиакриламидном геле и ионообменной хроматографии триптического фингерпринтирования *T*-антигенов вируса полиомы было показано, что большой и малый *T*-антигены имеют от пяти до семи общих пептидов. Средний и малый *T*-антигены содержат два пептида, которые отсутствуют в большом *T*-антигене. Далее было установлено, что большой и малый *T*-антигены вируса SV 40 обладают одной общей антигенной детерминантой и одной уникальной. С помощью антисывороток, содержащих только антитела против уникальных антигенных детерминант, удалось выявить, что общие антигенные детерминанты локализованы на *N*-концах, а уникальные — на *C*-концах большого и малого *T*-антигенов (Greenfield e. a., 1980). На основании всех представленных данных можно предположить, что три формы *T*-антигена имеют общий NH_2-конец, кодируемый в зоне 0,65—0,59 ед. генетической карты SV 40, но разные COOH-концы. Уникальный полипептид малого *t*-антигена кодируется в зоне 0,59—0,54 ед. генетической карты (Linke e. a., 1979).

В работе Gurney e. a. (1980) с помощью сывороток, содержащих моноклональные антитела против Т-антигенов SV 40, было продемонстрировано наличие индивидуальных подклассов большого *T*-антигена и сходства между невирусными *T*-антигенами. Невирусный *T*-антиген с молекулярной массой от 50 000 до 60 000 дальтон выявлен в пяти линиях клеток разного происхождения, инфицированных или трансформированных вирусами полиомы, SV40 и паповавирусом человека ВК, а также в трех спонтанно трансформированных линиях мышиных клеток. Это обстоятельство указывает на то, что невирусные *T*-антигены из пяти линий клеток млекопитающих имеют по крайней мере одну антигенную детерминанту. Доказано, что фосфобелок массой 53 000 (невирусный *T*-антиген) образует стабильный комплекс с большим *T*-антигеном (McCormick, Harlow, 1980). В этом ком-

плексе обнаружены только два белка — большой и невирусный *T*-антигены, причем оба связаны нековалентными связями. В трансформированных клетках комплекс локализован в ядре. *T*-антиген в комплексе фосфорилируется с большей скоростью, чем в свободной форме. При продуктивной инфекции SV40 не обнаружено ассоциации *T*-антигена ни с одним из клеточных белков. Методом пептидных карт на тонкослойных целлюлозных пластинках Simmons e. a. (1980) провели сравнительный анализ невирусных *T*-антигенов, названных *Tau*-антигенами, из трех разных клеточных линий. Оказалось, что *Tau*-антигены из мышиных и крысиных трансформантов очень сходны, а *Tau*-антиген из человеческих клеток несколько отличен, однако все они имеют общие аминокислотные последовательности.

В лаборатории, руководимой В. С. Шапотом (Онкологический центр АМН СССР), получены данные, свидетельствующие о том, что препараты *T*-антигена SV40 различной степени очистки обладают эндонуклеазной активностью, вызывая ограниченное число разрывов в молекулах ДНК вируса и клетки животных разных видов (Шапот, Шлянкевич, 1976). Воздействие *T*-антигена на вирусную ДНК сопровождается переходом ДНК-I в ДНК-II (кольцевая молекула без надспиральных завитков), коэффициент седиментации снижается с 21S до 16S в нейтральном градиенте сахарозы, что характерно для этого процесса. Эффект наблюдается уже при инкубации в течение 15 мин, причем более продолжительная инкубация не изменяет величины коэффициента седиментации. Анализ в щелочном градиенте сахарозы препаратов вирусной ДНК после обработки их *T*-антигеном показывает, что переход ДНК-I в ДНК-II обусловлен, вероятнее всего, разрывом одной или обеих нитей при сохранении кольцевой структуры молекулы. Этим самым *T*-антиген отличается от вирионной эндонуклеазы, специфичной в отношении однонитевых участков молекулы ДНК. В тех случаях, когда *T*-антиген производит разрывы в разных нитях ДНК, сохранение кольцевой структуры, по-видимому, может обусловливаться водородными связями или же за счет «липких концов». При действии *T*-антигена на нативную ДНК SV 40 или ДНК клетки низкомолекулярные продукты не образуются. Путем хроматографии на сефарозе с иммобилизованными гистонами показано, что *T*-антиген способен связываться не только с ДНК, но и с белковыми компонентами хроматина — гистонами (Шапот с соавт., 1980).

Все формы *T*-антигена содержат фосфорные группы. Edwards e. a. (1979) сравнивали скорость обновления *T*-антигенов со скоростью обновления фосфорных групп. Оказалось, что фосфорные группы обновляются несколько раз в течение жизни белка, с которым они связаны. АТФ-азная активность выявлена только у большого *T*-антигена полиомавирусов (Gaudray e. a., 1980). Эта активность не стимулируется присутствием денатурированной ДНК и ингибируется при добавлении сыворотки против *T*-антигена.

Показано, что *T*-антиген катализирует включение ^{32}P из (γ—^{32}P) АТФ в белок (Griffin e. a., 1979). По данным электрофореза, в полиакриламидном геле (ПААГ) субстратом фосфорилирования служит большой *T*-антиген. Кроме того, высокоочищенный *T*-антиген катализирует включение фосфата в экзогенный акцептор — казеин. При многостадийной очистке наблюдается параллельное обогащение препарата по содержанию большого *T*-антигена и по активности протеинкиназы, причем при седиментации в градиенте оба компонента обнаруживаются в зоне 6 S. Активность протеинкиназы препарата *T*-антигена ts-мутанта SV 40 характеризуется повышенной термолабильностью. Следовательно, *T*-антиген обладает еще двумя ферментативными активностями: АТФ-азной и протеинкиназной, которые ингибируются сывороткой против *T*-антигена.

В серии работ было установлено, что ts-*A*-мутанты паповавирусов при неразрешающей температуре инициируют синтез физически и функционально, но не серологически измененного *T*-антигена, что указывает на корреляцию между *A*-функцией (функция гена А) и *T*-антигеном. Вместе с тем в настоящее время невозможно дифференцировать функции, выполняемые *T-, TSTA-* и *U*-антигенами. Предполагают, что ранние белки SV 40, которые содержат *U*-детерминанты, имеют непосредственное отношение к инициации репликации вирусной ДНК, синтезу, процессингу и транспорту мРНК вируса. Возможно, что зона, содержащая детерминант *U*-антигена, более чувствительна к процессингу, протеолитическому расщеплению, чем участок белковой молекулы, несущий *T*-антигенную детерминанту (Robb, 1979).

Получены данные, позволяющие предполагать участие продукта гена *A* в регуляции транскрипции ранней мРНК паповавирусов (Cogen, 1978). Показано, что *T*-антиген вируса дикого типа перекрывает действие продукта ts-чувствительного *A* гена.

По мнению Birkenmeier e. a. (1979), *T*-антиген регулирует транскрипцию как ранних, так и поздних вирусных генов. В ядрах зараженных клеток в условиях литической инфекции происходит одновременный синтез ранних и поздних мРНК, однако последние подвергаются быстрой деградации. Этот процесс происходит до тех пор, пока не накапливается достаточное количество *T*-антигена, синтезируемого на матрице родительской вирусной ДНК, который затем, закрывая промотор ранней мРНК, приводит, с одной стороны, к накоплению дочерних молекул вирусной ДНК, а с другой — обусловливает синтез и накопление молекул поздней мРНК. Авторы предлагают схему регуляции синтеза и накопления вирусных ранних и поздних мРНК, предусматривающую наличие и одновременное включение в работу двух промоторов и регуляторную функцию *T*-антигена. Аналогичные данные в отношении постоянной необходимости *T*-антигена для эффективной экспрессии поздних вирусных генов были представлены Almine и Khoury (1980).

Martin e. a. (1979) изучали особенности трансформации клеток легкого китайского хомячка (клетки CHL) двойным мутантом вируса SV 40, имеющим ts-*A*-мутацию (термочувствительный большой *T*-антиген) и делецию в районе 0,54—0,59 ед. генетической карты (измененный малый *T*-антиген). Показано, что мутанты вируса SV 40 с делецией в районе 0,54—0,59 ед. не способны трансформировать покоящиеся клетки CHL, но трансформируют растущие клетки. Считают, что для трансформации покоящихся клеток необходим функционально активный малый *t*-антиген, но для поддержания трансформированного фенотипа он не нужен.

Определенный интерес представляет сравнительное исследование 13 линий крысиных клеток, трансформированных вирусом полиомы, на наличие в них, организацию и экспрессию интегрированных последовательностей вирусной ДНК (Luigi e. a., 1980). Вирусные последовательности интегрировались в различные участки клеточной ДНК, причем ни одна из клеточных линий не содержала полностью раннюю область вирусной ДНК. Следовательно, ни в одной из линий не синтезировался большой *T*-антиген (100 000), а происходил лишь синтез среднего (55 000) и малого (22 000) *T*-антигенов. Согласно этим данным, большой *T*-антиген не требуется для поддержания трансформированного состояния, однако для этого необходимы средний и малый *T*-антигены.

Вероятно, роль малого и среднего *T*-антигенов в опухолевой трансформации совершенно независима от роли большого *T*-антигена. Малый *T*-антиген, помимо вышесказанного, действует и на уровне клеточных мембран, обеспечивая выживаемость трансформированных клеток, что было показано на соответствущих мутантах. Представлены факты, дающие возможность предполагать, что средний *T*-антиген, являясь фактором прогрессии вируса полиомы, обусловливает различия между клетками, трансформированными вирусом полиомы и SV 40, и выполняет функцию, отсутствующую в SV 40 (Seif, 1980).

Показана необходимость большого *T*-антигена SV 40 для экспрессии нетранскрибирующихся («молчащих») генов рибосомальной РНК (рРНК) в гибридных клетках человека и мыши (Soprano e. a., 1980). Отмечена также роль этого антигена в увеличении процессов транскрипции и трансляции в первичных клетках почек мышей после заражения последних вирусами полиомы и SV 40 (Pöckl, Wintersberger, 1980). В зараженных клетках продолжают синтезироваться все РНК, ранее синтезировавшиеся в незараженных клетках, однако не исключен и синтез дополнительных ее видов. На основании данных in vitro и in vivo, а также экспериментов с гибридизацией вирусов, Baserga e. a. (1980) показали, что *T*-антиген SV 40 реактивирует «молчащие» гены рРНК. Так как синтез рРНК коррелирует со скоростью пролиферации клеток, нельзя исключить, что *T*-антиген может стимулировать клеточную пролиферацию, воздействуя на рибосомальные гены. В

трансформированных SV 40 клетках, положительных по *T*-антигену, это выражается в возникновении практически неограниченной способности клеток к делению, в то время как в нетрансформированных, нормальных клетках такая способность лимитирована.

Описано влияние малого и большого *T*-антигенов на актинсодержащую сеть клеток в культуре (Graessmann e. a., 1980). Исчезновение актиновых фибрилл находится под контролем малого, а не большого *T*-антигена SV 40.

Итак, полученные результаты на различных тест-системах вируса полиомы дают основание предполагать, что: 1) наличие большого *T*-антигена необязательно для поддержания трансформированного фенотипа; 2) только одного малого *T*-антигена недостаточно для полной экспрессии трансформированного фенотипа; 3) по-видимому, средний *T*-антиген является тем белком, который вызывает полную экспрессию трансформированного фенотипа клеток.

Существуют две группы мутантов по ранней области генома вируса полиомы: температурозависящие — ts—*A* и мутанты, зависящие от круга хозяев — hr—t. Недавно был выделен и частично охарактеризован новый делеционный мутант по ранней области — мутант 45 (Mary e. a., 1980). Эта мутация представляет собой делецию (нехватка сегмента) в 66 пар оснований в области между hr—t- и ts—*A*-мутациями. Мутант 45 инициирует репликацию вирусной ДНК и способен трансформировать клетки, однако при инфицировании синтезируются средний и большой *T*-антигены меньшей молекулярной массы.

Как уже отмечалось, вирусы полиомы и SV 40 сходны по многим параметрам. Вместе с тем к настоящему времени накопились экспериментальные факты, указывающие на то, что функция *ts-A* SV 40 несколько отличается от функции, назовем ее *ts-a,* вируса полиомы. Прежде всего функция гена *A* вируса полиомы — это инициация трансформации, а продукт гена А вируса SV 40 необходим и для поддержания трансформированного фенотипа. Второе различие указанных вирусов—существование у вируса полиомы дефектных по трансформации hr-t-мутантов. Для вируса SV 40 такие мутанты не описаны. Однако мутант вируса SV 40 с делецией в районе 0,54—0,59 ед. генетической карты (dl-мутант) совпадает с hr-t-мутацией на ДНК полиомы. Fluck и Benjamin (1979), используя два подхода — клональный анализ для ts-a/A-мутантов) и абортивную трансформацию (для всех мутантов) — провели сравнительный анализ мутантов всех четырех типов для выяснения роли ранних генов в установлении и поддержании трансформации. Оказалось, что ts-a/A-мутанты сохраняют способность вызывать абортивную трансформацию, то есть ведут себя как вирус дикого типа при непермиссивной температуре, hr-t-мутанты не обладают такой способностью, а у делеционных мутантов она снижена. По мнению авторов, ts-a/A-функция нуж-

на только временно — для инициации трансформации, а dl/hr-t-функции осуществляют поддержание трансформированного фенотипа.

Молекулярная модель неопластической трансформации паповавирусов

Трансформация клеток in vitro. Основные свойства, отличающие трансформированные клетки от родительских нормальных, суммированы в табл. 1. Эти особенности, общие для клеток, трансформированных РНК- и ДНК-содержащими онковирусами,

Таблица 1. Изменения, индуцированные онковирусом, в трансформированных

Способность клеток к росту		Структура и функции мембран	Синтез нуклеиновых кислот, гистонов
In vitro	In vivo		
В среде с низкой концентрацией сыворотки	При трансплантации изологичным или гомологичным животным	Появление новых вирусиндуцированных и вируспецифических антигенов (TSTA, TSSA и др.), что указывает на прямую трансформацию соответствующими онковирусами	Стимуляция синтеза хромосомной и митохондриальной ДНК, гистонов и ферментов, участвующих в синтезе ДНК
В агаре или метоцеле			Стимуляция синтеза мРНК
В среде с высокой концентрацией клеток		Наличие рецепторов, связывающих растительные агглютинины (лектины)	
На монослое нормальных клеток		Изменение состава гликолипидов, гликопротеидов и повышение активности гликозилтрансфераз	
Неориентированный, хаотичный рост		Снижение содержания или исчезновение типоспецифического высокомолекулярного гликопротеида	
		Снижение уровня ганглиозидов	
		Усиление связывания орнитин-лейцина	
		Снижение уровня УДФ-ацетилгалактозаминилгематозид-N-ацетилгалактозализинтрансферазы	
		Снижение контактного торможения движения. Уменьшение межклеточных контактов	

не являются для них уникальными и абсолютными, поскольку в той или иной мере присущи инфицированным клеткам, а также нормальным длительно пассируемым или быстрорастущим, делящимся клеткам. Многие из признаков, перечисленных в табл. 1, можно индуцировать обработкой нормальных клеток протеолитическими ферментами или добавлением в культуру нормальных клеток высоких концентраций сыворотки и др. Вместе с тем в совокупности эти свойства (главным образом, такие, как многослойный, трехмерный рост, являющийся основным отличием злокачественно трансформированных клеток от их нормальных прототипов в однослойных культурах на стекле, способность к росту в агаровой среде и др.), особенно при сопоставлении клонированных популяций в одинаковых условиях с контрольными культу-

клетках

Энергосинтез	Биосинтез	Биохимические изменения	Морфологические и цитогенетические изменения
Унификация спектра изоформ ключевых ферментов энергетического обмена в цитоплазме и ядре	Снижение синтеза высокоспециализированных белков	Интенсификация гликолиза и повышение концентрации свободных радикалов	Появление хромосомных аберраций
	Усиление синтеза неспецифических белков на полирибосомах	Усиление и изменение активного транспорта сахаров	
	Снижение синтеза коллагена и гиалуроновой кислоты и активности коллагенгликозилтрансферазы	Увеличение протеолитической активности	
		Снижение концентрации цАМФ	
		Повышение активности тРНК-метилазы	

рами, являются надежными критериями неопластической трансформации клеток in vitro.

Очень важно, что изменение характера роста трансформированных клеток — наследственно закрепленное свойство, которое не зависит от размножения вируса. Это свойство присуще и клонам, полученным от одной трансформированной клетки, что дает возможность количественно учесть частоту трансформации клеток, инфицированных опухолеродным вирусом. К настоящему времени трансформация in vitro клеток из тканей практически воспроизведена всеми известными онковирусами, за исключением лимфолейкозной группы онкорнавирусов. Статистический анализ многих из этих тест-систем показал, что каждый фокус трансформации может быть индуцирован одной вирусной частицей. Это позволяет по числу фокусов трансформации в данной культуре, зная дозу вируса, определить трансформирующий титр вируса в фокусообразующих единицах (ФОЕ).

Трансформация in vitro, вероятно, так же как и in vivo, осуществляется многоэтапно. Определенный параллелизм прогрессии трансформированных клеток при культивировании и в организме животного позволяет отождествлять некоторые факты, полученные при исследовании процесса неопластического превращения в этих двух системах. Появление и развитие всех свойств, характерных для бластоматозной клетки, как правило, не коррелируют во времени. Следовательно, уже в первично трансформированных (инфицированных онковирусом) клетках проявляется основной принцип независимости прогрессии отдельных признаков. Такие клетки чаще всего отличаются по своим свойствам как от нормальных, так и от опухолевых клеток.

При исследовании трансформации in vivo можно более четко проследить последовательные стадии опухолевой эволюции клеток, первично контактировавших с онкогенными вирусами. С помощью метода клонирования удалось установить, что на первой стадии трансформации были только однослойные колонии, при пассировании которых возникали фокусы морфологически измененных клеток с многослойным ростом в монослойной культуре. Обратного перехода не отмечалось. Опухоли in vivo возникали только при трансплантации клеток из многослойных колоний (Dulbecco, 1976). Вместе с тем разработаны методические приемы для получения ранней трансформации, главным образом под действием онкорнавирусов. Например, RSV (штамм Шмидта-Руппина) через 14 ч вызывал трансформацию клеток куриного эмбриона, а в течение 24 ч — более 90% инфицированных клеток (Hanafusa, 1970). В этом случае применялся ДЭАЭ-декстран, который резко усиливал прикрепление вируса к клеткам и активировал их размножение после инфицирования. Одним из важных факторов быстрого изменения культуры явилась синхронность клеточного деления. Для выявления морфологических изменений достаточным оказался один цикл их деления.

При исследовании взаимодействия RSV с клетками млекопитающих установлено, что эффективность проникновения этого вируса довольно высока и в ряде случаев не отличается от таковой для куриных эмбрионов (Bader, 1972). Однако эффективность трансформации значительно ниже: лишь 1/25—1/500 часть клеток, содержащих вирус, действительно трансформируется; доказательством служит наличие ревертантов, морфологически не отличимых от нормальных клеток. И те и другие содержат геном RSV (доказывается индукцией полного, инфекционного RSV методом искусственных гетерокарионов, создаваемых с помощью инактивированного вируса Сендай). Трансформированные клетки продуцировали бóльшее количество фокусов, ревертанты — значительно меньшее. Уровень продукции вирусных частиц находился в прямом соотношении с уровнем продукции вирусспецифической РНК.

Анализ материала вирусного онкогенеза свидетельствует о том, что ранние метаболические изменения, индуцированные в инфицированных и трансформированных опухолеродным вирусом клетках, довольно часто близки и тождественны. Это относится прежде всего к ферментному составу и антигенной структуре клеток, включая поверхностные мембраны. Вероятно, эти изменения происходят в значительной клеточной массе, то есть в большинстве клеток, поскольку они фиксируются биохимическими и иммунологическими методами при исследовании клеточных гомогенатов. Такие перестройки в синтезе белков, по-видимому, с одной стороны, способствуют выходу трансформированных клеток из-под контроля регулирующих рост механизмов организма, а с другой — позволяют им успешно конкурировать с нормальными клетками за важнейшие метаболиты. Существенно, что при этом первичное воздействие химических канцерогенов вызывает ненаследуемые изменения — модуляции (соответствует термину «модификация», принятому в общей генетике). В то же время действие онковируса сопровождается наследственными изменениями клеток, которые при последующих пассажах усиливаются. Следовательно, первичный эффект опухолеродных вирусов сразу носит генетический характер. Как в том, так и в другом случае трансформированные клетки селектируются по жизнеспособности и потенции к росту. Естественно, преимущество получают клетки, менее чувствительные к действию факторов, блокирующих репликацию ДНК.

У подавляющего большинства трансформированных клеток в той или иной степени утрачиваются признаки, характерные для функционально полноценных клеток взрослого организма. Во многих неопластически измененных клетках снижен или полностью отсутствует синтез органоспецифических антигенов и в то же время возобновлен синтез эмбриональных белков. Нельзя исключить, что под действием онковируса в трансформированных клетках имеет место реверсия механизмов генетического контроля к эмбриональному типу регуляции, которая включает в работу в

основном гены, дающие информацию для синтеза ранних эмбриональных антигенов. Об этом свидетельствует сходство между опухолью и эмбриональной тканью (зафиксированное на разных тест-системах) по изоферментному спектру пируваткиназы, некоторых аминотрансфераз эмбрионального типа, ЛДГ, аденилаткиназы, глутаминазы, ДНК-полимеразы и других, а также по эмбриональным типам мРНК и тРНК-метилазы (имеется в виду не только повышение метилирования тРНК, но и первичная структура этих полинуклеотидов).

Следовательно, изменение уровня дифференцировки представляет собой обычное свойство трансформированных клеток. Однако при этом не происходит возврата к полипотентной эмбриональной клетке, и злокачественно трансформированная клетка лишь в редких случаях оказывается компетентной к действию эмбриональных индукторов. Важно отметить, что синтез эмбриональных белков, изоформ различных ферментов и РНК не является уникальным свойством опухолевых клеток. Аналогичные синтезы могут быть индуцированы неспецифическими воздействиями, например, алкогольным повреждением печени или при вирусном гепатите, атрофии мышц и др. Неспецифические индукторы могут быть причиной появления на клеточной поверхности гетероорганных и органоспецифических антигенов, негомологичных поврежденной клетке. Этот тип дисдифференцировки описан и при опухолевой трансформации.

При дисдифференцировке в опухолевой клетке наблюдается, как правило, изолированная активация определенного индивидуального синтеза. Правда, в некоторых случаях оказывается активированным синтез нескольких различных гормонов, в норме являющихся специфическими продуктами разных эндокринных желез. Такие эктопические синтезы, вероятно, могут происходить, с одной стороны, по аналогии с бактериальными, вследствие активации структурного гена в обход обычной системы его регуляции, а с другой — благодаря гибридизации клеток.

При перераспределении функционирования клеточного генома в процессе опухолевой трансформации могут возникать индивидуальные синтезы, обусловливающие определенную специфику неопластически измененных клеток. Существенно, что такая перестройка происходит в пределах функционирования нормального клеточного генома, то есть проявляющиеся наследственные отличия опухолевых клеток имеют место в онкогенезе и при клеточной дифференцировке, а затем появляются вновь, но уже в злокачественно трансформированной клетке.

Особый интерес представляет сравнительный морфометрический электронно-микроскопический анализ нормальных и трансформированных онковирусом клеток с целью выявления ультраструктурной специфики последних (Ягубов, Агеенко, 1975; 1977; Агеенко, Ягубов, Виторган, 1977). Клетки культур нормальных тканей в процессе их малигнизации опухолеродными вирусами

подвергаются значительной структурной реорганизации, которая выражается в интенсивной редукции эргастоплазмы и значительном возрастании количества полирибосом. Это свидетельствует о том, что при вирусном онкогенезе происходят глубокие изменения во взаимоотношении экстра- и интрацеллюлярного белкового синтеза, направленные в сторону усиления синтеза субстратов, необходимых для роста и размножения клеточной популяции на полирибосомах, и снижения синтеза высокоспециализированных белков, характеризующего уровень функциональной компетенции клеток и осуществляемого преимущественно эргастоплазмой.

Структуры клеток, трансформированных разными типами опухолеродных вирусов (РНК- и ДНК-содержащими), достоверно отличающиеся от структуры нормальных исходных клеток, имеют много общего. Поскольку параметры структурной организации исходных клеток колеблются в очень широких пределах, то такое сходство в тонком строении трансформированных клеток подтверждает возможность наличия для них единого структурно-функционального уровня независимо от причины, вызвавшей эту трансформацию.

Вместе с тем количественный анализ позволяет дифференцировать особенности структурной перестройки при действии на клетку РНК- или ДНК-содержащих онковирусов. Эти особенности заключаются не в различии конечных результатов воздействия, а в динамике самого процесса. Для морфологического статуса клеток, зараженных аденовирусом 12-го типа человека (А12), характерен определенный латентный период (3—7 суток), после чего начинается интенсивная структурная перестройка белоксинтезирующего аппарата. Вирус саркомы Рауса реализует свой трансформирующий эффект непосредственно после инфицирования. Если выявленные отличия представляют общую для РНК- и ДНК-содержащих опухолеродных вирусов закономерность, то, по-видимому, имеются предпосылки к созданию морфологического теста идентификации групповой принадлежности вируса по характеру проявления его трансформирующего эффекта.

Морфометрический анализ позволил определить и специфику структурной перестройки клеток при их интактном культивировании, в процессе которого также снижался уровень морфологической организации эргастоплазмы, однако более плавно, чем при вирусном онкогенезе. В отличие от трансформации при интактном культивировании отмечается значительная редукция полирибосомного аппарата, что в совокупности с редукцией эргастоплазмы представляет постепенное снижение структурно-функционального статуса всего белоксинтезирующего аппарата клетки в динамике этого процесса.

Данные количественного анализа клеток, высаженных на стекло, убеждают в том, что при этом весьма существенно изменяется их морфологический статус. Наблюдаемая структурная перестройка характеризуется особой спецификой, которая выра-

жается в резкой редукции эргастоплазмы и значительном возрастании уровня морфологической организации митохондрий, степень развития свободного полирибосомного аппарата статически не изменяется. В целом обнаруженные особенности отличают процесс высадки клеток на стекло как от интактного культивирования, так и от вирусного онкогенеза.

Анализ усредненных показателей уровня морфологической организации нормальных и опухолевых клеток выявил определенные среднестатистические отличия между ними. Для клеток нормальных тканей характерны высокая структурная организация эргастоплазмы и относительно слабое развитие свободного полирибосомного аппарата. Опухолевым клеткам, наоборот, присущ очень высокий уровень организации полирибосомного аппарата на фоне резко редуцированной эргастоплазмы. При этом общие характеристики статических тенденций структурной организации нормальной и опухолевой клеток в моделях in vivo и in vitro имеют большое сходство.

Таким образом, существенно, что общность выявленных статических тенденций, определяющих различия в морфологии нормальной и опухолевой клеток, позволяет на практике не только регистрировать характер динамики морфологической перестройки при действии канцерогенного фактора, но и проводить сравнительную оценку структурной организации трансформированных клеток, то есть в морфологическом аспекте фиксировать злокачественное перерождение.

Наконец, сравнение тонкого строения трансформированных клеток с морфологией клеток опухолевых культур и тканей показало, что при вирусном онкогенезе клетки культур нормальных тканей приходят к уровню своей структурной организации, очень близкому к характерному для клеток опухолей. При этом, исследуя какую-либо группу клеток данного гистогенетического ряда, можно судить о том, являются ли эти клетки опухолевыми или нормальными по соотношению степени развития эргастоплазмы, полисом, энергетического аппарата (по коэффициентам уровня морфологической организации эргастоплазмы $К_э$, полисом $К_п$ и митохондрий $К_м$). Вместе с тем установить конкретные цифровые соотношения для данного признака, характеризующие указанное различие, довольно сложно из-за небольшой амплитуды $К_м$ в спектре исследованных в настоящей работе нормальных клеток. Сравнительный анализ нормальных и опухолевых клеток показал, что степень дифференцировки, характеризующая нормальные клетки, и степень злокачественности, характеризующая клетки опухоли, не являются аналогичными признаками. Опухолевые клетки, скорее всего, имеют свои пути развития, отличающиеся от процессов дифференцировки нормальных клеток. Следовательно, злокачественные клетки представляют собой системы, в которых четко проявляется, с одной стороны, эпигеномное действие онковируса (нарушение механизмов транскрипции и посттранс-

крипционных модификаций), а с другой — постоянная независимая прогрессия отдельных бластомогенных признаков.

Учитывая данные экспериментов с ts-мутантами и по реверсии трансформированного состояния, следует подчеркнуть, что злокачественность — состояние менее устойчивое, чем статус нормальной клетки, и в ее снижении заметная роль, вероятно, принадлежит сдвигам хромосомного баланса. Чтобы опухолевые клетки оставались жизнеспособными, приобретая селективные преимущества по частичной автоматизации вследствие изменений в метаболизме, им, по-видимому, необходимы многие свойства, присущие исходным нормальным клеткам. Об этом свидетельствует и морфометрический анализ, показавший на основании сопоставления величин $К_э/К_п$ и $К_м$ нормальных и опухолевых клеток, что выявляемые отличия обусловлены не преобладанием развития какой-либо одной системы органелл над развитием другой. Таким образом, поиск различий в специфике отдельных органелл нормальных и опухолевых клеток нецелесообразен, и, как показал количественный анализ, эти отличия состоят в другом. Так, если соотношения $К_э/К_п$ одинаковы, т. е. меньшим значениям $К_э$ соответствуют бóльшие значения $К_п$ в опухолевых и нормальных клетках, то соотношения между $К_э/К_п$ и $К_м$ у них различны.

Организация клеточной поверхности при трансформации. В последние годы установлено, что молекулярная организация и физиологическое функционирование клеточной поверхности имеют первостепенное значение как в процессах нормальной жизнедеятельности многоклеточного организма, так и при различных видах патологии. В первую очередь это относится к неопластической трансформации клеток, поскольку в основе механизма онкогенеза лежит нарушение структуры и функции плазматической мембраны, выводящее клетку из-под межклеточного и гомеостатического контроля.

Инфекция РНК- и ДНК-содержащими онковирусами прежде всего сопровождается изменениями клеточных мембран (см. табл. 1). Большинство этих изменений, ассоциированных с трансформацией, вероятнее всего, представляют собой нормальные свойства быстрорастущих нетрансформированных клеток и являются вторичными. Изменения клеточной поверхности могут влиять на многие свойства клеток: физико-химические, обеспечивающие прикрепление и гибкость мембран и необходимые для обеспечения подвижности и деления клеток; связывание обычных питательных веществ или специфических факторов роста, специфических ионов и проницаемость для них, что может нарушать систему трансляции сигналов, обусловливающих контроль синтеза ДНК, клеточного деления, синтеза специфических белков и соответствующих мРНК, то есть воздействовать на процессы дифференцировки и обмен в плазматических мембранах. Естественно, что все изменения, индуцированные опухолеродным вирусом в плазматических мембранах, очевидно, определяют и основные

биологические свойства злокачественно трансформированных клеток: неконтролируемое деление, инфильтративный, инвазивный рост, метастазирование и др.

Объектом исследований структуры и функции плазматических мембран часто являются клеточные рецепторы. Под этим весьма емким термином, по-видимому, следует понимать фенотипическое выражение активности генетического аппарата клетки, которое проявляется в формировании на ее поверхности макромолекулярных структур, вступающих в специфические реакции взаимодействия с биологическими и небиологическими веществами экзогенной (вирусы, различные мутагены, в том числе канцерогены, и др.) и эндогенной (гормоны, медиаторы, нуклеиновые кислоты и др.) природы.

Именно наличие определенного рецептора прежде всего обусловливает возможный контакт вируса с той или иной клеткой. Например, клетки лейкоза Молони на мембране несут рецепторы для инфицировавшего их вируса и практически не имеют соответствующих специфических участков для связывания с тимотропным вирусом AKR (Baird e. a., 1977). Напротив, *Т*-лимфоциты мышей, трансформированные вирусом AKR, не содержат рецепторов к вирусу Молони, однако на их оболочке находятся многочисленные участки для связывания вируса AKR. Если ь популяции трансформированных *Т*-лимфоцитов подавляющее большинство клеток имеет рецепторы для связывания соответствующего вируса, то в нормальном тимусе такими рецепторами обладают лишь единичные клетки. Следовательно, логично предположить, что любая тимусная лимфома, как впрочем, вероятно, и другие новообразования, представляет собой клональное разрастание отдельных клеток, присутствующих в нормальном тимусе или каком-либо другом органе и способных взаимодействовать с соответствующим опухолеродным вирусом.

Одним из показателей изменения плазматической мембраны при действии РНК- и ДНК-содержащих онковирусов на клетку является возникновение на ее поверхности рецепторов для растительных агглютининов (лектинов), в частности, для конканавалина А (агглютинин зародыша пшеницы) или синтетического кополимера орнитин-лейцина (см. табл. 1). При трансформации клеток указанные рецепторы становятся доступными для этих агглютининов, причем высвобождение последних коррелирует с насыщающими плотностями неопластически измененных клеток. Клеточные линии, обладающие слабым ростом при высоких концентрациях клеток, плохо агглютинируют.

Установлено, что ts-мутанты, неспособные трансформировать клетки, также не могут индуцировать характерные изменения в плазматических мембранах. Рецепторный комплекс для агглютининов, состоящий из мембранных белков и N-ацетилглюкозамина, выполняющего функции гаптена, выделяется в раствор после гипотонического шока клеток. Оказалось, что аналогичные или

близкие по свойствам рецепторы присутствуют на мембранах практически всех неопластически измененных клеток (включая клетки спонтанных опухолей) независимо от причины, вызвавшей эту трансформацию.

Рецепторы для растительных агглютининов, обнаруживаемые на плазматических мембранах трансформированных клеток, являются нормальными структурами клеточной поверхности. Об этом свидетельствует возможность их индукции различными протеазами (трипсин, папаин, фицин), после предварительной инкубации с которыми нормальные клетки приобретают временную способность агглютинироваться. Однако протеазы не делают клетки более агглютинабельными, чем трансформированные клетки с наивысшей насыщающей плотностью. Рецепторы, высвобождаемые из плазматических мембран нормальных клеток после обработки трипсином, качественно близки рецепторам трансформированных клеток. Такие же рецепторы обнаружены и на мембранах при митотическом делении. По окончании митоза поверхность нормальных клеток приобретает исходную структуру. При воздействии онковируса структура плазматической мембраны, как предполагают, не восстанавливается и сохраняет «митотическую» конформацию, обеспечивающую постоянную стимуляцию митоза.

Инфекция клеток млекопитающих экзогенными и эндогенными онкорнавирусами мышей приводит к резкому возрастанию агглютинационной активности при обработке клеток конканавалином А или лектином проросшего зерна и обычно сопровождается утратой поверхностного гликопротеида (LETS) с молекулярной массой 210 000 (Noonan e. a., 1976). Последующая трансформация химическим канцерогеном не изменяла агглютинационной активности клеток. Свойства плазматической мембраны зараженной клетки в данном тесте становятся сходными со свойствами оболочки инфицирующего вируса. Это, по-видимому, свидетельствует о вирусспецифической природе лектиновых рецепторов на поверхности зараженной клетки. При изучении одной из линий клеток, трансформированной вирусом полиомы, выявлено присутствие белка LETS, несмотря на выраженность трансформированного фенотипа клеток. Подобное разделение двух «характеристик трансформации» обнаружено и при инфекции R—MuLV (Noonan e. a., 1976). Таким образом, эти свойства могут контролироваться независимо друг от друга.

Выявлена прямая зависимость клеток, трансформированных онкорнавирусами сарком, от их способности поддерживать репродукцию вирусов и агглютинироваться конканавалином А. На этом основании предлагают использовать агглютинационный тест в качестве показателя экспрессии информации, присутствующей в геноме онкорнавирусов.

Анализ трансформированных онковирусами клеток позволил обнаружить варианты, у которых поверхностные мембраны могли полностью ревертировать к структуре нормальных клеток, что

также определялось с помощью агглютинационного теста. У таких ревертированных клеточных вариантов резко снижались эффективность клонирования в агаровой среде и способность роста при высокой концентрации клеток (Dulbecco, 1976). Ревертированные клетки не могут размножаться при 41°С. В отличие от родительских трансформированных клеток ревертанты по рецепторам к конканавалину А вновь обрели способность контактного торможения при взаимодействии как друг с другом, так и с исходными клетками. Таким образом, ревертированные клетки приобрели много свойств, характерных для нормальных клеток, однако, несмотря на это, они, так же как и родительские, оставались злокачественными. Следовательно, рецепторы для растительных агглютининов, часто ассоциированные с опухолевой трансформацией, не являются обязательным признаком злокачественности.

Помимо появления на плазматических мембранах рецепторов, вирусиндуцированных и вирусспецифических антигенов (*TSTA, TSSA,* ts-гликопротеидов и др.), в процессе трансформации онковирусом происходят изменения ткане- и органоспецифических белков на клеточной поверхности (см. табл. 1) (Bauer e. a., 1976). Эти изменения высокоспециализированных белков, вероятно, связаны с перестройкой функционирования клеточного генома и структурной реорганизацией белоксинтезирующего аппарата.

Предполагают, что детерминация стволовых клеток ассоциирована с синтезом специфических белков плазматических мембран. Причем все соматические клетки содержат уникальные наборы полипептидных цепей на поверхностных мембранах (за исключением одного клона), которые обеспечивают их специфическое слипание и направленную миграцию к местам окончательной локализации. Действительно, на системе бактериофагов установлено, что самосборке белковых структур, в основе которой лежат аллостерические изменения комплекса белков, принадлежит существенная роль в морфогенезе. Следовательно, нельзя исключить, что стабильные изменения белкового состава плазматических мембран, с одной стороны, могут способствовать освобождению таких клеток от межклеточного контроля, а с другой — через естественные регуляторные пути постоянно стимулировать неконтролируемое деление.

Гликопротеид LETS. Гликопротеид LETS с молекулярной массой 200—250 000 дальтон является одним из факторов, определяющих трансформацию и малигнизацию. Этот белок локализуется на поверхности нормальных клеток и исчезает с нее в процессе неопластического превращения клеток, либо его количество резко уменьшается (Noonan e. a., 1976). LETS-гликопротеид обладает способностью секретировать в окружающую среду и играет существенную роль в контроле роста нормальных клеток в начале G_1-периода клеточного цикла. При выходе нормальных клеток из-под контроля роста уровень LETS постепенно снижается и до-

стигает минимальной величины в митозе (Hynes, 1976). Именно этим обстоятельством скорее всего можно объяснить уменьшение или полное исчезновение гликопротеида LETS при опухолевой трансформации. Если LETS, изолированный из нормальных клеток, добавлять к различным трансформированным клеткам, происходит нормализация клеточной поверхности (Ali e. a., 1977). При этом клетки восстанавливают контактную ингибицию, приобретают усиленную адгезию к субстрату и начинают расти однослойно. Этот эффект быстро снимается слабой обработкой трипсином, удалявшим добавленный гликопротеид, или путем предварительной обработки LETS антисывороткой к нему (Ali e. a., 1977).

Специфический вирусный инициатор синтеза ДНК. К настоящему времени накопилось достаточное число работ, свидетельствующих о том, что синтез клеточной и вирусной ДНК, трансформация и *Т*-антигены взаимосвязаны. Согласно предположениям, высказанным в этих исследованиях, *Т*-антиген (специфический вирусный инициатор) связывается с родительской вирусной ДНК (с хроматином) в точке 0,67 ед. карты генома SV 40 и превращает ее в репликатор, откуда начинается синтез ДНК (Jakob e. a., 1980). Установлено также, что хромосомы всех инфицированных клеток связаны с *Т*-антигеном, который распределен по хромосомам с определенной закономерностью, повторяющейся в 500 исследованных препаратах (D'Alisa, Gershey, 1978). Вместе с тем играет ли *Т*-антиген структурную либо функциональную роль, или же связывание обусловлено структурой хромосом клетки, остается неясным. Не выяснен также механизм неопластического превращения клетки под действием ранних белков паповавирусов, то есть как реализуется бластомогенная потенция вируса. Совокупность имеющегося материала позволяет предполагать, что трансформированный фенотип характеризуется взаимодействием, вероятно, трех типов механизмов: 1) ранними вирусными белками — продуктами онкогенов; 2) изменениями в клетке, индуцированными опухолеродным вирусом; 3) определенными функциями клетки.

Широкая комплексность биологического эффекта *А*-гена полиомавирусов, очевидно, может быть вполне правдоподобной, поскольку, во-первых, обнаружено, что активация этого гена прямым или непрямым путем коррелирует с регуляцией системы циклических нуклеотидов, играющих важную роль практически во всех видах обмена веществ в клетке в их фенотипическом проявлении (Агеенко, 1978). Однако механизм, вызывающий этот комплекс, пока неизвестен. Во-вторых, многообразие биологического эффекта гена *А* можно свести к двум главным функциям: интеграции и индукции синтеза ДНК, которые, в общем, обусловливают все последующие проявления как процесса трансформации, так и инфекции. При этом важно отметить, что большинство изменений поверхностных цитоплазматических мембран, ассоции-

рованных с трансформацией, вероятнее всего, представляют собой нормальные свойства быстрорастущих нетрансформированных клеток.

Центральным событием при трансформации, как уже отмечалось, является специфическая интеграция, поскольку она необходима для трансмиссии и экспрессии гена *A*. Начальное присоединение вирусной ДНК к клеточной хромосоме до комплементарного спаривания может осуществляться, как предполагают, посредством продукта гена *A*—*T*-антигена, который обладает способностью связываться с вирусной ДНК и клеточным хроматином. Присутствие одной копии гена *A* достаточно для трансформации, однако, как правило, неопластически измененные клетки содержат несколько копий либо всего вирусного генома, либо отдельных его фрагментов (Sambrook, 1977; Tenen e. a., 1977). Экспрессия *A*-гена контролируется по крайней мере частью функций клетки-хозяина и, по-видимому, может быть детерминирована хромосомными участками, куда вирусная ДНК интегрирована. Иными словами, функция *A* интегрированного вирусного генома не является полностью автономной.

Предложена общая гипотетическая схема регуляции синтеза вирусной и клеточной ДНК, согласно которой трансформация зависит от инициации синтеза вирусной ДНК белком, кодирующимся *A*-геном. *T*-антиген действует на репликатор вирусной ДНК, который по структуре близок или идентичен репликатору клеточной ДНК. Поэтому *T*-антиген может активировать репликацию клеточной и вирусной ДНК одновременно. По-видимому, *T*-антиген инициирует репликацию ДНК в участке, обычно не реплицирующемся в нетрансформированных клетках. Недавно были представлены данные, свидетельствующие о том, что SV 40 трансформированные клетки содержат больше участков репликации ДНК, чем нетрансформированные клетки (Tenen e. a., 1977). По мнению авторов, происходит это вследствие того, что в трансформированных клетках наряду с нормальными инициаторными точками (N-sites) возникают новые, активированные *T*-антигеном (T-sites). Причем электронномикроскопически было показано, что размер репликона в трансформированных клетках вдвое меньше, чем в нормальных. Функционирование всех точек инициации в трансформированных клетках происходит независимо. Синтез ДНК в условиях «голодной» среды культивирования активируется лишь *T*-антигеном, то есть, по-видимому, *T*-антиген является универсальным инициатором синтеза вирусной и клеточной ДНК. Функция белка инициатора, согласно одной из существующих моделей репликации ДНК, заключается в первичном специфическом связывании клеточных белков, в частности, «подвижного» промотора, с точкой начала репликации ДНК. Затем, функционируя в определенной последовательности, клеточные ферменты (РНК-полимераза и др.), участвующие в репликации ДНК, осуществляют этот процесс.

Проявление функции *A* интегрированного генома определяется тем, в какие участки генома клетки встраивается вирусная ДНК. Предполагается, что полная трансформация клеток наступает в том случае, когда вирусный геном интегрируется в участки клеточного генома, активные в G_1-периоде клеточного цикла. В таких клетках функция *A* максимально активна, а *T*-антиген, синтез которого зависит от фаз клеточного цикла (увеличение синтеза начинается в G_1-, нарастает в S- и достигает максимума в G_2-фазе), резко положителен. При функционировании вирусного генома в составе генов G_0- и G_2-периодов клетки имеют промежуточный фенотип и не всегда (в процессе прохождения клеточного цикла) положительны по *T*-антигену. Следовательно, модель объясняет механизм нарушения синтеза ДНК в трансформированных клетках и особенности экспрессии вирусного генома в разных периодах клеточного цикла.

Вирусные и клеточные факторы, обусловливающие опухолевую трансформацию. Учитывая сложный комплекс новых биологических свойств, присущих злокачественной клетке, а также тот факт, что столь незначительный генетический материал, привносимый мелкими ДНК-содержащими онковирусами, по-видимому, вряд ли может кодировать все признаки трансформации, вирусный геном, вероятно, является направленным эпигеномным регулятором, изменяющим функционирование генетического аппарата клетки. По-видимому, присутствие вирусного генома достаточно для внегеномных фенотипических изменений, которые могут передаваться и в дочерние клетки вместе с автономно реплицирующимися вирусными компонентами или полными вирионами. Следовательно, иногда вирус может осуществлять более или менее длительную внегеномную регуляцию, перестраивающую работу клеточного генома без интеграции с ним (абортивная трансформация). Если же вирусная ДНК (или ее часть) встраивается в хромосому клетки, то подобная внегеномная вирусная регуляция может наследственно фиксироваться (стабильная трансформация). Реализовать свой эпигеномный регуляторный потенциал вирус может непосредственно или воздействуя на определенные клеточные системы, обусловливающие регуляцию обмена, синтез ДНК, или на мембранный аппарат клетки. Установлено, что присутствие вирусного генома — обязательное, но недостаточное условие для злокачественного перерождения.

Можно предполагать, что начальные этапы трансформации нормальной клетки в опухолевую связаны с нарушением генетической информации и в первую очередь в локусах, контролирующих формирование структур плазматических мембран. Эти изменения приводят к тому, что трансформированные клетки могут приобретать способность к неограниченному росту, выходя из-под контроля регулирующих систем организма, так как в процессе эволюции, по-видимому, создается строгое соответствие между белковым составом клеток и гомеостатическими факторами. Если

оно нарушается, то контроль размножения и распространения клеток становится дефектным. Это предположение находит подтверждение в экспериментальных работах, в которых показано, что гормоны, стимулирующие митоз в нормальных клетках или же оказывающие антимитотическое действие, не изменяли в тех же самых дозах митотическую активность опухолевых клеток.

Оказалось, что клетки, трансформированные онковирусами, выделяют в среду фактор (или факторы), который в 2—7 раз увеличивает образование трансформированных фокусов (Krysceve, Barlati, 1976). Происходит также количественный рост фокусов, неспособных ревертировать к нормальному фенотипу при ограничивающих температурах (41°С) в культурах, инфицированных ts-мутантами. Повышающий число фокусов фактор (факторы) действует после инфекции, он недиализуем и термолабилен и, вероятно, является белком с молекулярной массой между 10^5—2×10^5.

Итак, вероятно, для фенотипического выражения трансформации, с одной стороны, требуется активность определенных вирусных генов — онкогенов, а с другой — непосредственное участие генетического аппарата клетки. Постепенная перестройка функционирования клеточных генов под действием вируса (или его продуктов) приводит к изменению внутриклеточного метаболизма, вследствие чего трансформированные клетки, утратившие восприимчивость к межклеточной и гуморальной регуляции, получают существенные преимущества для нерегулируемого размножения и миграции по сравнению с нормальными клетками.

Паповавирусы человека

Эта группа вирусов включает типы JC, PML-1, PML-2, изолированные из мозга больных прогрессирующей многоочаговой лейкоэнцефалопатией (ПМЛ), и BK, MG, RF, выделенные из мозга людей с трансплантатами почки; все они являются «новыми» самостоятельными членами подгруппы паповавирусов В. Существенно, что у таких больных, получавших интенсивную иммунодепрессивную терапию, часто появляются бородавки, в моче содержатся и выделяются из нее паповавирусы. Постоянно также изолируются подобные паповавирусы, например, серотипы JMV и MMV, из мозга больных ПМЛ и из клеток ретикулосарком мозга и мочи пациентов с синдромом Вискотта-Олдрича (Padgett e. a., 1976; Takemoto, 1976). Считают, что два вируса — BK и JC — являются истинно человеческими, в то время как остальные типы могут быть классифицированы как варианты SV 40 (Takemoto, 1978). Оба вируса убиквитарны. Антитела к вирусу BK широко распространены только среди людей, и, по-видимому, инфицирование этим вирусом в 70—90% случаев происходит в раннем возрасте. Антитела к вирусу JC также обнаружены только у лю-

дей, первичная инфекция тоже происходит в детстве (Walker, 1976).

Все серотипы паповавирусов человека, полученные из двух основных источников (мозга больных ПМЛ и мочи людей с почечным трансплантатом), по физико-химическим свойствам, структуре и размерам вирионов, специфике размножения в чувствительных клетках и другим классификационным признакам идентичны вирусам SV 40 и полиомы. Штаммы PML-1 и PML-2 по морфологическим, иммунологическим и другим свойствам близки к SV 40. Серотипы JC и BK аналогично вирусу полиомы обладают гемагглютинирующими свойствами. Вместе с тем все штаммы SV 40-подобных паповавирусов человека антигенно отличны от вируса полиомы. Вирусы BK, JC и SV 40 являются отдаленно родственными вирусами, их капсидные антигены выявляют определенную перекрестную реактивность и индуцируют сходные и идентичные *T*-антигены. Уровень гомологии последовательностей ДНК у этих вирусов составляет 10—25%. Установлено, что вирусы полиомы BK и SV 40 имеют общего предшественника, от которого независимо эволюционировали (Soeda e. a., 1980). Сравнение вирусных и клеточных геномов от соответствующих хозяев дало возможность выявить, что направление эволюции вирусного генома определяется специфичностью хозяина данного вида паповавируса.

Серотипы, изолированные от больных ПМЛ, имеют общий с SV 40 T-антиген, а штаммы PML-1 и PML-2, кроме того,— общий вирионный антиген и нейтрализуются антисыворотками к SV 40, в то время как серотип JC дает слабую перекрестную реакцию с SV 40. Следовательно, эта идентичность не совсем полная. Вирусы JC и BK отличаются друг от друга по вирионным антигенам, штамм BK также полностью отличен от вирионных белков SV 40, однако *T*-антиген вируса BK дает слабую перекрестную реакцию с *T*-антигеном SV 40.

Вместе с тем данные по адсорбции свидетельствуют о том, что *T*-антигены из каждой клеточной линии имеют уникальные антигенные детерминанты. *T*-антигены из клеток, инфицированных вирусами BK и RF, идентичны, но отличаются от *T*-антигена вирусов JC, PML и SV 40. *T*-антиген вируса JC обладает промежуточными свойствами и более родствен *T*-антигену вирусов BK и SV 40, чем *T*-антигены последних вирусов близки между собой. *T*-антигены серотипа PML отличаются от *T*-антигена SV 40 (Dougherty, 1976; Beth e. a., 1977). Таким образом, серологические данные указывают на то, что *T*-антиген обладает различной субспецифичностью, которая может быть охарактеризована как межвидовая, видовая и типоспецифическая T-реактивность. Все штаммы паповавирусов человека не имеют общих антигенов с вирусами папиллом людей и кроликов.

В вирионах вируса BK выявлено на один белок больше, чем в вирионах SV 40. Основной белок VP1 по молекулярной массе

(39 000), как и белки VP2 (36 000) и VP4 (24 000), меньше, чем белки VP1, VP2 и VP3 SV 40. Дополнительный белок вируса ВК VP3 (34 500), отсутствующий в SV 40, по-видимому, представляет собой гемагглютинин, поскольку вирус ВК обладает этим видом активности, а SV 40 — нет.

Несмотря на то, что штаммы паповавирусов человека RF, GS, DW, MG и ВК выделены в различных районах Земли, между вирусами ВК, RF, GS, DW установлено выраженное антигенное родство и менее выраженное с вирусом MG (Wright e. a., 1976). Это родство подтверждается результатами анализа вирусных полипептидов. Все исследованные вирусы при электрофорезе в полиакриламидном геле имели идентичный белковый профиль, сходный с профилем белков SV 40. Небольшие различия наблюдаются в белках VP1 и VP3 вирусов MG и SV 40. При хроматографии триптических гидролизатов белков VP1 и VP3 получено абсолютно идентичное распределение пептидов в вирусах ВК, GS и DW. Вирусы RF и MG характеризуются отсутствием в их белке VP1 одного пептида и наличием дополнительного пептида. Вирус RF содержит один дополнительный пептид, а MG — три. Кроме того, в белке VP3 вируса MG нет двух пептидов, присутствующих в вирусах ВК, GS, DW. Показано также, что *TSTA*-антиген, индуцированный вирусами JC и ВК, перекрестно не реагирует с *TSTA*-антигеном, индуцированным SV 40 (Padgett e. a., 1977; Karjalainen e. a., 1978).

Определена нуклеотидная последовательность ДНК участка ранних генов вируса ВК (Jang e. a., 1980). Обнаружен возможный инициирующий триплет, локализованный между 3,047 и 3,045 нуклеотидами или в области 0,614 ед. генетической карты. Малый *t*-антиген длиной в 100 аминокислот кодируется непрерывной нуклеотидной последовательностью, начиная с сигнального триплета AUG. Если ранняя мРНК вируса ВК подвергается сплайсингу (сшиванию), то участки между нуклеотидами 3,047—2,808 и 2,725—884 могут кодировать большой *T*-антиген длиной 694 аминокислоты. *T*-антигены вирусов ВК и SV 40 имеют 71% гомологии по аминокислотному составу и 70% гомологии по кодирующим последовательностям (Jang e. a., 1980).

Паповавирусы человека отличаются друг от друга по способности культивироваться в различных клеточных системах. Штаммы PML-1 и PML-2, например, практически идентичны SV 40 в клетках человека и размножаются значительно интенсивнее этого вируса. Вирус ВК в клетках обезьян размножается очень плохо, а для штамма JC разрешающей клеточной системой, по-видимому, являются только клетки человека. При размножении вируса PML-2 в клетках обезьян спонтанно образуется «утроенный» мутант, не отличающийся по длине генома от SV 40 и представляющий собой тройной повтор одного из участков ДНК SV 40, содержащего большую часть поздних генов, некоторые ранние гены, инициаторный участок репликации вирусной ДНК и единст-

венный в геноме серотипа PML-2 участок узнавания для рестриктазы E. coli R1. Для исследования процесса образования амплифицированных сегментов из ДНК мутанта с помощью этого фермента выделили участок 10,4S, имеющий небольшие «липкие» концы, из которого затем, использовав ДНК-лигазу, получили миницирку лярную ДНК (мц-ДНК), составляющую около $^1/_3$ длины ДНК PML-2. При заражении клеток обезьян мц-ДНК штаммом PML-3 репликация их не осуществлялась. Однако при инфицировании клетки одновременно мц-ДНК PML-2 и ДНК SV 40 наблюдалось включение ^{3}H-тимидина в оба типа ДНК. Следовательно, циркулярные двунитевые сегменты ДНК PML-2, значительно более короткие, чем ДНК SV 40, могут реплицироваться in vivo. В этих же условиях обнаружены синтезированные de novo кольцевые ДНК, содержащие до 6—9 повторов мц-ДНК, что указывает на амплификацию таких сегментов in vivo.

При сравнении с помощью ДНК-ДНК-гибридизации 11 фрагментов ДНК PML-2, полученных при обработке ДНК вирионов рестриктазой H. influenzeae, с ДНК SV 40 оказалось, что 9 из них идентичны фрагментам ДНК SV 40. По данным гибридизации, препараты ДНК-1 из вирусов JC и BK сходны между собой и с ДНК SV 40 в одинаковой степени. Эти родственные фрагменты локализуются как в поздней, так и в ранней области генома. Степень родства не превышала 50%, и гетерологичные гибриды между ДНК JC и ДНК SV 40 или ДНК BK и ДНК SV 40 менее стабильны, чем гомологичные гибриды ДНК SV 40×ДНК SV 40 при высоких концентрациях формамида. Это свидетельствует о том, что внутри гомологичных участков имеет место высокая степень разупорядоченности вторичной двунитевой структуры, которая может достигать 15—30% пар основания (Osborn e. a., 1976).

Miao и Dougherty (1977) с помощью метода реассоциации и насыщающей гибридизации установили, что гомология между геномами человеческих паповавирусов составляет не менее 88%, тогда как общие нуклеотидные последовательности в ДНК вируса RF и мелкобляшечного варианта SV 40 не превышают 29%. Показано, что ориентация цепей мРНК SV 40 (+цепь против — цепи) части нуклеотидных последовательностей одинакова как для SV 40, так и для BK.

Все изученные штаммы паповавирусов человека обладают одинаковой трансформирующей активностью in vitro в отношении клеток почек хомяка и являются онкогенами для хомяков. В зависимости от способа введения новорожденным животным они вызывали папилломы сосудистого пучка, опухоли мозжечка и шишковидной железы, экстракраниальные нейробластомы, глиобластомы мозга, эпиндимомы, опухоли поджелудочной железы и недифференцированные саркомы (Taremoto, 1976; Padgett e. a., 1977, Uchida e. a., 1979).

Паповавирусы человека широко распространены у людей на всех континентах (Европа, Северная Африка, Северная Америка и т. д.). Нейтрализующие антитела к некоторым штаммам, например, ВК и JC, обнаруживаются примерно у 80% здоровых людей. Вирус JC, вероятно, является агентом, ответственным за заболевание ПМЛ, поскольку постоянно выделяется из мозга больных этой болезнью. Вирус ВК, как правило, обнаруживается в моче иммуносупрессорных больных с трансплантатами почек, у которых также иногда определяются антитела к *Т*-антигену ВК (Takemoto, 1978; Prozesky e. a., 1980). Вместе с тем пока не доказана ассоциация вируса ВК ни с одним заболеванием, в том числе и онкологическими, несмотря на то, что паповавирусы человека, их антигены и последовательности вирусной ДНК часто определяются в некоторых опухолях человека. Вирусы этой группы интегрируют свой геном в ДНК клеток хозяина и остаются латентными в течение всей жизни. Известно, что интенсивная иммунодепрессивная терапия, например, при аллотрансплантатах почек, обычно сопровождается резким увеличением числа лимфом и ретикулоклеточных сарком (в 35 и 350 раз соответственно). Число опухолей кожи и губы возрастает в 4 раза, сарком мягких тканей и гепатобиллиарных карцином — в 2,5 раза. Характерно, что именно у таких больных удавалось постоянно изолировать паповавирусы, этиологическая роль которых в генезе лимфом и ретикулоклеточных сарком весьма вероятна. Правдоподобность предположения приобретает еще бóльшую достоверность, если вспомнить, что SV 40 может вызывать у хомяков лимфомы, лейкозы и остеосаркомы. Уместно также напомнить, что паповавирусы человека были изолированы из клеток ретикулосаркомы мозга и мочи больных с синдромом Вискóтта-Олдрича, сцепленного с полом рецессивного заболевания, для которого характерны резкое подавление гуморального и клеточного иммунитета и высокий процент опухолей ретикулоэндотелиальной системы (Takemoto, 1976).

Нельзя исключить также участие паповавирусов в возникновении других новообразований у человека, в частности, меланом, в клетках метастазов которых обнаружен *Т*-антиген SV 40 и SV 40. Кроме того, клетки некоторых опухолей человека в отличие от нормальных клеток содержат полный или неполный геном вируса ВК.

Группа аденовирусов

К настоящему времени иммунологически идентифицировано более 80 серотипов аденовирусов (9 групп), выделенных от следующих естественных хозяев: человека (36 типов), обезьян (19), коров (8), птиц (5), свиней (3), от лошадей, собак, овец и мышей — по одному типу. Аденовирусы передаются главным обра-

зом при контакте. Особый интерес представляет группа аденовирусов человека и в первую очередь их онкогенные варианты, поскольку они являются первыми опухолеродными вирусами, которые паразитируют в естественных условиях у человека. ДНК-содержащие онкогенные аденовирусы этой группы исследованы наиболее полно. Кроме того, в последние годы большое внимание уделяется онкогенным вариантам аденовирусов других групп: от обезьян (6 вирусов), коров (3), птиц (5) и собак (1 тип А26/21, онкогенный для хомяков, и 9 штаммов аденовирусов, вызывающих морфологическую трансформацию культур фибробластов эмбрионов хомяков). Важно подчеркнуть, что пока не доказана этиологическая роль всех онкогенных аденовирусов в возникновении спонтанных злокачественных новообразований у естественных хозяев. Бластомогенная способность вирусов этой группы проявляется только при введении неприродным для них животным. То же самое относится к трансформирующей активности in vitro, хотя и описаны, например, случаи трансформации разных клеток плода человека аденовирусом 12-го типа. Однако стабильных, перевивных клеточных линий из таких очагов многослойного роста не было получено. Аденовирусная инфекция в клетках природных хозяев обычно протекает продуктивно с формированием в ядре зрелых вирионов и завершается характерным цитопатогенным эффектом.

По способности трансформировать клетки in vitro и вызывать опухоли у хомяков in vivo аденовирусы человека можно разделить на четыре группы (табл. 2). Кроме того, аденовирусы индуцируют опухоли у мышей, крыс и mastomys при введении их новорожденным животным. Интересно, что спектр опухолей, вызываемых у грызунов аденовирусами, очень широкий: недифференцированные мезенхимальные опухоли эпителиального характера, недифференцированные саркомы, лимфомы, лимфосаркомы и даже фиброаденомы молочных желез.

Геном и генетические различия разных типов аденовирусов. Аденовирусы размножаются в ядрах клеток, величина их приблизительно равна 60—85 нм. В центре расположено плотное ядро размером 30—35 нм, состоящее из линейной двуспиральной ДНК, которая имеет 35 000 пар оснований с молекулярной массой $20—30 \times 10^6$, плавучей плотностью в хлориде цезия 1,717 г/см^3 и содержанием Г+Ц — 48—59%. Обнаружена статистически достоверная разница в количестве *Г+Ц*-пар в неонкогенных (54,3%) и в онкогенных (56,9%) типах аденовирусов обезьян и человека (см. табл. 2). Внутримолекулярное распределение Г+Ц-пар также неравномерное. Можно выделить правый и левый конец молекулы и определить две нити ДНК, одна из которых называется тяжелой нитью (содержит больше гуаниловой кислоты), а другая — легкой нитью. Около 1—20% длины двух концов двунитчатой молекулы ДНК тождественны. Этот феномен называется обратным терминальным (крайним) повтором, так как после

Таблица 2 Бластомогенные и трансформирующие свойства аденовирусов человека

Группа вирусов	Гемагглютинационная группа	Онкогенность[1] для новорожденных хомяков	Трансформируемые клетки	ДНК, %	Вирусная ДНК (Г+Ц), %	Вирусные ДНК—мРНК (% гомологии[2])
I. *A*12, *A*18, *A*31	4	Высокоонкогенные	Почки новорожденного хомяка, фибробласты эмбрионов крысы, кролика	11,6—12,5	48—49	30—60
II. *A*1, *A*3, *A*5 *A*7, *A*8, *A*11, *A*14, *A*16, *A*21, *A*24	1	Слабоонкогенные	Фибробласты эмбрионов крысы	12,5—13,7	49—52	40—100
III. *A*2, *A*6	3	Неонкогенные	Фибробласты эмбрионов крысы	12,5—13,7	57—59	90—100
IV. Все остальные типы, кроме *A*4	2	Неонкогенные	Фибробласты эмбрионов хомяка и крысы	—	—	—

[1] Высокоонкогенные варианты аденовирусов в большом проценте индуцируют опухоли с латентными периодами от 3 недель до 1—2 мес, а слабоонкогенные — в небольшом проценте через 4—18 мес после введения вируса новорожденным животным.
[2] Процент гомологии, выявляемой гибридизацией вирусспецифической мРНК, которую изолируют из аденовирусных опухолей и клеток, трансформированных аденовирусами, с ДНК разных групп.

отделения двух нитей два конца каждой становятся не тождественными, а образуют друг с другом комплементарные пары. Следовательно, повторяющиеся крайние последовательности располагаются как бы в зеркальном изображении. Молекулярно-биологическое значение таких обратных терминальных повторов пока не установлено. Известно лишь, что чем длиннее эта часть в вирусном геноме, тем слабее способность вируса к репродукции. Однако его трансформирующие потенции усилены. Поскольку РНК-полимеразы производят копию мРНК с одной нити ДНК только в направлении 3′—5′-концов, предполагают, что именно повторы способствуют транскрипции обеих нитей ДНК, обеспечивая для полимеразы тождественное место связи в обоих концах молекулы.

Количество ДНК в вирионе составляет 12—13%. Установлено, что у высокоонкогенных серотипов аденовирусов группы *A* содержание ДНК и ее плавучая плотность ниже, чем у представителей групп *B* и *C*, и они содержат примерно на 2—4 гена меньше. Из популяции аденовируса, образующегося в процессе продуктивной инфекции в культуре клеток, с помощью центрифугирования в градиенте плотности изолированы неполные частицы, ДНК которых гетерогенна по длине и составляет от 15 до 100%

от длины ДНК обычных инфекционных частиц. Многие молекулы неполных частиц содержат длинные инвертированные концевые повторяющиеся последовательности, состоящие из последовательностей, которые располагаются во внутрь генома от нормального левого конца ДНК. Нормальные же последовательности правого конца в этих молекулах отсутствуют. В молекулах ДНК повторяется участок генома, ответственный за трансформацию аденовирусом клеток крысы (Daniell, 1976).

Анализ разных подгрупп аденовирусов с помощью ДНК-гетеродуплексной техники позволил определить, что 2—10% генов внутри одной подгруппы значительно различаются. Среди подгрупп в 50—80% генов обнаружены отличия. Показано, что даже в области генов, имеющих расхождения, не каждая пара оснований различается в гетеродуплексах. В тождественных гетеродуплексах встречается такое расхождение генов, при котором лишь 10—20% противоположных пар оснований не являются комплементарными. Внутри групп *B* и *C* фракции ДНК разные. Гетеродуплексы высокоонкогенных вирусов *A*12 и *A*31 показывают уже более значительные расхождения, соответствующие отличиям гетеродуплексов, произведенных среди подгрупп.

При ДНК-ДНК-гибридизации на фильтрах выявлено около 25% гомологии в ДНК бычьего и человеческого аденовирусов, а между ДНК аденовирусов человека и обезьян гомология не превышала 23%. Следует отметить, что рекомбинация является основным способом изменения структуры вирусных геномов, а селекция видоизменяет аденовирусы in vivo и in vitro. ДНК некоторых аденовирусов человека и вируса SA7 обезьян обладают бластомогенными и инфекционными свойствами, которые блокируются ДНК-азой, в то время как противовирусные сыворотки на них не влияют.

Онкогены аденовирусов. В последние годы достигнуты исключительные успехи в физическом и транскрипционном картировании генома аденовирусов, в частности, определена локализация аденовирусного онкогена. Находится он в левом конце молекулы ДНК и составляет у разных типов аденовирусов человека от 4 до 7,3% вирусного генома с молекулярной массой $0{,}75—1\times10^6$ дальтон. Выявлен также онкоген у аденовируса SA7 обезьян (Panomareva e. a., 1979). Установлено, что в клетках, трансформированных аденовирусами 2, 3, 5 и 12-го типов человека, всегда присутствует только левый конец вирусного генома и обнаруживаются *T*- и *TSTA*-антигены, кодируемые, по-видимому, онкогеном, которые, аналогично ранним белкам паповавирусов, ответственны за трансформацию (Graham e. a., 1975; Fujinaga e. a., 1977; Dijkema e. a., 1979).

Трансформирующая активность левостороннего фрагмента генома вируса 45 связана с первым ранним участком, картируемым в положениях 1,3—11,5 ед. карты. С целью выяснения роли 6—7 полипептидов, кодируемых данным сегментом, испытывали

трансформирующую активность фрагментов ДНК, полученных с помощью рестриктаз, по-разному расщепляющих данный участок генома. Фрагмент 1,3—4,5 ед. карты кодировал полипептиды 34 000 и 42 000, тогда как участок 4,6—11,5 — белки массой в 19 000 и 65 000 дальтон. Согласно данным пептидного картирования, два последних белка имеют несколько общих пептидов. Предполагается особо важная роль полипептида 19 000 в процессе трансформации.

На ts 401-мутанте аденовируса 12-го типа человека, у которого выключается функционирование определенной ранней области генома, недавно были получены данные, подтверждающие необходимость функции гена 401 для поддержания трансформированного фенотипа клеток (Ledinko e. a., 1979). Полагают, что продукт гена 401 прямо или опосредованно контролирует синтез клеточной ДНК. Вместе с тем, в настоящее время природа всех ранних белков аденовирусов и механизм их действия практически неизвестны, и требуют интенсивного изучения. Ранние гены аденовирусов представлены четырьмя участками, которые отстоят далеко друг от друга, на каждой нити — по два участка. На ранних стадиях заражения только вирусспецифическая мРНК, присутствующая в клетке, комплементарна однонитевой последовательности ДНК на этих четырех участках. На поздних стадиях инфекции в цитоплазме появляются новые виды РНК длиной в 1000—4000 оснований, что включает практически всю информацию вирусного генома. Продукт же ядерной первичной транскрипции представлен гигантской РНК, имеющей размеры около 28 000 нуклеотидов (Lemay, 1978). При картировании индивидуальных мРНК-продуктов созревания первичного транскрипта обнаружено, что мРНК гибридизуется одновременно с далеко отстоящими друг от друга участками вирусной ДНК. Иными словами, гены аденовирусов также имеют мозаичную структуру. Из гигантского транскрипта в процессе созревания получается около 12 классов индивидуальных мРНК, проходящих стадии «фрагментации» предшественника, полиаденилирования и присоединения 5′-концевой группировки метилированных оснований, начинающихся с 7-метилгуанозина, присоединяющегося посттранскрипционно. Большинство мРНК поздней стадии аденовирусной инфекции обнаруживало комплементарность к одним и тем же участкам с координатами 16,6, 19,6 и 26,6 ед. генома. В результате высказано предположение, что после расщепления гигантского предшественника к каждой индивидуальной мРНК аденовируса присоединяется стандартная последовательность (вероятнее всего, три коротких фрагмента, транскрибирующихся в области промотора и названных «лидирующими»).

Аденовирусные белки. Белковая капсула аденовирусов содержит 162 и 252 капсомера, расположенных в 20-гранной кубической симметрии. Тип симметрии вирусной частицы осевой. Аденовирусы не содержат липидов. Масса частиц равна 175×10^5.

Аденовирусы при размножении часто образуют кристаллоподобные структуры наподобие вирусных частиц доброкачественной папилломы кожи человека или вируса полиомы.

Геном аденовирусов несет информацию, достаточную для кодирования приблизительно 30—50 белков. Сам вирион содержит около 13 полипептидов, а в инфицированных клетках удалось пока обнаружить 22 вирусспецифических полипептида с молекулярной массой 11 000—120 000. Следовательно, среди серотипов одной группы разными могут быть не более 2—4 белковых молекул. Основными полипептидами, преципитируемыми моноспецифической сывороткой, являются белки с молекулярной массой 53 000 и 15 000 дальтон (Green e. a., 1979). При картировании оказалось, что большинство полипептидов 53 000 и 15 000 идентичны и кодируются генным участком в положении 4,5—11,0 ед. карты. Полипептиды 40 000 и 50 000, преципитируемые той же сывороткой и кодируемые в зоне 1,5—4,5, не имеют пептидов, общих с 53 000 и 15 000 белками. В пределах генного участка 4,5—11,0 выявлено кодирование еще нескольких полипептидов, часть из которых перекрывается, а часть не перекрывается с двумя основными белками. Предполагается, что исследованные семейства полипептидов, перекрывающиеся по составу аминокислот, могут транслироваться с перекрывающихся мРНК, образуемых в процессе сплайсинга (сшивания). Анализ белков вирусных частиц показал, что в вирионе присутствуют фосфопротеиды с молекулярными массами 100 000, 72 000, 66 000, 54 000, 39 000, 33 000, 29 000 и 19 000 дальтон. Кроме указанных фосфопротеидов вириона последний содержит еще пять фосфорилированных белков (Axelrod, 1978).

Как минимум два из трех белков (гексон, фибр и пентон), содержащих типоспецифические детерминанты, участвуют в построении наружного капсида. Однако типоспецифические компоненты ассоциируются вместе с подгруппоспецифическими детерминантами, то есть иммунологические данные соответствуют результатам молекулярной гибридизации. Вместе с тем нельзя исключить, что метод гибридизации ДНК выявляет такие различия, которые не отражаются в аминокислотной последовательности молекул белков. Об этом свидетельствует аминокислотный состав полипептидов аденовирусов, принадлежащих к разным группам. Например, состав аминокислот вирионных белков аденовирусов крупного рогатого скота подобен аминокислотному составу аденовирусов человека. Антигены гексона аденовирусов разных групп дают перекрестные иммунологические реакции.

Вероятно, все аденовирусы человека происходят от одного общего первородного типа, испытавшего в процессе эволюции разные селективные изменения.

Во внутреннюю структуру вириона входят чаще всего три богатых аргинином полипептида (VI—VIII). Белки нуклеотида аденовирусов, очевидно, выполняют следующие биологические

функции: 1) стабилизируют вирусную ДНК; 2) способствуют созреванию (сборке) вирусных частиц; 3) регулируют транскрипцию вирусных генов; 4) в качестве ферментов участвуют в репликации вирусной ДНК и, возможно, в других процессах. Суммарная молекулярная масса белков вириона аденовирусов равна $3{,}8\times10^5$. Нуклеотиды ДНК, кодирующие последовательность аминокислот этих белков, составляют 30% вирусного генома. Остальные 70% закодированной вирусной информации, по-видимому, используются на внутриклеточные вирусспецифические синтезы (поверхностные и *T*-антигены и др.), включая ферменты, обеспечивающие репликацию (или интеграцию) вирусной ДНК. Определен белок, связывающийся с однонитевой ДНК, кодируемый геномом вируса А2 (Jeng Yun-Hua e. a., 1977). Этот белок в зараженных клетках представлен двумя формами, отличающимися друг от друга по молекулярной массе (74 000 и 77 000). Первичным продуктом трансляции, вероятно, является молекула массой в 74 000 дальтон, которая затем подвергается фосфорилированию и другим неидентифицированным пока посттранскрипционным модификациям, вследствие чего ее молекулярная масса становится равной 77 000. Аналогичный вирусспецифический белок с молекулярной массой 72 000 синтезируется и при инфекции вирусом *A*5 (Van Der Vliet e. a., 1977). Полагают, что этот белок, связывающийся с вирусной ДНК, участвует как в инициации репликации ДНК, так и в элонгации растущих нитей вирусной ДНК.

В составе вирионов *A*1, *A*2 и *A*12 обнаружена эндонуклеаза, ассоциированная с основанием пентона, который выполняет две функции: фермента и структурного компонента. Активность эндонуклеазы связана также с додеконами, в то время как гексонные препараты и компоненты вирусного нуклеоида эндонуклеазу не содержат. ДНК-эндонуклеаза вирусов *A*2 и *A*12 способна гидролизировать обе цепочки ДНК, причем нативная ДНК гидролизируется в 20 раз интенсивнее денатурированной. Фермент разрывает 30 S-вирусную ДНК на фрагменты 18 S предпочтительно в участках, содержащих повышенные количества гуанина и цитозина, а также, по-видимому, способствует интеграции вирусной ДНК с клеточной. Эндонуклеаза присутствует также в очищенных вирионах А7 (Cajean-Feroldi e. a., 1977). В случае аденовируса 5-го типа характер нуклеазного действия не определен, и до сих пор неясно, имеет ли эта активность вирусное или клеточное происхождение. Эндонуклеаза, находящаяся в экстрактах клеток КВ, кодируется клеточным геномом, но проявляет значительную активность по отношению к аденовирусным белкам (Reif e. a., 1977). Вероятно, этим явлением можно объяснить присутствие эндонуклеазы в вирионах аденовирусов многих серотипов.

Blair и Russell (1978) выявили протеинкиназную активность, ассоциированную с вирусами А2 и А5. Под действием этого фермента происходит фосфорилизация вирусных полипептидов IIIa,

V, VI, VII и X. В последующем было показано, что пероксидаза вируса А2 имеет молекулярную массу около 33 000 и не соответствует ни одному из идентифицированных к настоящему времени полипептидов аденовирусов (Akusjärvi e. a., 1978).

Обнаружено как минимум шесть ранних белков аденовирусов 2-го и 5-го типов с молекулярными массами 70 000, 42 000, 19 000, 17 000, 14 000 и 11 000 дальтон. Состав полипептидов этих вирусов является сходным. Это свидетельствует, вероятно, и о сходстве морфогенеза исследованных белков. Ross e. a. (1980) определили шесть линий клеток хомяков, трансформированных вирусами А3 и А5 и содержащих только 12,5% левой части генома этих вирусов, и 14 ранних вирусспецифических белков с молекулярными массами от 10 000 до 72 000 дальтон. Ни один из этих белков не осаждался сыворотками от нормальных животных и, следовательно, эти белки кодируются левой частью вирусного генома. Почти весь спектр полипептидов ассоциирован с ядром и прилежащим цитоплазматическим матриксом, в том числе белки с молекулярной массой 58 000 и 40 000, которые выявлялись Lenk e. a. (1980). Данные полипептиды относятся к левому концу фрагмента генома аденовируса, необходимого для трансформации клеток in vitro. Продемонстрировано взаимодействие ранних аденовирусных белков с цитоскелетом. Это взаимодействие может быть одним из аспектов функции данных белков и служить основой для вызываемых ими физиологических изменений, оказывающих плейотропное влияние на регуляцию клеточного роста.

Проведена идентификация белков, закодированных в левом участке генома между 1,3% и 11%. При трансляции in vitro вирусспецифических мРНК получена серия основных полипептидов с молекулярной массой 15 000, 34 000, 36 000, 40 000 и 42 000 дальтон; мРНК, кодирующие белки 15 000, 34 000, 36 000, 40 000 и 42 000, транскрибируются с участка генома между 0 и 5%, а мРНК, кодирующая полипептид 19 000,— с участка между 5% и 11%. Картирование участка генома, кодирующего минорные компоненты в 17 000, 18 000 и 25 000 дальтон, не проведено. Все картированные белки осаждаются антисывороткой хомяка к *Т*-антигену. Трансляция мРНК левого участка генома из трансформированных и литически инфицированных клеток дает совпадающие результаты.

Т-антиген аденовирусов, так же как и аналогичные белки паповавирусов, вирусспецифичен, локализуется в ядре, синтезируется в процессе абортивной и продуктивной инфекции, а также в клетках, трансформированных in vitro, и в клетках опухолей, индуцированных in vivo соответствующими вирусами. При продуктивной инфекции синтез *Т*-антигена предшествует репликации вирусной ДНК, то есть антиген является ранним белком и его синтез не блокируется ингибиторами синтеза ДНК. В большинстве работ *Т*-антиген вируса *А*12 выявлялся в двух компонентах: высокомолекулярного (80 000) термолабильного, который был

идентифицирован как типоспецифический *Т*-антиген (реагировал только с сыворотками хомяков-носителей сарком *А*-12), и низкомолекулярного (20 000), термостабильного, представляющего собой специфический невирионный *Т*-антиген, реагирующий с сыворотками от хомяков с опухолями, индуцированными вирусами А12, *А*18 и *А*31. В пермиссивных клетках НЕр 2 обнаружена продукция *Т*-антигена в виде основного полипептида с молекулярной массой 50 000 и меньшего полипептида — 11 000 (Pusztai e. a., 1978). Используя перекрестные иммунологические реакции (РСК и иммунофлюоресценции), удалось сгруппировать *Т*-антигены аденовирусов человека в иммунологические группы: 1) 12-го, 18-го и 31-го типов; 2) 3-го и 7-го типов. Опухолевые *Т*-антигены новообразований, индуцированных аденовирусами 12-го, 18-го и 31-го типов, давали перекрестную реакцию между собой, но не с опухолевыми *Т*-антигенами вируса полиомы, саркомы Рауса, SV 40 и других групп аденовирусов.

TSTA — трансплантационный вирусспецифический антиген — также индуцируется аденовирусами на поверхности инфицированных, трансформированных и опухолевых клеток. В клетках саркомы А-12 хомяка находится трансплантационный антиген, который выявляется трансплантационным тестом на животных, иммунизированных как вирусом *А*12, так и обработанной ультразвуком опухолевой тканью. Описана кинетика синтеза поверхностных антигенов вируса *А*12 в ФЭК и ФЭХ, зараженных человеческим аденовирусом 12-го типа, а также в аутологичных системах сарком хомяков *А*-12 и мышей линии СВА, индуцированных аденовирусом обезьян (Агеенко, 1974).

Учитывая данные иммунологических (получены отрицательные результаты при выявлении *TSTA*- и *Т*-антигенов аденовирусов в опухолях человека) и молекулярно-биологических (определение вирусспецифических мРНК в клетках сарком человека не увенчалось успехом) исследований, маловероятно, что аденовирусы способны вызывать опухоли у человека. Вместе с тем, если этот процесс действительно протекает в организме человека, то его механизм, по-видимому, отличен от механизма онкогенеза у грызунов. Принципиально все типы аденовирусов можно считать потенциально онкогенными in vivo и in vitro для непермиссивных клеток.

Вирусы группы герпеса

К группе герпеса относятся следующие ДНК-содержащие онковирусы: аденокарциномы Люкке почек леопардовых лягушек, птичьего высокоинфекционного нейролимфоматоза (вирус болезни Марека — ВБМ), лимфомы диких белохвостых кроликов («ватный хвост»), лимфомы и ретикулоклеточных сарком у различных приматов и герпесоподобный вирус Эпштейна-Барр, описан-

ный ими в 1964 г. и ассоциированный с лимфомой Беркитта, инфекционным мононуклеозом и назофарингеальной карциномой человека.

Классификация вирусов группы герпеса до сих пор не разработана, поскольку их биологические свойства исследованы еще недостаточно, и поэтому предлагаемые классификационные признаки часто относительны. Вместе с тем можно выделить следующие общие свойства этих крупных ДНК-содержащих онковирусов. Все они содержат двунитевую ДНК с молекулярной массой $70—100\times10^6$ (100—300 генов), соотношение $Г+Ц$ составляет 56—75%. Вирионы герпесвирусов имеют сложную структуру. Ядра зрелых вирионов диаметром 110—200 нм окружены липопротеидной оболочкой, вирусный капсид икосаэдрической формы диаметром 100 нм состоит из 162 капсомеров. Однако некоторые представители онкогенных вирусов группы герпеса, например, вирусы карциномы лягушек и болезни Марека, лишены наружной оболочки и характеризуются морфологией «голых» вирионов. В градиенте CsCl вирусы группы герпеса имеют плавучую плотность 1,718—1,727 г/мл. Нуклеокапсид вириона формируется в ядре, наружная оболочка образуется из мембранных компонентов ядра и цитоплазмы. При анализе белков герпесвирусов в полиакриламидном геле обнаруживается от 10 до 50 различных пиков.

Общим биологическим свойством онкогенных вирусов этой группы является способность вызывать как продуктивный, так и абортивный тип инфекции. Причем репликация зрелого вируса обязательно сопровождается гибелью зараженных клеток, вероятно, вследствие блокирования внутриклеточных макромолекулярных синтезов. Оба процесса обусловлены индукцией новых поверхностных ядерных и цитоплазматических антигенов, специфичных в отношении вируса. Опухолевая трансформация клеток осуществляется только при непродуктивной инфекции. Предполагают, что немаловажную роль в этом процессе играют изменения клеточных мембран под действием вирусспецифических белков. Вирусы группы герпеса, в отличие от ДНК-содержащих онкогенных вирусов полиомы, SV 40 и аденовирусов, вызывают естественно встречающиеся новообразования у кур, лягушек, кроликов, обезьян и, возможно, человека. Основной путь распространения этих вирусов — горизонтальный.

Наибольший интерес среди группы герпесвирусов представляет вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ), который систематически продуцируется клетками африканской лимфомы Беркитта в культуре и обнаруживается при электронно-микроскопическом исследовании. В небольшом проценте случаев ВЭБ синтезирует клетки лимфобластоидных линий. В некоторых клеточных линиях и биопсийном материале из лимфом Беркитта вирионы ВЭБ не определяются. По-видимому, синтез полных вирусных частиц начинается после эксплантации клеток лимфомы в культуру, что сопровождается снятием блока, который in vivo репрессирует экспрессию

вирусного генома, регулярно присутствующего в генетическом аппарате клеток лимфомы Беркитта. Возможно, в экспрессии вирусных генов in vivo существенная роль принадлежит клеточно- опосредованным иммунным механизмам, нельзя также при этом исключить и участие гормональных факторов.

В начальном периоде культивирования, как правило, наблюдается индукция синтеза ВЭБ во многих клетках, затем число продуцирующих клеток снижается, а в некоторых линиях они исчезают вообще. Исключение представляет клон РЗНР, 1,5—10% клеток которого постоянно продуцируют ВЭБ. Высокой частотой спонтанной индукции синтеза вируса обладают и клеточные линии лимфоцитов мармозеток, трансформированных ВЭБ. В одних клетках таких линий синтезируется только ранний вирусин- дуцированный антиген, в других (небольшой процент) — вирусный капсидный антиген. Обычно эти два синтеза несовместимы с жизнью клетки, хотя лимфоидные клетки — непермиссивная система для ВЭБ (пермиссивных пока не обнаружено). Таким образом, инфекционный вирус получают из вируспродуцирующих лимфобластоидных клеточных линий.

Существенно, что рецепторами для адсорбции ВЭБ обладают только 5-лимфоциты (полупермиссивная система), которые легко подвергаются трансформации. У всех исследованных видов обезьян и у человека наиболее чувствительной мишенью для трансформирующего действия ВЭБ были 5-лимфоциты с рецептором *EAC,* присоединяющим комплемент (Robinson e. a., 1977). При трансформации лимфоцитов мармозеток данный рецептор утрачивался или маскировался. В состав человеческих лимфобластных линий входил маркер *EAC,* но ни одна из них не сохраняла рецептор *ЕЛ,* специфичный для 75-антител. Линии трансформированных клеток шерстистых обезьян содержали маркеры *EAC* и *EA* (7S) примерно в равных соотношениях.

После трансформации получаемые лимфобластоидные линии не включали 5-маркера, специфичного для Г-лимфоцитов. Добавление к 5-лимфоцитам макрофагов значительно увеличивало количество трансформированных клеток. Аналогичный эффект наблюдался при совместном культивировании лимфоцитов, инфицированных ВЭБ, с аллогенными фибробластами человека. Вероятно, этот процесс происходил за счет повышения выживаемости очень небольшого числа трансформированных клеток на первом этапе критического периода. Концентрированный ВЭБ вызывал морфологическую трансформацию лимфоидных клеток человека и разных видов обезьян (шерстистых, беличьих, гиббонов и мармозеток). Этот процесс можно блокировать, если вирус обработать специфической иммунной сывороткой. В последнее время удалось индуцировать ВЭБ лимфопролиферативное заболевание у обезьян американских тропиков. Ретикулоклеточные саркомы были определены у белоголовых мармозеток, белохвостых и ночных мартышек, инокулированных ВЭБ, причем частота по-

явления опухолей значительно возросла после применения иммунодепрессантов. У совиной обезьяны этим вирусом, выделенным из линии клеток лимфомы Беркитта, было вызвано лимфопролиферативное заболевание, сходное со злокачественной лимфомой. Клеточные линии, полученные из опухолей обезьян, содержали множественные геномы ВЭБ, продуцировали вирусные антигены и полный инфекционный вирус (Zur Hansen, 1975; Klein, 1976; Oberender e. a., 1980; Vogt, 1980).

В лимфобластных клетках, несущих геном ВЭБ, синтезируется не менее четырех групп белков, ассоциированных с вирусом.

1. *Ядерный антиген (ЭБNA),* по-видимому, аналогичен *Т*-антигену папова- и аденовирусов. Он обнаруживается с помощью РСК. Однако, в отличие от *Т*-антигена папова- и аденовирусов, ЭБNA прочно связан с хроматином и не отделяется от хромосом в процессе митоза (Luka e. a., 1977). Химическая природа и биологическая функция этого антигена неизвестны. Вместе с тем, обладая высоким сродством к ДНК, ЭБNA может выполнять, по-видимому, различные регуляторные функции. ЭБNA определяется практически в 100% клеток, содержащих генетическую информацию ВЭБ. Иными словами, наличие этого антигена четко свидетельствует о присутствии генов ВЭБ в клетке. Причем существует строгая корреляция между количеством геномов ВЭБ и количеством ЭБNA. ЭБNA — единственный вирусиндуцированный белок, выявляющийся в лимфоцитах первичноинфицированных ВЭБ. Он также всегда определяется в клетках биопсийных материалов из лимфомы Беркитта и карциномы носоглотки.

2. *Ранние антигены (ЕА),* вероятно, не являются структурными компонентами вириона. Продукция этих белков в лимфобластоидных клетках зависит от суперинфекции, которая сильно варьирует у различных линий, зараженных экзогенным ВЭБ, полученным из клеток Р3НР-1. Синтез ранних антигенов индуцируется 5-йод- или 5-бромдезоксиуридином также в лимфобластоидных клетках, не продуцирующих вирус. Вирусы, выделенные из других клеточных линий, продуцирующих ВЭБ, не индуцируют синтез ранних антигенов после реинфекции лимфобластоидных клеток. Обычно они способны трансформировать in vitro лимфоциты обезьян и человека в бесконечно перевиваемые («бессмертные») линии клеток, в отличие от вируса из клеток Р3НР-1, который практически не обладает трансформирующей активностью. Возможно, трансформирующие штаммы ВЭБ имеют дефектные геномы, так как ДНК ВЭБ из клеток Р3НР-I несет больше генетической информации. Ранние антигены различаются по антигенной структуре и локализации в клетке и обозначаются как D (diffuse) и R (restricted). Анти—R—антитела обычно преобладают у больных лимфомой Беркитта, процент антител против D-компонента, наоборот, повышен у больных инфекционным мононуклеозом и назофарингеальной карциномой (НФК).

3. *Мембранные антигены (МА)* подразделяются на ранние

(EMA), синтезирующиеся до начала репликации вирусной ДНК, и поздние (LMA). Мембранные антигены — это сложный антигенный комплекс, состоящий, по-видимому, из различных субспецифичностей клеточной и вирусной природы (в образовании мембранных антигенов, вероятно, участвуют структурные компоненты вирусной оболочки). В отличие от вирусного капсидного антигена (VCA) и EA, мембранные антигены определяются в клетках, полученных при биопсии лимфомы Беркитта. Идентифицировано четыре основных полипептида, составляющих вирусиндуцированный мембранный комплекс, с молекулярными массами 280 000, 250 000, 170 000 и 90 000 (Qualtiere, Pearson, 1979).

4. Последний тип — *вирусный капсидный антиген (VCA)* (Klein, 1976; Ernberg e. a., 1977).

В обширных сероэпидемиологических исследованиях установлено, что высокие титры антител к ВЭБ чаще всего выявляются при двух злокачественных новообразованиях человека — лимфоме Беркитта и назофарингеальной карциноме (НФК). Первая встречается преимущественно в определенных районах экваториальной Африки и Новой Гвинеи, а карцинома носоглотки — наиболее частая злокачественная опухоль населения некоторых областей Южного Китая и Сингапура. Спорадически оба новообразования встречаются во всем мире, причем НФК — чаще, чем лимфома Беркитта. При таких лимфопролиферативных заболеваниях, как болезнь Ходжкина, хронический лимфолейкоз, саркоидоз, также обнаруживаются высокие титры антител к VCA ВЭБ. Вместе с тем средние титры антител при этих болезнях относительно низки. Высокие титры антител к ВЭБ определяются при лепроматозной форме проказы (при этом заболевании возникают глубокие нарушения клеточного иммунитета). Оказалось, что ВЭБ вообще чрезвычайно широко распространен в человеческой популяции и антитела к нему обнаруживаются у 70—80% здоровых людей, проживающих в разных частях света. Инфекционный вирус удается регулярно выделять из смывов носоглотки и ротовой полости здоровых людей и больных с лимфомой Беркитта. Не исключено, что именно клетки эпителия носоглотки как раз и являются пермиссивной системой для ВЭБ. Антитела к этому вирусу обнаружены также у многих видов обезьян, в том числе у высших приматов Старого (но не Нового) Света. Считают, что дикие шимпанзе могут быть резервуаром этого вируса (Zur Hansen, 1975; Klein, 1976).

Этиологическую роль ВЭБ в возникновении лимфомы Беркитта и НФК в настоящее время можно обосновать следующими данными.

1. Во всех клетках лимфобластоидных культур лимфомы Беркитта и биопсийном материале постоянно обнаруживаются вирусспецифические и вирусиндуцированные белки ВЭБ. Вирусные антигены VCA, EA, MA не выявляются в биопсийных мате-

риалах и культурах эпителиальных клеток карциномы носоглотки, если из них не удается получить перевиваемые линии. В ядрах же эпителиальных клеток НФК (биопсии и клетки НФК, выращенные в организме мышей) определяется ЭБNA ВЭБ, правда, в значительно меньшем количестве, чем в лимфобластоидных клетках.

2. У всех больных с лимфомой Беркитта и карциномой носоглотки титр антител к различным компонентам ВЭБ и к вирусиндуцированным белкам значительно выше (отмечены восьмикратные различия), чем у здоровых людей и больных другими заболеваниями. Величина титра этих антител зависит от состояния опухоли (регрессия или прогрессия).

3. В геноме клеток лимфомы Беркитта африканского происхождения (совсем недавно было установлено и в отношении европейской лимфомы) регулярно присутствуют множественные копии генома ВЭБ. Помимо этого, в клетках лимфомы и культурах лимфоидных клеток постоянно присутствует ковалентнозамкнутая двухспиральная ДНК ВЭБ с молекулярной массой около 100×10^6, то есть по величине практически совпадающей с молекулярной массой линейной ДНК, выделенной из вирионов ВЭБ. В клетках, инфицированных ВЭБ, определяется ДНК-полимераза, отсутствующая в нормальных. Miller e. a. (1977) считают, что полимераза, индуцированная ВЭБ, необходима для продуктивного синтеза вирусспецифической ДНК. ДНК ВЭБ также обнаружена в эпителиальных клетках НФК, хотя и считалось, что этот вирус инфицирует только лимфоцитарные клетки. Карцинома носоглотки представляет собой смешанные клеточные популяции — эпителиальные опухолевые клетки, интимно связанные с лимфоцитами и тяжами соединительной ткани. Эпителиальные клетки НФК имеют набор хромосом, близкий к диплоидному, что противоречит предположению о возможном их слиянии с лимфоцитами-носителями генома ВЭБ. Более вероятно, что пермиссивные эпителиальные клетки могут трансформироваться ВЭБ.

4. ВЭБ способен трансформировать клетки человека (лимфоциты из лимфатических узлов, костного мозга и периферической крови) in vitro (Diehl, 1977).

5. ВЭБ индуцирует лимфомы у обезьян.

Во многих биопсийных материалах из лимфом Беркитта выделяются комплексы 70S РНК с вирусной обратной транскриптазой, что указывает на возможное участие онкорнавирусов в развитии злокачественных лимфом.

Итак, несмотря на то, что многочисленные исследования свидетельствуют о стабильной связи (постоянное присутствие вирусной ДНК в клетках опухоли, синтез вирусспецифических и вирусиндуцированных белков и наличие высоких титров антител у больных) ВЭБ с лимфомой Беркитта и карциномой носоглотки, однозначно решить вопрос об его участии в индукции этих ново-

образований пока не представляется возможным. Вместе с тем роль ВЭБ как этиологического фактора, вызывающего доброкачественное лимфопролиферативное заболевание — инфекционный мононуклеоз, можно считать в настоящее время доказанной. Причем болезнь развивается только у «серонегативных» лиц, в слюне которых в течение 18 мес после первичного заражения обнаруживается инфекционный вирус. Экскреция этого вируса наблюдается также у больных, получающих иммунодепрессанты. Перенесение заболевания превращает «серонегативного» человека в «серопозитивного». В районах Африки, эпидемичных для лимфомы Беркитта, заражение людей ВЭБ происходит в раннем возрасте: у 80% детей в 4—5-летнем возрасте обнаруживаются сероконверсии. Вероятно, именно поэтому в этих областях очень редко встречается типичный мононуклеоз. Преполагают, что ВЭБ, индуцирующие лимфому Беркитта и вызывающие инфекционный мононуклеоз, близкородственны, но не идентичны. Особый эпидемический характер распространения лимфомы Беркитта свидетельствует о вероятном участии в процессе сопутствующих факторов (голоэндемическая малярия). При этом особо следует выделить передаваемые насекомыми агенты, приводящие к подавлению иммунитета и (или) стимулирующие пролиферацию трансформированных ВЭБ клеток либо создающие цитогенетические предпосылки для развития неопластической конверсии. Нельзя исключить, что формирование лимфомы Беркитта обусловливается наличием особой популяции лимфоцитов, являющихся для ВЭБ клетками-мишенями.

При других злокачественных лимфопролиферативных заболеваниях, таких как хронический лимфолейкоз, саркоидоз, иные лимфомы, ДНК ВЭБ с помощью современных методов в клетках обнаружить не удалось.

Потенциально онкогенные герпесвирусы. К этой группе относятся вирусы простого герпеса (Herpes simplez) 1-го и 2-го типов (HSV1 и HSV2) и вирусы цитомегалин, обладающие трансформирующей активностью in vitro. HSV1 и HSV2 индуцируют опухоли у хомяков при введении новорожденным животным.

ДНК HSV (молекулярная масса 96×10^6) состоит из областей A, B, C, L и S′, которые организованы в последовательности AB—L — B′A′A′C′—S′—CA. Терминальные области AB и CA составляют соответственно 6 и 4,5% и в обратной форме повторяются внутри генома HSV, ограничивая уникальные последовательности L и S′, составляющие 70 и 9% соответственно (Wilkie, 1976). Эти последовательности относительно инвертированы в различных молекулах ДНК в пределах популяции вируса (Wilkie e. a., 1977). На основании данных анализа, проведенного с помощью рестриктаз и молекулярной гибридизации, Skare и Summers (1977) приходят к выводу, что геном HSV состоит из двух частей с молекулярными массами 80×10^6 и 16×10^6, и эти части могут располагаться в молекуле ДНК HSV в любом воз-

можном порядке и при любой ориентации. Таким образом, возможны четыре варианта структуры генома HSV. Построены физические карты этих форм, различающиеся по расположению повторяющихся и уникальных последовательностей. Предполагают, что описанные четыре типа молекул ДНК HSV содержат весь набор нуклеотидных последовательностей ДНК HSV, но различно организованных. До сих пор мало известно о репликации ДНК HSV и организации трех наборов структурных генов, кодирующих вирусспецифические полипептиды α, β и γ, синтез которых осуществляется последовательно и координированно. Определен участок инициации синтеза ДНК HSV (Hirch e. a., 1976).

HSV1 и HSV2 чрезвычайно широко распространены среди людей (Ozaki e. a., 1980). Установлено, что антитела, нейтрализующие к HSV, встречаются чаще (85% случаев) и в более высоких титрах у женщин, больных раком шейки матки, чем у здоровых в соответствующих возрастных группах (12%). В опухолевых клетках методом иммунофлюоресценции обнаруживается антиген HSV2, и из клеток карциномы шейки матки неоднократно выделяется вирус герпеса 2-го типа. С помощью иммунофлюоресценции показано, что один из ранних белков этого вируса синтезируется при малигнизации эпителиальных клеток в 75% популяции, тогда как в норме он выявлен лишь в 7% клеток. Приблизительно 39% генома HSV2 ассоциировано с хромосомальной ДНК из клеток злокачественной опухоли шейки матки человека (Minson e. a., 1976). Вместе с тем другим авторам подтвердить наличие тесной ассоциации HSV2 с клетками карциномы шейки матки в опытах по молекулярной гибридизации не удалось. Вопрос о трансформирующем действии HSV1 и HSV2 на человеческие клетки остается также открытым (Petersen, 1977).

Инактивированные ультрафиолетовым облучением вирусы герпеса 1-го и 2-го типов трансформируют клетки хомяков, крыс и мышей, которые при имплантации вызывают у животных метастазирующие опухоли. Однако, хотя у таких животных появляются вируснейтрализующие антитела, в опухолевой ткани вирусная ДНК, как правило, не определяется.

В сыворотках крови животных с опухолями выявлен фактор, угнетающий цитотоксичность лимфоцитов по отношению к трансформированным клеткам, но не к клеткам, литически инфицированным HSV2. Предварительная иммунизация хомяков инактивированным HSV2 и убитыми трансформированными клетками не приводит к подавлению роста опухоли. Обнаружены антигенные перекресты между вирусом простого герпеса 2-го типа, опухолями хомяков, ассоциированными с HSV2, и клетками карциномы шейки матки человека. Опухоли хомяков, индуцированные гибридным вирусом SV 40×A7, не имеют общих антигенов ни с HSV2, ни с клетками рака шейки матки женщин. Сыворотки крови больных раком половых органов и полости рта в 94% случаев

реагировали в РСК с антигенами из опухолей, вызванных HSV1, и в 84% случаев — из опухолей, индуцированных HSV2. Эти же сыворотки реагировали с антигенами из клеток, зараженных цитомегаловирусом, всего лишь в 3,1% случаев. Сыворотки крови здоровых людей взаимодействовали с герпесиндуцированными антигенами в 16%, а с антигенами, ассоциированными с цитомегаловирусом,— в 11% случаев. Установлено, что ранний вирусспецифический белок AG-4, являющийся минорным компонентом HSV2, связан с быстрорастущей чешуйчатой цервикальной карциномой женщин и именно он индуцирует синтез в организме больных комплементсвязывающих антител, относящихся к IgM-классу, антитела же к структурным белкам вириона HSV2 представлены IgG (Strand, Aurelian, 1976; Thiry, 1976).

В клетках, зараженных вирусами простого герпеса, определяется до 50 герпесиндуцированных белков. Strand и Aurelian (1976) разделяли 47 белков HSV2 на четыре группы в соответствии с динамикой их синтеза в пределах цикла репликации вируса. По электрофоретической подвижности 24 полипептида HSV2 идентичны вирионным белкам. Остальные 23 белка отнесены к неструктурным полипептидам. В вирионах HSV1 обнаружены 33 полипептида, одни из которых содержат углеводные компоненты. Герпесспецифические белки являются первичными продуктами трансляции мРНК и не претерпевают быстрых посттранскрипционных превращений. Все они еще мало изучены. Идентифицировано четыре белка (71 000, 50 000, 20 000 и 16 000), которые прочно, но нековалентно связаны с ДНК HSV (Hyman, 1980). Bookout и Levy (1980) исследовали свойства белков, синтезирующихся в клетках, зараженных HSV1 и HSV2. Оказалось, что полипептиды HSV1 и HSV2 отличаются по внутриклеточной локализации, способности к связыванию с ДНК и фосфорилированию после синтеза. Выявлено два типа полипептидов герпесвирусов: 1) селективно накапливающиеся в цитоплазме или ядре и 2) накапливающиеся в значительных количествах в цитоплазме и ядре без преимущественного распределения. Для HSV1 обнаружено 22 фосфопротеида, для HSV2 — только 16. 23 полипептида HSV1 и HSV2 обладают выраженным сродством с ДНК. Таким образом, по свойствам основных полипептидов, синтезирующихся в зараженных клетках, герпесвирусы 1-го и 2-го типов идентичны.

При непермиссивных условиях (повышенная температура) интактный вирус HSV1 in vitro. по-видимому, трансформирует клетки легкого человека.

Итак, HSV2 имеет четко выраженное сродство с генитальными органами и, вероятно, передается половым путем. Вместе с тем встречаются больные раком шейки матки, в организме которых антител к вирусу нет. HSV1 ассоциирован с кожей и слизистой губ и носоглотки. Оба вируса обладают трансформирующей способностью in vitro в отношении клеток хомяков и индуцируют опухоли in vivo при введении новорожденным животным. Однако

какова их роль в развитии естественно возникающих опухолей человека (рака шейки матки, полости рта и легкого), в настоящее время определить трудно. Описанные выше факты не исключают, но и не подтверждают полностью их прямое участие в бластоматозных процессах у людей.

От больных со злокачественными новообразованиями непосредственно из тканей опухолей часто выделяют вирусы цитомегалии. Установлена специфическая связь цитомегаловирусов с саркомой Капози, по эпидемиологии напоминающей лимфому Беркитта. Однако геном цитомегаловирусов или его фрагменты в опухолях человека, в том числе и в саркоме Капози, не обнаружены (Zur Hansen, 1975). Вероятно, активация и размножение цитомегаловирусов у онкологических больных происходят в результате подавления иммунитета. Правда, по-видимому, осуществлена опухолевая трансформация клеток легкого эмбриона человека цитомегаловирусом (штамм Mj). Эти клетки, трансплантированные бестимусным мышам, через 2—3 недели формировали прогрессивно растущие опухоли, в клетках которых (культивируемых in vitro) обнаружены поверхностный и цитоплазматический антигены, специфичные для цитомегаловирусов (Geder e. a., 1977).

Канцерогенез и персистенция геномов ДНК-содержащих опухолеродных вирусов

Из пяти групп известных в настоящее время ДНК-содержащих вирусов только одна группа Parvo (мелкие с однонитевой молекулой ДНК и кубическим типом симметрии) не имеет представителей в семействе онковирусов. Важно отметить, что число онкогенных типов в каждой из четырех групп возрастает по мере исследования их потенциальной трансформирующей способности in vivo и in vitro. Результаты сероэпидемиологических исследований свидетельствуют об исключительно широком распространении онкогенных ДНК-содержащих вирусов в популяции природных хозяев (все взрослые животные сероположительны), при этом отмечается чрезвычайно низкая частота естественно возникающих опухолей, вызываемых этими вирусами. Основной (а иногда, может быть, единственный) путь передачи ДНК-содержащих онковирусов — горизонтальная инфекция, причем она может наблюдаться в самые первые дни жизни. Именно в этот наиболее уязвимый период для организма новорожденные (затем сосунки) имеют надежную защиту от онкогенного воздействия вирусов, которую обеспечивают пассивно переданные им матерью антитела. К моменту исчезновения противовирусных антител у взрослых животных резко снижается чувствительность как к самому вирусу, так и к проявлению его бластомогенных потенций. Ин-

фекция же приводит к латентному носительству и сопровождается стойким иммунитетом.

Таким образом, важно, что ДНК-содержащие онковирусы и их геномы могут оставаться в организме в течение всей его жизни после однократного заражения независимо от того, произошло ли оно во время внутриутробного развития или в более позднем возрасте. Вместе с тем до сих пор остаются не совсем ясными общие черты макромолекулярных механизмов, управляющих латентностью столь различных вирусов и реактивацией их геномов. Вероятно, молекулярные механизмы на уровне клетки одновременно с иммунологическими факторами, которые при инфицировании ДНК-содержащими онковирусами довольно часто детерминируют резистентность или чувствительность природного хозяина к бластомогенному действию вирусов, определяют и разные типы латентности и персистентности вирусных геномов. Например, для представителей паповавирусов (полиомы, SV 40) характерна так называемая «классическая» бессимптомная латентная персистенция с продукцией и выделением инфекционного вируса. В таких условиях, как правило, только в исключительно редких случаях ДНК-содержащие онковирусы могут стать причинами бластоматозных процессов у естественных хозяев. Это может произойти при резком снижении иммунитета в силу различных причин или если какой-либо клеточный клон, трансформированный онковирусом, благодаря разным факторам приобретает селективные преимущества по типу иммунологического усиления, то есть получает возможность беспрепятственно размножаться и формировать опухолевый узел. Нельзя также исключить того, что онкогенность ДНК-содержащих опухолеродных вирусов по аналогии с вирусом болезни Марека может проявляться и усиливаться при кооперации с онкорнавирусами.

Герпесвирусы наряду с «классическим» типом бессимптомной инфекции могут также латентно присутствовать в клетке, не трансформируя и не убивая ее, то есть без вегетативного размножения. Предложены предполагаемые модели латентности вирусов простого герпеса (Rapp, Colberg-Polev, 1980).

Установлено, что продуктивная инфекция и трансформация клеток под действием ДНК-содержащих опухолеродных вирусов обычно взаимоисключают друг друга: клетки природного хозяина главным образом продуктивно инфицируются (пермиссивные), в то время как клетки другого вида чаще трансформируются (непермиссивные). Однако не всегда пермиссивность обусловливается «природной» клеточной системой — иногда опухолеродные вирусы могут обладать довольно широким спектром цитопатогенного действия на клетки других видов животных. Иными словами, пермиссивность зависит от наличия клеточных факторов, необходимых для репликации. В клетках природного хозяина с определенным типом дифференцировки такие факторы репликации для некоторых вирусов могут отсутствовать. Например, для

вирусов группы герпеса лимфоидные клетки природного хозяина являются непермиссивной системой, в то время как фибробласты или эпителиальные клетки — пермиссивной. Таким образом, проявление бластомогенных потенций ДНК-содержащих опухолеродных вирусов в системе in vivo, во-первых, зависит от факторов, определяющих пермиссивность клеток, а во-вторых, обусловливается состоянием иммунокомпетентной системы.

В настоящее время общепризнано, что абортивная инфекция, то есть прерывание полного цикла репродукции опухолеродного вируса на любом этапе, в силу различных причин (это прежде всего относится к ДНК-содержащим вирусам) является обязательным фактором, обусловливающим неопластическую трансформацию. Такое прерывание вегетативного цикла может возникать при инфекции полным инфекционным вирусом генетически резистентных клеток, при инфекции дефектным вирусом пермиссивных клеток и, наконец, при инфекции полным вирусом восприимчивых клеток в непермиссивных условиях, например, при высокой температуре (42°С). От 0,2 до 50% абортивно инфицированных клеток при соответствующих условиях трансформируется. Клетки, трансформированные ДНК-содержащими опухолеродными вирусами, как правило, не реплицируют инфекционный вирус, но в них постоянно реализуются определенные функции вирусных генов.

Считают, что именно абортивная форма отношений вируса и клетки наиболее благоприятна для встраивания вирусного генома в клеточный. Интегрированный вирусный генетический аппарат, как недавно установлено, является сильным эпигеномным фактором, способным переключать обмен веществ в клетке по типу прогрессирующей автоматизации за счет блокирования и дерепрессии определенных клеточных оперонов (Агеенко, 1974, 1975, 1978; Dulbecco, 1976). Подобные внегеномные перестройки функционирования генома клетки в некоторых случаях приводят к их опухолевой трансформации. Предполагают, что эпигеномную регуляцию выполняют ранние белки и нетранслирующие РНК у опухолеродных вирусов, в то время как у инфекционных они репрессируют синтез клеточных ДНК и РНК. Однако этот вариант отношений, за редким исключением, имеет место и у опухолеродных вирусов.

Итак, чтобы ДНК-содержащий опухолеродный вирус проявил бластомогенное действие, необходимо сочетание следующих условий: 1) наличие в геноме онковируса раковых генов, ответственных за трансформацию; 2) непермиссивность клеток, то есть вирус должен инфицировать клетки, не вызывая их гибели, а, наоборот, изменяя их метаболизм и т. д., и тем самым создать некоторые селективные преимущества; 3) осуществление стойкой интеграции вирусного генома с клеточным, так как только при этом возможно стабильное наследованное закрепление функционирования онкогенов вируса.

Онкогены ретровирусов и неопластическая трансформация клеток

Изучение механизмов неопластической трансформации с позиции вирусогенетической теории рака принесло следующие крупные открытия:

1. В составе вирионов ретровирусов открыт фермент обратная транскриптаза, или ревертаза.
2. Показаны широкое распространение некоторых ретровирусов *С*-типа среди позвоночных и, главным образом, вертикальная их передача.
3. Обнаружены эндогенные вирусы, что ознаменовало новый этап в развитии вирусогенетической теории рака и потребовало пересмотреть не только проблему онкогенеза в целом, но и происхождение ретровирусов.
4. Выявлена возможность индукции различными мутагенами, а также химическими и физическими канцерогенами эндогенных вирусов из нормальных клеток.
5. Доказано существование ДНК-провируса, в первую очередь, в экспериментах по трансфекции.
6. Выделены и охарактеризованы структурные белки вириона и переосмыслены представления о белках онкорнавирусов, поскольку выяснилось, что с их помощью могут решаться вопросы происхождения вирусов, их генетического родства и эволюции.
7. Получены ts-мутанты ретровирусов, что дало возможность проводить генетические исследования и картировать вирусный геном.
8. Определена последовательность генов в вирионных РНК ретровирусов птиц и грызунов: 5′-кэп-gag-pol-env-src-C-A_{200}-3′, а также получены ДНК-транскрипты отдельных генов, в частности, гена src.

Вирионы онкорнавирусов содержат высокомолекулярную геномную 60—70 S РНК, состоящую из двух идентичных субъединиц однонитевой 30—40 S РНК, соединенных водородными связями в области 5′-концов, то есть эта группа вирусов имеет сегментарно-полиплоидный геном. Быстро седиментирующая 60—70 S РНК превращается в 30—40 S-компонент после нагревания или обработки диметилсульфоксидом, мочевиной и формальдегидом, при этом не изменяется конформация молекулы, а уменьшается только молекулярная масса. Молекулярная масса каждой субъединицы, в которой содержится вся генетическая информация ретровируса, варьирует от вируса к вирусу от $2{,}5\times10^6$ до 5×10^6 (обычно $2{,}7$—$3{,}2\times10^6$, 35 S РНК). В настоящее время проводится интенсивная работа по определению нуклеотидных последовательностей 35 S РНК на модели вируса саркомы Рауса. Эти исследования прежде всего уточнят картирование отдельных функций генома ретровирусов, а также позволят более точно установить природу вирусных белков.

Низкомолекулярный гетерогенный компонент РНК (4—28 S) составляет 20—25% от тотальной молекулярной массы вирионной РНК. Одни типы 4 S РНК выполняют функции тРНК и акцентируют аминокислоты. Другие, содержащие около 65% гуанина и цитозина,— играют роль «праймера» (затравки) на матрице и обеспечивают тем самым инициацию синтеза ДНК со свободного 3′-конца затравочного олигонуклеотида, от которого идет ковалентное удлинение растущей ДНК.

35 S РНК-субъединица содержит полиадениловые последовательности, ковалентно прикрепленные к 3′-концу молекулы. Этот поли-А-фрагмент состоит из 100—200 адениловых остатков с коэффициентом седиментации 3—4 S.

В присутствии эндогенной затравки (тРНК-три), локализованной у 5′-конца вирусного генома, синтезируется ДНК-продукт (strong-stop ДНК), ковалентно связанный с тРНК, длина которого от затравки до 5′-конца матрицы составляет 101 нуклеотид (Haseltine e. a., 1977). После секвенсирования strong-stop ДНК стала известна последовательность 101 основания 5′-конца генома RSV (штамм Прага, субгруппа С). При сопоставлении нуклеотидных последовательностей 3′- и 5′концов молекулы РНК оказалось, что по крайней мере первые 20 нуклеотидов идентичны последним 20 и, следовательно, геном RSV имеет на концах повторяющийся участок. Аналогичные данные получены в отношении вируса миелобластоза птиц (Stoll e. a., 1977). Наличие таких повторяющихся последовательностей делает возможной элонгацию ДНК-продукта по достижении 5′-конца матрицы вследствие образования водородных связей между strong-stop ДНК и комплементарной последовательностью на 3′-конце РНК, то есть циркуляризации молекулы после синтеза strong-stop ДНК и последующего «перескока» ДНК с 5′- к 3′-концу молекулы матрицы. Электронно-микроскопические данные, главным образом для онкорнавирусов приматов, свидетельствуют о том, что две субъединицы РНК связаны друг с другом по 5′-концам. Учитывая установленную нуклеотидную последовательность 3′ и 5′-концов РНК RSV и AMV, предложены две гипотетические модели образования димеров при взаимодействии 5′-концов двух молекул РНК.

Итак, показано, что 5′- и 3′-концы генома онкорнавирусов, исключая «закрывающие» структуры — «кэпы» у 5′-конца и поли-А-сегменты у 3′-конца, содержат идентичные последовательности длиной в 20—21 нуклеотид. У многих онкорнавирусов определены «кэпы», например, идентифицирован специфический терминальный фрагментна 5′-конце 35 S РНК RSV и MuLV (штамм Молони). Этот фрагмент устойчив к действию нуклеазы, имеет структуру, состоящую из 5′-нуклеозидтрифосфата и рибозы, метилизированной в 2′-положении. К рибозе присоединяется 7-метилгуанозин в 5′-положении через 5′—5′-пирофосфатную связь ($7mG^5\times$ $\times ppp^5$. $GmpCp^-$) (Rose e. a., 1976). Вероятно, «кэпы», с одной

стороны, предохраняют 5′-конец РНК от действия эндонуклеаз, а с другой, как установлено, они необходимы для образования инициирующих комплексов мРНК с рибосомами. Вместе с поли-А-фрагментами на 3′-конце «кэпы» делают молекулу 35 S относительно стабильной.

Ретровирусы в зависимости от локализации и структуры вирионов подразделяются на четыре основные группы — *С, В, А* и *Д*. Частицы *С*-типа имеют диаметр 60—150 нм и содержат электронно-оптически плотный нуклеоид величиной около 80 нм, расположенный в центре вириона. Характерный признак их морфогенеза — формирование нуклеотида и самого вириона на наружной плазматической мембране клетки, причем вирусная частица может созревать и после отделения ее от клетки. Вирионы *С*-типа наиболее распространены среди позвоночных и у разных видов животных могут значительно отличаться один от другого размерами и структурой нуклеоида.

Частицы *В*-типа диаметром 80—120 нм обладают электронно-оптически плотным асимметрично расположенным нуклеоидом размером около 50 нм, имеющим отчетливо различимую одинарную мембрану. На наружной поверхности вирионов находятся отростки длиной не более 7—10 нм и диаметром 7,5 нм. Для вирионов *В*-типа характерен высокий полиморфизм, основное отличие их морфогенеза от вирусов *С*-типа — формирование нуклеоида в цитоплазме клетки. Онкорнавирусы *В*-типа — возбудители рака молочных желез мышей (вирус Биттнера MTV). Предполагают, что группа внутриплазматических вирионов *А*-типа является предшественником частиц *В*-типа. Морфологию частиц *Д*-типа имеют вирус обезьян Мезон-Пфайзер, а также вирусы, выделенные из перевивных клеток человека и из клеток обезьян саймири и лангуров. В настоящее время об онкогенности и онкогенах этой группы вирусов неизвестно. Отсутствуют также данные об онкогене вируса Биттнера. Вместе с тем показано, что в опухолях, индуцированных MTV, имеет место дополнительная интеграция вирусного материала на фоне сходных или идентичных эндогенных провирусов (Cohen, Varmus, 1980). Перераспределение провирусов необходимо для экспрессии эндогенного потенциала MTV.

В обширную группу ретровирусов *С*-типа (более 100 типов) входят вирусы, вызывающие в естественных условиях у своих природных хозяев саркомы, лейкозы, эпителиальные опухоли (раки) птиц, саркомы и лейкозы мышей, крыс, хомяков, морских свинок и обезьян. Ретровирусы *С*-типа характеризуются исключительной способностью быстро трансформировать культуры разных видов клеток (при определенных условиях вирус куриной саркомы Рауса, например, в течение 24 ч трансформировал более 90% инфицированных клеток) и легко преодолевать тканевые, видовые и классовые барьеры. В частности, чрезвычайно широким оказался диапазон бластомогенного действия вируса Рауса (RSV).

Этот вирус индуцировал опухоли у трех классов животных: птиц, млекопитающих и рептилий. Поскольку в естественных условиях циркулируют смешанные популяции вирусов лейкозов и сарком, которые тесно взаимодействуют друг с другом и имеют общие физико-химические и морфологические свойства, их принято обозначать как онкорнавирусы *С*-типа саркомно-лейкозного комплекса.

Среди природных хозяев ретровирусы распространяются двумя путями: от животного к животному (горизонтальный путь) и от матери к плоду (вертикальный путь). Поскольку в последние 10 лет установлено, что геном ретровирусов входит в виде нормальной составной части в хромосомальную ДНК клетки грызунов и птиц и передается как обычный наследственный признак, постулируется и наследственная передача вирусной генетической информации в составе клеточного генома. Показано, например, что при скрещивании высоколейкозных мышей линии AKR (этиологическим агентом спонтанного лимфолейкоза у них является эндогенный вирус AKR или вирус Гросса) с низколейкозными линиями частота развития лейкозов наследуется у мышей-гибридов F_1 (первое поколение) строго по законам наследования Менделя. Вирус Гросса локализован в седьмой паре хромосом (группа сцепления I), передается по доминантному[1] признаку наследования и является экотропным (вирусы, способные размножаться только в клетках природного хозяина, в данном случае — мышей) эндогенным вирусом. Помимо экотропных, у мышей имеются еще два класса вирусов типа *С*: ксенотропные (размножающиеся только в гетерогенных клетках крысы, кролика и др.) и амфотропные (размножающиеся как в клетках мышей, так и в клетках других животных). Геном тех и других вирусов является составной частью нормального клеточного генома (хромосомной ДНК) и локализуется во многих хромосомах всех инбредных и диких мышей. В отличие от экотропных вирусов мыши не способны к продукции инфекционных ксенотропных вирусов.

В геноме ретровирусов *С*-типа птиц и грызунов идентифицировано четыре гена. Расположены они в молекулах РНК в следующем порядке: 5′-gag (ген, кодирующий синтез внутренних ядерных структурных группоспецифических белков) — pol (кодирует обратную транскриптазу) — env (кодирует синтез белков — гликопротеидов оболочки) — src (саркомный ген — онкоген, ответственный за трансформацию фибробластов in vitro и in vivo) — *С* (общий фрагмент) — поли — А — 3′. Трех генов (gag, pol и env) достаточно для воспроизведения вирусного потомства. Четвертый ген src и общая область генома *С* (common) определяют способность вируса к индукции опухолевой трансформации. Ориентация генов в геноме ретровирусов *С*-типа сарком кошек FeSV несколько иная: 5′—gag—src—env—C—3′ (Sherr e. a, 1980).

[1] Доминантность — преимущественное появление в фенотипе одного из двух парных генетических признаков, в противоположность рецессивному признаку.

Src-последовательности размером 1,5 кб (килобаз, тысяч пар оснований) расположены в центре молекулы.

35 S РНК (субъединица «а») недефектных по трансформации вирусов сарком птиц в среднем на 12% длиннее (за счет гена src) 35 S РНК (субъединица «в») вирусов лейкозов (Billeter e. a., 1976; Stéhelin, 1976). Ген src, как установлено, не нужен для репродукции ретровируса и легко утрачивается у значительной части популяции вирионов при их культивировании in vitro. При этом образуются мутанты, дефектные по трансформации (td-мутанты), однако способные нормально размножаться в чувствительных клетках.

Обязательным этапом репродукции каждого ретровируса является синтез ДНК-провируса на матрице вирионной РНК с помощью вирионной ревертазы. Эта ДНК-копия вирусной РНК, имеющая кольцевую форму, является генетическим материалом вирусов в клетке. ДНК-провирус инфекционен, минимальная величина его размера составляет 6×10^6 (Hill e. a., 1975). Заражение клетки всегда сопровождается интеграцией ДНК-провируса в клеточный геном и, таким образом, осуществляется стойкое закрепление в клетке вирусных генов, включая и онкоген. С интегрированного ДНК-провируса с помощью клеточной полимеразы в ядре транскрибируются вирусспецифические РНК с образованием вирионной (35 S РНК) и матричных РНК. Затем они транспортируются в цитоплазму, где часть из них направляется в рибосомы и синтезирует (транслирует) вирусспецифические белки (вначале высокомолекулярный белковый предшественник), а часть (вирионные 35 S РНК) включается в формирующиеся вирионы. Образовавшиеся вирусные частицы отпочковываются от клеточной мембраны, после чего проникают в другие клетки, где с помощью ревертазы опять транскрибируются в ДНК.

В пермиссивных куриных клетках, трансформированных недефектным вирусом куриной саркомы Рауса (RSV), образуется три типа мРНК: 35 S, 28 S и 21 S. 35 S мРНК, которая не отличается от вирионной 35 S РНК, в клетке, как установлено, может выполнять следующие функции: 1) является информационной (матричной) для белков генов gag и pol, то есть осуществляет образование продуктов этих генов; 2) инкапсулируется (включается) в формирующиеся вирионы; 3) превращается в 21 S мРНК гена env в результате последовательного процессинга, включающего внутреннее разрезание и сшивание (Stacey, Hanafusa, 1978; Krzyzek e. a., 1979; Stacey, 1979). Такая реорганизация (сплайсинг) исходных вирусных молекул необходима для того, чтобы мРНК могла функционировать в качестве матрицы. Вероятно, не более 50% 35 S РНК в ядре способно превращаться в env-специфическую 21 S РНК, а остальная часть 35 S РНК транспортируется в цитоплазму. По-видимому, эти соотношения контролируются на уровне процессинга. Показано, что активность, осуществляющая превращение 35 S РНК в 21 S РНК, присутствует и в яд-

рах незараженных клеток. 35 S, 28 S и 21 S мРНК ретровирусов *С*-типа птиц и мышей имеют общую лидирующую последовательность на 5′-конце молекулы. Эти общие последовательности 5′-конца, присоединяющиеся к индивидуальным вирусспецифическим мРНК, необходимы для функционирования последних. 35 S РНК содержит гены gag, pol, env и src. Во всех трех типах мРНК (35 S, 28 S и 21 S) идентифицированы src-последовательности, а 28 S РНК кодирует помимо этого еще и продукты гена env. Предполагается, что мРНК, кодирующие продукты генов env и src, содержат транслируемую часть 3′-концевого участка вирусного генома. Они содержат также сегменты, происходящие с 5′-конца генома, включая уникальную последовательность, и, по-видимому, последовательность, включающую участок связывания с РНК-затравкой. Следовательно, мРНК env и src образуются в результате сшивания фрагментов, происходящих из различных областей генома. Механизм транспорта вирусспецифической РНК из ядра в цитоплазму неизвестен, однако можно предполагать, что он идентичен механизму переноса клеточных мРНК. В вируспродуцирующих клетках из ядра в цитоплазму выходят все типы вирусных мРНК, в то время как в вируснепродуцирующих (непермиссивных) клетках они не транспортируются.

Структурные белки ретровирусов

Структурные белки вирионов всех онкорнавирусов составляют основу оболочки вируса и его нуклеоида (внутренний рибонуклеопротеид). Каждый вирион обладает двумя принципиально отличающимися антигенными активностями, которые обусловливаются, с одной стороны, основным белком нуклеоида (группоспецифическая — gs-антиген — и подгруппоспецифическая антигенность — sub-gs), с другой — белками оболочки (типоспецифическая — ts — и подтипоспецифическая антигенность — sub-ts), характеризующими данный тип (штамм) вируса.

Согласно последней номенклатуре, простые белки онкорнавирусов обозначают буквой p (protein), а гликопротеиды — gp (glicoprotein) с указанием молекулярной массы, уменьшенной в 1000 раз, в килодальтонах (*КД*). Перед буквой помещают сокращенное название вируса. После цифры обозначают тип антигенной активности. Например, MuLV p30 gs — это белок вируса лейкоза мышей с молекулярной массой 30 000, обладающий групповой антигенной активностью. Если известна локализация белка в вирионе, то принимают дополнительные обозначения: *C* (core) — белок, ассоциированный с ядром вируса, *N* — белок, связанный с нуклеопротеидом, *E* (envelope) — белок, связанный с оболочкой. Это обозначение ставят в скобках между цифрой и типом антигенной активности.

Современный метод исследования индивидуальных белков вириона онкорнавирусов включает предварительную деструкцию

вители субгрупп *A*, *B* и *E* несут идентичную генетическую информацию, ответственную за синтез вирусных низкомолекулярных полипептидов. Из ALV подтипа *A* и RSV-штаммов подгрупп *B* и *C* получены рекомбинанты, которые в 14 из 17 случаев имели p19 RSV. У рекомбинантов обнаружены ген поверхностного гликопротеида подгруппы *A* и саркоматозный ген вирусов подгрупп *B* и *C* (Hayman, Vogt, 1976). Получены данные, позволяющие предполагать, что белок p12 является раскручивающим для нуклеиновых кислот и играет, таким образом, важную роль в процессах вирусной репликации и трансляции. Белок p19 выполняет репрессорные функции в этих процессах, а p15 осуществляет нарезание собственного предшественника и Pr 180 gag+pol (Moeliny e. a., 1980).

Основным (в том числе и в количественном отношении) белковым группоспецифическим компонентом вирусов ретикулоэндотелиоза птиц (REV) является полипептид p20 gs. Кроме того, в REV присутствуют белки gp73, gp37, p19, p15, p13. Хотя полипептидные профили RSV и REV очень сходны между собой, перекрестно реагирующие антигенные детерминанты у REV p29gs и RSV 27gs отсутствуют.

Растворимые gs-антигены, характерные для вирусов саркомно-лейкозного комплекса птиц и мышей, не имеют общих антигенов.

Вирионы онкорнавирусов *C*-типа млекопитающих также содержат два гликопротеида — gp69/71 и gp45 (основной из них— gp69/71) и четыре обычных белка — p30, p15, p12 и p10, то есть на один белок меньше (отсутствует p19), чем у вирусов птиц. Определен аминокислотный состав обоих гликопротеидов, который оказался у них одинаковым (Marquard e. a., 1977). У обоих белков N-концевой аминокислотой является аланин. Белковая часть gp70 равна gp45. Углеводы составляют 32% gp70 и 6—9% gp45. Углеводы gp70 представлены глюкозамином, галактозамином, маннозой, галактозой, фукозой и нейраминовой кислотой. Антисыворотки против обоих белков перекрестно реагируют. Таким образом, основное отличие между gp70 и gp45 заключено в углеводной части молекулы. За последние годы наиболее детально исследованы три белка — gp69/71, p30 и p15, кодирующиеся вирусными генами. Вместе с тем представлены данные, согласно которым различия в размерах вирусного gp69/71, например, в вирионах Ki-MSV (MuLV), продуцируемых различными типами клеток, контролируются клетками хозяина (Galehouse, Duesberg, 1976).

С помощью электрофореза в полиакриламидном геле показано, что высокоочищенный препарат gp69/71 из оболочки вириона лейкоза Раушера содержит цепи с молекулярной массой 69 000 и 71 000. Идентичное взаимодействие с обоими гликопротеидами антисывороток к аналогичным белкам других онкорнавирусов С-типа млекопитающих позволяет предположить, что эти гликопротеиды вирусов *C*-типа имеют идентичные или весьма схо-

жие групповые и межвидовые антигенные детерминанты. Моноспецифическая антисыворотка к gp69/71 оказывает четкое вирус-нейтрализующее действие, причем эта активность проявляется и по отношению к другим онкорнавирусам *С*-типа мышей, включая эндогенные экотропные и ксенотропные вирусы. Получены данные, согласно которым в составе вириона gp69/71 связан дисульфидными связями с неглюколизированным белком p15 (E), образуя комплекс, ассоциированный с наружной мембраной вириона. Белок p30 (его молекулярная масса колеблется в пределах 27 000—30 000) является главным структурным протеином, составляющим 10—30% от содержания белков в вирионе. Этот неглюколизированный протеин, как и gp69/71, обладает всеми тремя типами антигенной активности: групповой gs-1 (только для группы *С*-типа данного вида хозяина), межгрупповой (interspec) gs-3 (общей для вирусов *С*-типа разных видов млекопитающих) и типоспецифической. Радиоиммунологическими методами показано, что p30 вируса Раушера обладает типоспецифическими детерминантами, которые не выявляются у аналогичных белков других вирусов мышей. Протеин p15 основного характера составляет 5% от содержания белков в вирусе, имеет типоспецифические (в большинстве), групповые и межвидовые антигенные детерминанты. Основные p12 и p10 имеют как типовую, так и групповую антигенные активности и проявляют еще более яркую типовую специфичность в серологических тестах, чем p15. Соотношение разных типов антигенной активности различно у каждого белка.

Сравнительный анализ, проведенный методом гель-фильтрации, показал, что профили полипептидов вирусов лейкоза мышей Раушера, Молони и Гросса очень похожи. Карты триптических пептидов, полученных в этой же системе, для белков p30 и p10 всех трех вирусов также сходны между собой. Вместе с тем карты триптических полипептидов p15 и p12 этих же вирусов различаются больше и отражают даже штаммовую специфичность вирусов. Следует подчеркнуть, что такой анализ пептидных карт является высокочувствительным биохимическим методом типирования белков, который позволяет, например, отличать полипептид p30 *N*-тропного от *В*-тропного вируса лейкоза мышей, полученных от одной линии мышей BALB/c.

Анализ антигенных свойств p12 вируса Гросса показал, что этот белок содержит главным образом типоспецифические детерминанты, родственные соответствующим детерминантам вирусов Кирстен и ксенотропных вирусов BALB/c, то есть вирусов подгруппы Гросса (Strand, August, 1977). В то же время перекрест исследованного белка с p12 вирусов подгруппы FMR отсутствует. Авторы отмечают, что p12 вируса Гросса обладает также gs-детерминантами, но их количество очень невелико по сравнению с типоспецифическими. Общие межвидовые детерминанты обнаружены у p12 вируса Гросса и вируса лейкоза кошек, однако об-

Таблица 3. Структурные белки ретровирусов птиц и мышей

Полипептиды вирионов		Структурные компоненты	Субструктура вириона
птиц	мышей		
gp85—S / gp35—S	gp71—S / p15E—S	Головка / Шип	Наружная оболочка
p10	p12E	Наружная оболочка	
p19	p12	Внутренняя мембрана	Внутренняя мембрана
p27	p30	Капсула сердцевины	Сердцевина
p15	p15C	Сердцевина	
p12	p10	Нуклеопротеид	
p91(β) p64(α)	p70(α)	Обратная транскриптаза	Рибонуклеопротеид

щие детерминанты между p12 и белками вируса приматов не выявлены. Отмечается наличие общих детерминант между p12 вируса Гросса и p15 вируса Раушера.

Несмотря на то, что вирусы лейкоза Френд, Раушера и Молони по критериям цитотоксичности и нейтрализации принадлежат к одной подгруппе FMR, штамм Молони лишь отдаленно родствен группе Френд-Раушера по результатам конкурентного радиоиммунологического теста с p15 и p10. Данные комбинированного исследования низкомолекулярных полипептидов вирусов Молони и Кирстен, проведенного с помощью радиоиммунологического метода, позволяют предполагать, что ксенотропные вирусы, вероятно, составляют группу (группы) мышиных лейкозных вирусов с различающимися типоспецифическими антигенными детерминантами.

Bolognesi e. a. (1978) на основании собственных исследований и данных литературы суммировали структурные белки ретровирусов *C*-типа птиц и мышей следующим образом (табл. 3).

Гликопротеид 69/71 синтезируется в клетках селезенки мышей с лейкозами, которые вызывались всеми исследованными штаммами лейковирусов мышей. Соотношение концентрации gp69/71 и p30 у различных штаммов широко варьирует, что указывает на некоординированную экспрессию генов, ответственных за синтез этих белков.

Молекула p30 состоит из 250 аминокислот, определен аминокислотный состав этого белка (Burnette e. a., 1976). Начиная с 11-го остатка p30 MuLV или FeLV и 18-го SSV и GLV, следует длинный участок гомологичных 11 остатков. Этот участок характерен для всех p30 онкорнавирусов млекопитающих (Oroslan e. a., 1977). Вероятно, иммунологические различия в p30 вирусов обезьян и мышей обусловлены наличием вставок в молекулах белков вирусов приматов.

Сходство *N*-концевых аминокислот p30 вирионов *C*-типа разных видов млекопитающих позволяет предполагать, что p30 различных по видовому происхождению онкорнавирусов кодируются

сходными генами. Анализ очищенных гель-фильтрацией на биогеле А5 с последующей электрофокусировкой р30 вирусов саркомы обезьян (SSV), лимфомы гиббонов (GLV), лейкоза кошек (FeLV) и мышей (MuLV), эндогенных вирусов павианов (M7), домашних кошек (RD 114), свиней (PK 15) с помощью радиоиммунопреципитации и конкурентного радиоиммунологического теста показал наличие у этого полипептида трех классов интерспецифических антигенных детерминант. Одна группа, выявленная у вирусов грызунов (мыши и крысы), обнаруживается также и в р30 вирусов лейкозов кошек, но не в р30 вирусов *С*-типа других животных. С другой стороны, полипептиды р30 вирусов мышей содержат вторую группу антигенных детерминант, родственных детерминантам вирусов приматов (SSV и GLV) и эндогенных вирусов свиней, но отсутствующих в FeLV. Наконец, в р30 эндогенных вирусов павианов и домашних кошек присутствует третья группа интерспецифических детерминант, отсутствующая у всех исследованных вирусов *С*-типа млекопитающих. Данные по ингибированию активности обратной транскриптазы моноспецифическими сыворотками к этому ферменту из различных вирусов *С*-типа млекопитающих также свидетельствуют о том, что обратная транскриптаза, как и р30, обладает тремя группами межвидовых антигенных детерминант. Вероятно, наличие перекрестных антигенных реакций между гомологичными белками онкорнавирусов *С*-типа, выделенных от генетически далеких животных, отражает процесс переноса этих вирусов между различными видами.

Гликопротеиды вирусов *С*-типа мышей ассоциированы с наружной оболочкой вириона. Фосфорилированные р12 и р10 тесно связаны с высокомолекулярной РНК и вместе с ней формируют ядро вириона, оболочка которого, вероятно, формируется из р30. Белок р15 образует внутреннюю оболочку частиц *С*-типа мышей.

Полипептидный состав экзогенного FeLV и эндогенного RD 114 вирусов *С*-типа кошек соответственно представлен семью (р73, р68, р42, р30, р17, р14 и р12) и шестью (р86, р77, р42, р30, р15 и р13) основными белками. Ферментативное радиойодирование интактных вирионов показало, что основным белком оболочки FeLV является р68, а RD 114 — р77.

Вирионы *С*-типа млекопитающих содержат, по данным электрофореза в полиакриламидном геле, 50 полипептидных цепей, однако по количеству белков они не представляют собой однородной группы. Вирусы *С*-типа приматов, например, при наличии двух высокомолекулярных гликопротеидов — gp100 и gp70 — имеют лишь три неглюколизированных белка: р29, р12 и р10. Вместе с тем следует отметить, что некоторые полипептиды с близкими молекулярными массами у многих онкорнавирусов одинаковы или весьма схожи как в отношении иммунологических свойств, так и функциональной нагрузки. Белок, способный связываться с однонитевой ДНК из вирусов лейкоза Раушера и

саркомы шерстистых обезьян, является наиболее быстро мигрирующим протеином при электрофорезе в полиакриламидном геле и обозначается как p10 (Long e. a., 1977). По уточненным данным, молекулярная масса этого белка составляет 8000—9000. В состав вирионов онкорнавирусов *B*-типа входят четыре основных полипептида и шесть или восемь минорных компонентов. Три из четырех основных полипептидов оказались гликопротеидами: gp60, gp52 и gp37 (Yagi, Compans, 1977).

Необработанные вирионы онкорнавирусов *B*-типа содержат пять основных белков, два из которых являются гликопротеидами (gp52 и gp34), три неглюколизированных белка (p28, p18 и p12) и шесть минорных компонентов (Sarkar e. a., 1976). При обработке твином-эфиром от MTV-частиц отделяются характерные структуры (розетки), состоящие из стебля и головки. В розетках с помощью электрофореза в полиакриламидном геле выявляются четыре гликопротеида: три основных (gp34, gp55 и gp68) и один дополнительный (gp90). Предполагают, что в головку розеток входит gp55. Компонент gp34 ассоциирован с вирусной мембраной и, вероятно, локализован внутри двойного мембранного слоя. При анализе материала, освобождающегося из вирионов при обработке кислотой (0,05 N HCl, 4°C, 20 мин), обнаруживаются два гликопротеида — gp55 и gp69. Полипептидный состав фракции, устойчивой к кислоте, более сложен: основным белком является gp34, определяются два минорных белка в зоне белков с молекулярной массой 50 000—60 000, один из которых является гликопротеидом.

Основной компонент группового антигена вириона MTV gp52 содержит 10—16% углеводов. По-видимому, он расположен на поверхности вирусной частицы и составляет 25% всего белка. Кроме gp52, на поверхности вириона MTV присутствует еще несколько гликопротеидов (gp140, gp90 и gp68). Эти различия, вероятно, связаны с тем, что в более ранних исследованиях использовался MTV, выявленный в культуре ткани, а Sheffield e. a. (1976) получили его из молока. Гликопротеид gp140 под действием трипсина превращается в полипептид с молекулярной массой 125 000, gp68 вообще удаляется из вирусной частицы, а gp52 разрезается на два белка — p36 и p23. Таким образом, различные гликопротеиды на поверхности MTV чувствительны к действию трипсина, который вызывает разрыв в полипептидной цепи без изменения конфигурации молекулы. Такие молекулы остаются связанными с частицей и их присутствие не интерферирует с биологической или антигенной экспрессией вирусных функций.

Белок p28 также имеет групповые антигенные детерминанты. Общие антигены у gp52 и p28 не обнаружены. Эти белки не имеют общих антигенных детерминант с p30 вирусов *C*-типа млекопитающих. Определен полный аминокислотный состав MTV gp52 и MTV p28. N-концевая аминокислота p28 — пролин, а у gp52 это либо лизин, либо серин, либо глутаминовая кислота.

Среди основных белков MTV gp52 и gp36 ассоциированы с оболочкой, а p28, p21, p14 и p10 — с ядром (Nusse e. a., 1980). ДНК-связывающий белок с молекулярной массой 12 500 также обнаружен в препаратах MTV. Этот протеин — второй из быстромигрирующих белковых компонентов вириона и антигенно отличается от белка p10 мышиных вирусов С-типа (Long e. a., 1977).

Оказалось, что основной структурный белок p28 представлен двумя видами, имеющими одинаковый пептидный состав, но отличающимися по содержанию фосфора. В вирионах MTV обнаружен второй фосфобелок p21, который в свою очередь может быть разделен на четыре вида. Фосфорилирование этого белка осуществляется in vitro за счет протеинкиназы, ассоциированной с вирионами MTV. Этот фермент способен фосфорилировать также и p28 (Nusse e. a., 1980).

Вирион вируса Мезона-Пфайзера (M—PMV) содержит три основных полипептида: p65, p41 и p27, три белка с молекулярными массами от 12 000 до 14 500 и два минорных полипептида: p20 и p22. Антисыворотка к разрушенному вирусу практически полностью осаждает p27 и p15, которые оказались кислыми белками. Антисыворотки против различных РНК-содержащих онкогенных вирусов приматов не содержат антител, реагирующих с p27 и p15. В высокочувствительном радиоиммунологическом тесте также не обнаружено иммунологического родства с полипептидами онкорнавирусов В- и С-типов млекопитающих. Белок p27 M—PMV, выращенного в трех различных культурах клеток, обладает идентичной антигенностью. Кроме того, только клетки, инфицированные M—PMV, характеризуются значительным синтезом p27. Эти факты могут свидетельствовать о том, что p27 является вирускодируемым белком (Schochetman e. a., 1976).

Трансляция РНК онкорнавирусов в бесклеточных системах. РНК-содержащие вирусы по способности их геномных РНК к трансляции в бесклеточных системах биосинтеза белка делятся на два класса: 1) содержащие транслируемую, плюс-геномную РНК и 2) содержащие нетранслируемую, минус-геномную РНК. Все транслируемые РНК представляют собой полицистронные матрицы с одним участком инициации, синтезирующие в бесклеточных системах и в зараженных клетках вирусные полипептиды в виде гигантских предшественников, расщепление которых специфическими протезами приводит к образованию вирусспецифических белков. Геномные РНК вирусов 2-го класса выполняют функции матриц для синтеза моноцистронных мРНК, которые, транслируясь на рибосомах клетки, синтезируют вирусные белки.

Онкорнавирусы относятся к особому классу РНК-содержащих вирусов, геномные РНК которых, с одной стороны, выполняют матричные функции во время синтеза ДНК-провируса, а с другой — могут транслироваться в бесклеточных системах и, по-видимому, на рибосомах клетки-хозяина. Наличие в каждой субъединице вирионной РНК, помимо 21 метилированного нуклеозида

(из них 14—16 в форме N^6-метиладенозина) во внутренней части молекулы и двух метильных групп на 5′-конце m7 (5′) ффф (5′)$Г^m$, прежде всего позволяет предполагать (по аналогии с клеточными РНК), что 30—40 S РНК способна выполнять функции мРНК. Для исследования функциональных особенностей и трансляции РНК онкорнавирусов используются бесклеточные системы прокариотов (E. coli) и эукариотов: лизат ретикулоцитов, зародышей пшеницы, асцитных клеток, перевиваемых культур клеток животных и человека, а также ооциты шпорцевой лягушки (Xenopus laevis). Оказалось, что РНК онкорнавирусов транслируются в бактериальной системе, например, в экстракте из клеток E. coli. 35 S РНК в несколько раз активнее нативной 70 S РНК в биосинтезе белка. Отмечена и значительная разница в характере продукта трансляции нативной вирионной РНК и ее 35 S-субъединиц. Вместе с тем анализ синтезируемого белка с помощью метода преципитации специфической антисывороткой к gs-антигену показал, что как в том, так и другом случае преобладающим компонентом продукта трансляции является gs-антиген (Gielkens e. a., 1972; Siegert e. a., 1973).

В бесклеточных системах биосинтеза белка из клеток животных различного происхождения трансляция вирусных РНК разных онкорнавирусов существенно отличается, однако общей особенностью трансляции в данных условиях является ее более низкая активность (или вообще отсутствие), чем в бактериальных системах. В некоторых случаях отмечено даже неспецифическое подавление биосинтеза белка в лизатах из клеток животных, что, как предполагают, обусловливается значительно обогащенными участками вторичной структуры вирионной РНК: 35 S-субъединицы РНК RSV в экстракте клеток Кребс-2 стимулируют включение аминокислот в два раза быстрее, чем в тех же условиях нативная 70 S РНК RSV. Несмотря на незначительную матричную активность, 35 S-субъединицы РНК RSV направляют синтез большого полипептида с молекулярной массой 75 000—80 000, специфически реагировавшего с антисывороткой, к gs-антигену. Этот белок также близок по размеру к полипептиду, который синтезировался в клетках, инфицированных RSV.

В бесклеточной системе из ретикулоцитов РНК AMV транслируется с образованием полипептида-предшественника с молекулярной массой 76 000—80 000 (Salden, Bloemendal, 1976). Кроме этого, при трансляции РНК AMV синтезируется несколько предшественников с меньшей молекулярной массой и четыре основных структурных белка вируса. Все эти вирусспецифические продукты идентифицированы после иммунопреципитации антисывороткой против gs-антигенов AMV.

Изучено влияние различных вирионных белков на процесс превращения белка-предшественника (Pr76) RSV во внутренние структурные белки (Von der Helm, 1977). Полипептид Pr76 синтезировался в бесклеточной системе Кребса, после чего в систему

добавляли по отдельности структурные белки и анализировали продукты синтеза. Установлено, что p19 и p27 не влияли на синтез предшественника, а p12 ингибировал процесс. Белок p15 вызывал разрушение Pr76 до более низкомолекулярных полипептидов. Конечными продуктами такого расщепления in vitro были p32, p27 и p12. При анализе триптических пептидов p32, p27 и p12 было выявлено, что последние два белка являлись внутренними структурными полипептидами RSV. Белок p32 по пептидному составу был практически идентичен p19, но содержал дополнительно еще два пептида. Показано, что разрезание предшественника Pr76 осуществлялось и в том случае, когда в систему вместо p15 вводили разрушенный RSV. Отмечена специфичность описанного феномена, о чем свидетельствовало его отсутствие, если в систему вместо RSV вносили вирус лейкоза Раушера. Протеолитическая активность, ассоциированная со структурным белком вирионов p15, не отделялась от белка при гель-фильтрации и ионообменной хроматографии.

РНК вируса эритробластоза птиц (REV) в бесклеточной белок-синтезирующей системе транслирует синтез трех белков-предшественников: Pr75, Pr44 и Pr37 (Cherr e. a., 1980). Установлено, что Pr75 синтезируется с 28 S РНК, составляющей полный размер генома — 5,5 кб. Pr 75 осаждается анти-gag-сывороткой, то есть этот белок является Pr75gag. Вероятно, Pr75gag синтезируется с 5′-конца гена env между 5,5 и 3 кб. Pr44 синтезируется с 20—24 S РНК (размер 3 кб), которая локализована на 3′-половине молекулы. Этот белок не осаждается сыворотками против gag-, env- и pol-продуктов. По данным триптического анализа, Pr75gag и Pr44 отличаются друг от друга. Pr37 синтезируется с 20 S РНК, очевидно, этот белок env — родствен.

Продукт трансляции РНК вируса лейкоза мышей Раушера (R—MuLV) представляет собой полипептиды с молекулярной массой 120 000 и 180 000, а вируса лейкоза Молони — полипептиды с массой 60 000, 70 000 и 180 000. Не выявлено принципиальных различий в передаче РНК онкорнавирусов в бесклеточных системах биосинтеза белка из клеток L и HeLa. Белок с молекулярной массой 60 000 синтезируется за 30 мин, а с массой 180 000 — за 90 мин. Полипептиды, синтезируемые в бесклеточных системах, реагируют с антисывороткой к разрушенному детергентом вирусу. При сравнении синтезированных полипептидов (с помощью метода фингерпринта триптических гидролизатов) оказалось, что белки с молекулярной массой 60 000 и 70 000 чрезвычайно похожи. Эти пептиды обнаруживаются и среди белков, полученных после переваривания цельного вируса. Среди пептидов с массой 180 000 имеются все белки, входящие в состав частиц с массой 60 000, 70 000 и в цельный вирион, кроме того, определяется незначительное количество пептидов, отсутствующих в двух указанных белках и вирусной частице. Добавление S-аденозилметионина не влияет на уровень включения метки в кислото-

нерастворимую фракцию, что связано с наличием специфического фрагмента на 5′-конце, содержащего 7-метилгуанозин, который экранирует 5′-концевой трифосфат в молекуле 35 S РНК (Kerr e. a., 1976). Метилгуанозин связан в 5′-положении с предпоследним нуклеозидом, метилированным по 2′-0-рибозе. Такая же «закрывающая» структура (например, у РНК М—MuLV $m^7G^{5'}ppp^{5'}$ GmpCp) найдена и у 5′-конца различных мРНК эукариот. Присоединение 7-метилгуанозина осуществляется посттранскрипционно и вместе с 3′-концевым полиаденированием является важным элементом процессинга. Вирусные мРНК, лишенные 7-метилгуанозина на 5′-конце и сегментов поли-А на 3′-конце молекулы, характеризуются низкой матричной активностью (или ее отсутствием) в синтезе белка.

Через час после микроинъекции вирионной РНК R-MuLV в ооциты доминирующими белками были три предшественника gs-антигенов с молекулярными массами 77 000, 75 000 и 65 000. Максимальный уровень трансляции вирионной РНК наблюдался через 10 ч после микроинъекции, причем основным синтезирующимся белком являлся Pr65 (Asselbergs e. a., 1980). В продуктах, направляемых РНК R-MuLV в ооциты, обнаружена также гетерогенная группа белков с молекулярными массами от 90 до 95 000, являющихся посттрансляционными продуктами белков 75 000 и 77 000 дальтон. В ооцитах не удалось выявить синтеза env-специфических белков вне зависимости от того, куда инъецировали 70 S или 35 S вирионные РНК — в ядро или в цитоплазму.

Parks и Scolnick (1977) исследовали трансляцию в бесклеточной белоксинтезирующей системе (полученной из клеток NIH 3T3) РНК вируса саркомы мышей Харви, в исходном препарате которого имелось два типа частиц: саркомный Ha-MSV и лейкозный MuLV. Если в систему вносили 60—70 S РНК, то главным образом синтезировался белок с молекулярной массой 65 000, являющийся предшественником белков gs-комплекса. Кроме того, был обнаружен синтез других белков, в основном с молекулярными массами 140 000, 82 000 и 70 000 и в незначительных количествах с массами 57 000, 38 000 и 25 000. Если же в систему вносили РНК, обогащенную по Ha-MSV-последовательностям, то синтез указанных белков снижался, но выявлялся доминирующий пик с молекулярной массой 21 000. Считают, что этот белок был маркером, специфичным для Ha-MSV. Возможно, протеин с массой 21 000 имел «крысиную» природу, поскольку Ha-MSV представлял собой рекомбинант последовательностей MuLV и двух эндогенных вирусов крыс.

Итак, несмотря на противоречивость результатов, полученных при исследовании матричной активности вирионных РНК, можно прийти к заключению, что 35 S-субъединицы РНК онкорнавирусов транслируются в бесклеточных системах биосинтеза белка, то есть в этом отношении они напоминают плюс-геномные РНК

инфекционных вирусов, в то время как нативные вирионные 70 S РНК, скорее всего, не транслируются. Трансляция 35 S-субъединиц РНК происходит в основном с одного участка инициации с образованием полипептида-предшественника одного или нескольких белков, основным компонентом которых является gs-антиген. Следовательно, главным «открытым» цистроном для трансляции геномной 35 S РНК является ген gag, локализованный около 5′-конца молекулы.

Биосинтез и процессинг структурных белков онкорнавирусов in vivo. Основная масса вирусспецифических полипептидов синтезируется на мембраносвязанных полирибосомах, а часть — во фракции свободных полирибосом. Методом иммунопреципитации пептидов удалось определить размеры этих полирибосом — 350 S. Эта величина свидетельствует о том, что вирусные мРНК транслируются на полирибосомах, состоящих из 12 монорибосом. На полирибосомах такого размера могут транслироваться мРНК с молекулярной массой около 3×10^6, что соответствует размерам субъединиц вирионной РНК.

Структурные белки онкорнавирусов синтезируются в виде предшественников с большой молекулярной массой. Затем они претерпевают протеолитическое расщепление до структурных белков вириона, а некоторые из них подвергаются фосфорилированию. У ретровирусов птиц идентифицировано три предшественника: 1) Pr76gag — предшественник основных негликолизированных вирионных белков p27, p19, p15, p12; 2) gPr95env — гликолизированный предшественник вирионных гликопротеидов gp85 и gp37 и 3) Pr180gag—pol — предшественник, дающий протеиды Pr76 и обратную транскриптазу. У ретровирусов *С*-типа мышей обнаружено четыре предшественника: Pr65gag, Pr80gag, gPr90env и Pr200gag+pol, которые вследствие процессинга образуют все структурные белки вириона. У онкорнавируса *В*-типа выявлены следующие предшественники: gPr73env, Pr75gag, Pr110gag и Pr180gag+pol. Показано, что Pr75gag содержит триптические пептиды, характерные для p25, p12, p10, а Pr110gag — все пептиды Pr75gag и добавочные. Pr180 gag+pol, вероятно, является общим предшественником для генов gag и pol и включает все пептиды, специфичные для Pr75gag, Pr110gag и добавочные (Anderson e. a., 1979). Установлено, что gPr73env синтезируется на грубом эндоплазматическом ретикулуме как межмембранный белок, у которого карбоксильный конец в 2000 дальтон остается в цитоплазме (Dickson, Atterwill, 1980). В процессе синтеза к растущей цепи в зоне аспарагиновых остатков присоединяется пять олигосахаридных остатков. Порядок белков предшественника env-гена следующий: NH_2—gp52 — gp36 — COOH. Вскоре после окончания синтеза осуществляется нарезание gPr73env на два внутриклеточных гликопротеида — gp52 и gp36. После этого указанные белки дополнительно гликолизируются и транспортируются в плазматические мембраны, где происходит их агрегация

и ассоциация с интрацитоплазматическими частицами *А*-типа, инициируя тем самым процесс почкования. Авторы считают, что нарезание может быть необходимым этапом для начала ассоциации между гликопротеидами или между гликопротеидами и частицами А-типа, поскольку в клетке гликолизированная форма gPr73env практически не включается в состав вирионов, а часть ее остается связанной с клеточной мембраной. Определен порядок расположения белков в предшественнике гена gagPr75gag: NH_2—p10—P28—pp23—p14—COOH (Jen e. a., 1980). Причем, как отмечают авторы, расположение p28 и pp23 по отношению друг к другу не является абсолютно достоверным.

Расщепление гликолизированных предшественников других ретровирусов также происходит внутри эндоплазматического ретикулума клетки, то есть прежде, чем он достигает плазматической мембраны (Witte e. a., 1977). Этим обстоятельством объясняется отсутствие gPr в зрелых вирионах, в то время как gag-предшественник (gs-антигенов) может включаться в зрелые частицы (Hanter e. a., 1976).

Установлено, что вначале синтезируются полипептиды, являющиеся предшественниками gs-антигенов. Например, в клетках, зараженных AMV, таким предшественником является полипептид с молекулярной массой 76 000 (Pr76), синтез которого начинается через 3 ч после инфекции. Низкий уровень его синтеза поддерживается до 7-го ч, а затем между 7-м и 9-м ч происходит 5-кратное возрастание синтеза и этот уровень сохраняется до 24-го ч. В клетках, обработанных до или во время инфекции актиномицином D или цитозинарабинозидом, синтез предшественника наблюдается и на ранних этапах инфекции (3—7 ч). Количество Pr76, синтезированного в присутствии этих ингибиторов синтеза ДНК, практически не отличается от такового в необработанных клетках. На основании полученных данных можно предполагать, что проникшая в клетку вирусная РНК функционирует в качестве мРНК для Pr76. Расщепление этого предшественника начинается с С-концевых последовательностей, первым отделяется белок с молекулярной массой 14 000, затем из оставшегося полипептида последовательно образуются белки в 8 000, 17 000 и 10 000 (Gallis e. a., 1976). Такая строгая последовательность в созревании вирусных белков свидетельствует о том, что специфические протеиназы начинают расщепление предшественника только после завершения процесса трансляции.

При анализе экспрессии генов онкорнавирусов птиц на уровне белкового продукта показано, что все исследованные клетки (gs^+ и gs^-) синтезируют вирусные p27, p19 и p15 (Halpern e. a., 1975). Соотношение вирусных белков в клетке примерно такое же, как в вирионе, с той лишь разницей, что количество p15 несколько больше. В клетках, способных поддерживать репликацию RSV (gs^-he и gs^+he), кроме указанных белков синтезируется гликопротеид вирусной оболочки — gp 85, а в клетках, ли-

шенных «хелперной» активности, gp 85 не продуцируется. В нормальных куриных chf$^+$-клетках, не продуцирующих вирусных частиц, количество gp 85 колеблется от 0,06 до 0,1% от содержания тотального клеточного белка. При инфекции RVS количество gp 85 резко возрастает. Gupta e. a. (1975) определили концентрацию p27, p19 и p15 в незараженных и продуктивно трансформированных RVS клетках. В нормальных клетках количество каждого из белков не превышает 10 нг/мг тотального клеточного белка, тогда как в зараженных — наблюдается резкое возрастание уровня p27, p19 и p15 до 520, 1400 и 650 нг/мг соответственно.

Продолжая эти исследования, Pawson e. a. (1977) установили, что в бесклеточной белоксинтезирующей системе (использовали либо асцитные, либо клетки L) белок, синтезируемый геномной 30—40 S РНК RSV, имеет молекулярную массу 76 000 и осаждается антисывороткой к разрушенному вирусу и p12, p30, но не антисывороткой к gp 85. Следовательно, Pr76 является предшественником белков gs-комплекса и транслируется при этом только gag-ген. РНК, специфичная для RSV и выделяемая из клеток, зараженных этим вирусом, направляет синтез двух белков. 35—40 S РНК осуществляет синтез Pr76, как и интактная вирионная РНК, в то время как 22—28 S РНК кодирует синтез белка с молекулярной массой 70 000. Белок Pr70 осаждался антисывороткой к разрушенному вирусу и gp85, то есть, по-видимому, Pr70 представляет собой негликолизированный предшественник gp85. Авторы предлагают модель трансляции вирусной РНК, согласно которой оба класса вирусспецифической РНК, выявляемой в полисомах инфицированных клеток (35—40 S и 20—28 S), кодируют синтез двух белковых предшественников: Pr76 с 5′-конца молекулы (gag-ген) и Pr70 с 3′-конца молекулы (env-ген). Показано, что последовательность белков в предшественнике, кодируемом геном gag, следующая: NH_2—p19—p27—p12—p15—COOH (Shealy e. a., 1980).

Представленные данные согласуются с результатами экспериментов Hanafusa (1977). С помощью микроинъекции 35 S или 21 S РНК из клеток, зараженных вирусом лейкоза птиц, вводили в куриные фибробласты, инфицированные RSV (штамм Бриан), который не способен синтезировать собственные гликопротеиды оболочки. В такой системе происходит продукция инфекционного RSV, и именно 21 S РНК экспрессирует эту активность. Аналогичные данные получены и для вирусспецифической мРНК (выявлены 14 S, 22 S, 35 S) из клеток, инфицированных онкорнавирусами мышей (Mahy, 1977; Van Zaane e. a., 1977). Оказалось, что 35 S РНК R-MuLV стимулирует синтез предшественника gs-антигенов (продукты гена gag), а 22 S РНК — синтез двух полипептидов оболочки вируса и их белка-предшественника (продукты гена env). Полученные данные свидетельствуют о том, что полипептиды, родственные продуктам генов gag и env R-MuLV, синтезируются некоординированно.

Во всех исследованных трансформированных MSV клетках людей, собак, кошек, крыс и мышей p60 представляет собой основной вирусный белок. Он не обнаруживается ни в контрольных, ни в зараженных MuLV клетках. Согласно результатам опытов с вытеснением импульсной метки, p60 стабилен как минимум в течение 10 ч. Изучение вируса, продуцируемого в процессе вытеснения метки, показало, что «разрезание» p60 происходит в вирионе. В клетках определяется весьма незначительное количество p30. По данным радиоиммунологического анализа, уровень p30 в нормальных клетках составляет лишь 2% (3 нг на 1 мг клеточного белка) от его содержания в зараженных. Следовательно, p30 gs-активность в трансформированных клетках установлена с помощью p60. Вероятно, в клетках, трансформированных MSV, p60 может служить маркером трансформации.

В клетках, зараженных R-MuLV, идентифицировано несколько быстрометящихся нестабильных высокомолекулярных белков: Pr1a±b (с массой около 200 000) — предшественник p30, p15, p12, p10 и обратной транскриптазы; Pr2a±b (90 000) — предшественник gp69/71, p15 (*E*) и p12 (*E*); Pr 3 (80 000) и Pr 4 (70 000) — промежуточные предшественники p30, p15, p12 и p10; Pr 5 (55 000) и Pr 6 (45 000), содержащие пептидные последовательности p30, p15, p12 (Arcement e. a., 1976, 1977). У Pr 6 отсутствуют пептиды, составляющие p15. По данным анализа триптических гидролизатов и антигенному составу, белки-продукты гена gag содержатся главным образом в двух высокомолекулярных предшественниках — Pr 3 и Pr 4. Основной путь синтеза этих белков лежит через образование и процессинг Pr 3.

Edwards и Fan Hung (1980) исследовали гликолизированные (Pr 65 gag, Pr 75 gag) и негликолизированные (gPr 80 gag) белки гена gag вируса лейкоза мышей Молони. Дополнительные последовательности в gPr 80 локализованы на N-конце белка. Карбоксильная группа в gPr 80 gag связывается с полипептидом в зоне, общей с Pr65gag. Предполагается, что карбоксильная группа присоединяется к белку при трансляции, при транспорте через мембраны эндоплазматического ретикулума. Подобный перенос обусловливается наличием дополнительных гидрофобных аминокислот на N-конце gPr80gag («сигнальный пептид»). Вероятно, отсутствие подобного «сигнального пептида» вызывает негликолизированность Pr65gag, несмотря на то, что в этом белке имеется сходный, потенциально гликолизируемый участок (сайт).

Установлено, что формирование белков вирусов лейкоза мышей — gp 75 и p15 (*E*) — отличается от формирования белков ядра по трем основным признакам. Во-первых, включение p15 (*E*) и gp 70 в вирионы более чувствительно к действию метаболитного аналога 2-дезокси-D-глюкозы, чем включение белков ядра. Во-вторых, скорость появления вновь синтезированных белков оболочки в освобождающихся вирионах меньше, чем при появлении белков ядра. В-третьих, методом иммунопреципитации пока-

зано, что белки gp 70 и p15 образуются из единого белкового предшественника с молекулярной массой 85 000, отличного от предшественника белков ядра (Famulari e. a., 1976).

Несмотря на принципиальное сходство вирусспецифических белков вируса лейкоза Раушера, выявлены небольшие различия между их размерами в разных типах клеток (Van Zaane e. a., 1976). В зараженных клетках обнаружены два предшественника gp69/71 и p15 (*E*) с молекулярной массой 82 000 (env-Pr82). Предшественниками для p30 и p15 явились два белка массой в 75 000 и 65 000 дальтон (gag-Pr75 и gag-Pr65). В присутствии канаванина, аналога аргинина, в клетках вместо указанных определялись два других предшественника — gag-Pr82 и gag-Pr72. Процессинг в присутствии канаванина замедлялся. На основании этих данных предполагают, что gag-Pr82 — первичный продукт gag-гена и очень быстро расщепляется, превращаясь при этом в gag-Pr75.

Barbacid e. a. (1976), определяя размер и состав вирусного полипептида — предшественника онкорнавирусов *C*-типа млекопитающих, пришли к заключению, что продукт трансляции gag-гена является полипептидом Pr65, при расщеплении которого образуется четыре вирионных белка: p30, p15, p12 и p10. Для установления взаимной локализации этих белков в полипептиде-предшественнике и порядка последовательностей, кодирующих эти белки внутри вирусного генома, использовали иммунологический метод. Оказалось, что последовательности в геноме, кодирующие эти белки, располагаются следующим образом: (5′)p15-p12-p30—p10(3′).

Дальнейшее исследование внутриклеточных белков-предшественников R-MuLV показало, что предшественники Pr1a+b с массой около 200 000 осаждаются антисывороткой как против любого из белков gs-комплекса (p30, p15, p12 и p10), так и против вирусной обратной транскриптазы (Jamjoon e. a., 1977). Это означает, что данные полипептиды содержат детерминанты продуктов gag- и pol-генов. Два импульсномеченых полипептида Pr3 (с массой 80 000—85 000) и продукт его разрезания Pr4 (65 000—70 000) осаждаются анти-p30, -p15, -p12 и -p10-сыворотками, но не антиревертазной сывороткой. Следовательно, Pr3 и Pr4 представляют собой белок-предшественник — продукт gag-гена. Три других полипептида: PrRTI (с массой около 145 000), PrRT2 (135 000) и PrRT3 (80 000—85 000), осаждаются только сывороткой против обратной транскриптазы. Антисыворотка к gp69/71 преципитирует гликопротеид — предшественник Pr1a+b (с массой 90 000), но ни один из указанных выше полипептидов.

Количественные определения в опытах с использованием импульсной метки, а также данные, полученные с ингибиторами белкового синтеза и канаванином, указывают на то, что протеолитическое расщепление Pr1a+b является первым путем образования промежуточных предшественников обратной транскрипта-

зы — PrRT-1, -2 и -3. Вместе с тем неясно, играет ли какую-то роль этот путь расщепления в образовании продуктов gag-гена. Основная масса выявляемых предшественников — продуктов gag-гена (Pr3 и Pr4) образуется с помощью механизма, который не включает разрезание преформированного Prla+b. Представленные факты объясняются моделью, согласно которой трансляция начинается с одной точки инициации и приводит к образованию либо продукта gag-гена, либо (гораздо реже) gag-pol-продукта, что является следствием блокировки участка терминации на конце gag-гена.

В последующей работе Jamjoon e. a. (1978) высказали предположение, что белок ревертазы образуется в результате нарезания Pr200gag+pol, в то время как основная масса белков ядра — в результате процессинга более мелких предшественников Pr80gag и Pr65gag. Основная масса рибосом освобождается в конце гена gag после синтеза Pr80gag. Определенное количество рибосом (от 1/8 до 1/15 от общего количества) проходит этот терминирующий участок на конце гена gag и продолжает синтез гена pol, в результате чего образуется Pr200gag+pol.

Установлено, что синтез вирусных белков-предшественников осуществляется по трем путям: в G_1-, S- и G_2-фазах клеточного цикла (Naso, Brown, 1977). Во время этих периодов синтез вирусных белков составляет от 4,5 до 5,5% синтеза тотальных клеточных белков. G_1-путь синтеза белковых предшественников не нуждается в синтезе вирусной РНК, а два других зависят от присутствия вновь синтезируемой вирусной РНК. Neil e. a. (1980) представили данные, свидетельствующие о том, что существует два пути процессинга gag-белков: включение их в состав вириона и гликолизирование с последующим выделением в культуральную среду. Значение и функции последнего пути остаются неясными.

Измерение уровня внеклеточного и внутриклеточного p30 в процессе 30-минутного и 24-часового периодов вытеснения метки (^{35}S-метионина) показало, что основная масса вновь синтезированного p30 в клетках опухолей вилочковой железы кошек, перманентно инфицированных FeLV, включается во внеклеточный вирус (Okasinski, Velicer, 1976). При анализе триптических гидролизатов p60 и p30 выявлено, что 13 и 15 пептидов, обнаруженных в p30, определяются и в p60, то есть p60 является внутриклеточным предшественником p30 FeLV.

При выращивании клеток в присутствии аналога пролина L-азотидил-2-карбоксиловой кислоты кроме Pr60 выявляется и Pr70. При сравнении триптических пептидов Pr70 и Pr60 со структурными белками вириона FeLV обнаружено, что оба эти белка-предшественника содержат p30, p15, p11 и p10 FeLV. В Pr60 отсутствует только пептид p11. Образование структурных пептидов FeLV происходит в следующем порядке: p11-p15-p10-p30 (Okasinski, Velicer, 1977). Представленные данные указывают на

то, что мелкие структурные белки вириона синтезируются как часть белка-предшественника Pr70.

Определен полный аминокислотный состав p30 вирусов *C*-типа мышей, кошек, крыс и обезьян, свидетельствующий о сходстве данных белков по этому критерию. Белок p30 богат остатками аминокислот с полярными боковыми цепями (лизин, аргинин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты или их амиды), беден цистеином, метионином, гистидином и изолейцином. Исследование первых 30 остатков с NH_2-конца p30 показало высокий уровень родства по последовательностям аминокислот. Молекула каждого p30 начинается с идентичной последовательности про-лей-арг. Другой одинаковый для этих белков участок располагается с 11-го по 24-е положение. В этом участке имеется лишь одна особенность: в 17-м положении у вирусов мышей обнаружен серин, а у вирусов кошек — аланин. Белок p30 GaLV отличается от всех исследованных p30 тем, что в его молекуле имеется вставка из 7 остатков перед гомологичным участком, начиная с 11-го остатка. Внутри p30 вирусов мышей *C*-типа участки 4—10 весьма сходны, этот фрагмент в молекуле p30 вирусов различных видов млекопитающих значительно варьирует. Вероятно, участок 4—10, по крайней мере для p30 вирусов мышей, может быть охарактеризован как видоспецифический или филогенетически ассоциированный.

Известны три онкорнавируса мышей *C*-типа, способных трансформировать фибробласты (FT^+): саркомы Харви (Ha-MSV), саркомы Молони (Mo-MSV) и вирус Абельсона. Геномы Ha- и Mo-MSV представляют собой рекомбинанты, содержащие два класса нуклеотидных последовательностей, один из которых соответствует части генома Mo-MSV, а другой состоит из последовательностей клеток хозяина. Parks e. a. (1976) исследовали MuLV специфические последовательности, сравнивая экспрессию вирусных РНК и белок в различных типах клеток, зараженных этими вирусами. Оказалось, что разные FT^+-вирусы экспрессируют в инфицированных клетках различные участки генома MuLV и синтезируют различные полипептиды. FT^+-вирусы, дефектные по репликации, не синтезируют gp70 и обратную транскриптазу. Белки p10, p12 и p15 могут быть экспрессированы независимо от наличия или отсутствия p30 в разных изолятах FT^+-вирусов. Иными словами, экспрессия низкомолекулярных белков связана в бóльшей степени с выражением трансформирующих функций вируса, чем с экспрессией p30, и в меньшей — с экспрессией gp70 и обратной транскриптазы. Установлена четкая корреляция между уровнем экспрессии РНК MuLV и количеством продуцирующихся полипептидов. Экспрессия РНК и белка не изменялась в трансформированных клетках даже при суперинфекции гетерологичным вирусом-помощником *C*-типа. Следовательно, белок в репликации FT^+-вирусов связан с делецией в геноме, а не с транскрипцией или трансляцией интегрированного генома.

Итак, основное отличие онкорнавирусов от ДНК-содержащих онковирусов состоит в том, что инфекция последними может сопровождаться либо репликацией, либо интеграцией, в то время как у первых интеграция является одним из этапов репликации и трансформации в пермиссивной системе. Геном онкорнавирусов интегрируется в виде высокополимерных ДНК-транскриптов, по размерам соответствующих субъединицам вирионной РНК. Продукты транскрипции интегрированных геномов представляют собой вирионную 35—40 S РНК, кодирующую вирусспецифические белки. Все вирусные гены экспрессируются в инфицированных клетках. Вирусные полипептиды синтезируются в зараженных клетках в виде предшественников, созревание которых осуществляется путем расщепления на отдельные протеины.

Вирусассоциированные невирионные и вирионные белки клеточной поверхности

С помощью трансплантационных и серологических тестов (цитотоксические реакции, иммунофлюоресценция, смешанная гемадсорбция и др.) удалось выявить различные системы вирусиндуцированных антигенов, инфицированых и трансформированных онкорнавирусами клеток. Эти антигены, обнаруживаемые главным образом на плазматических мембранах, специфичные в отношении вируса, индуцировавшего их синтез, как правило, не входят в состав вирионов. Вместе с тем на клеточной поверхности определяются также антигены, сходные (или идентичные) с оболочечными и внутренними антигенами вирионов. Кроме того, растворимые антигены, ассоциированные с онкорнавирусами, могут присутствовать в крови в свободной форме или в комплексе с антителами.

TSTA и TSSA ретровирусов. Клеточные трансплантационные антигены подразделяются на две группы: FMRG-антиген, синтезирующийся в клетках, инфицированных и трансформированных вирусами лейкоза мышей Френд, Молони, Раушера, Граффи, и G-антиген, который обнаруживается при лейкозах, индуцированных вирусом Гросса. Детальное исследование типоспецифических оболочечных антигенов вирусов лейкозов мышей позволило разделить их на три группы: 1) Молони, Раушера, Френд, Рич, Баффет; 2) Граффи, Мазуренко, Степиной-Зильбера и 3) Гросса, Каплан. Предлагается обозначать основные типоспецифические антигены трех перечисленных групп вирусов как VEAI, VEAII и VEAIII соответственно. Между вирусами 1-й и 2-й групп существуют различия, а по поверхностным вирусиндуцированным антигенам они относятся к одной группе — FMRG. Онкорнавирусы птиц по оболочечным антигенам делят на пять групп. Подобная же классификация положена в основу группировки вирусов саркомно-лейкозного комплекса кошек. Эти вирусы разделены на три подгруппы: *A, B* и *C*.

Показано, что главный опухолеассоциированный, поверхностный антиген (TSSA) встраивается в мембрану клеток, трансформированных саркомно-лейкозными вирусами птиц и млекопитающих, и отсутствует в продуктивно инфицированных нетрансформированных клетках (Bauer e. a., 1976). Этот антиген с молекулярной массой 100 000 является гликопротеидом и отличен от структурных белков вирусных частиц и от экспрессированных при трансформации эмбриональных антигенов. TSSA, индуцированные определенным вирусом на поверхности различных трансформированных клеток птиц и млекопитающих, иммунологически родственны, то есть являются общими и группоспецифическими для трансформированных и малигнизированных разными штаммами ретровирусов клеток различных классов животных (птиц и млекопитающих). Таким образом, TSTA и TSSA являются маркерами онкогенности и трансформирующей активности вируса. TSTA и/или TSSA онкорнавирусов точно так же, как аналогичные антигены ДНК-содержащих опухолеродных вирусов, способны секретировать в окружающую среду подобно LETS гликопротеиду и их синтез зависит от клеточного цикла.

TSSA относится к антигенам трансплантационного типа и способен вызывать иммунный ответ. Мутанты, дефектные по трансформации, как правило, не индуцируют синтез TSSA. С помощью адсорбционного теста иммунной анти-TSSA сыворотки обнаружено, что на одну трансформированную клетку приходится около $3—4\times10^4$ антигенных детерминант TSSA ретровирусов. TSSA-RSV чувствителен к папаину и трипсину, однако устойчив к обработке химотрипсином (Bauer e. a., 1976).

В составе геномной РНК онкорнавирусов птиц не удалось идентифицировать ген, ответственный за синтез TSTA. Для выяснения природы TSTA онкорнавирусов птиц использовали ts-мутанты трех классов: 1) неспособные трансформировать куриные клетки при 37°C, однако реплицирующиеся при 41°C — *T*-класс мутантов; 2) неспособные реплицироваться при 41°C, но трансформирующие клетки кур при этой температуре — *R*-класс; 3) координированные, то есть дефектные как по трансформирующей способности, так и по репликации при непермиссивной температуре — *C*-класс. В результате было установлено, что для синтеза TSSA необходимы функции и вируса, и клетки.

Была высказана гипотеза, согласно которой синтез TSSA и функция трансформации ретровируса регулируются на посттранскрипционном уровне, или клетка выступает в роли помощника. Предположение аргументировалось тем, что вирусы лейкоза птиц могут реплицироваться в эмбриональных фибробластах кур без индукции трансформации и синтеза TSSA. Вместе с тем, если потомство этого лейкозного вируса ввести новорожденным цыплятам, то эти вирусы трансформируют миелоидные стволовые клетки, приводя к лимфопролиферативным процессам и синтезу TSSA. У кур, инфицированных вирусом лейкоза, возникает имму-

нитет к трансплантации опухолевых клеток, то есть также осуществляется синтез TSSA. Таким образом, бластомогенная и TSSA-индуцирующая потенции вирусов лейкозов птиц проявляются, в то время как в процессе репликации в эмбриональных фибробластах эти функции вирусов репрессированы. Следовательно, для трансформации и синтеза TSSA, индуцированных вирусами лейкозов птиц, необходимы определенные функции клеток, выступающих в роли помощников.

* * *

При трансформации эмбриональных фибробластов кур вирусом Рауса происходит дефосфорилирование двух кислых мембранных белков 55 000 и 57 000 дальтон (Witt, Cordon, 1980). Показано, что гомогенат трансформированных клеток обладает фосфатазной активностью, специфичной по отношению к 55 000 и 57 000 белкам. Поскольку гомогенат нормальных клеток лишен такой фосфатазной активности, авторы предполагают, что продукту гена src RSV свойственна фосфатазная активность или он активирует какую-то клеточную фосфатазу.

Структурные белки ретровирусов на поверхности клеток. К настоящему времени получены прямые доказательства в пользу наличия ts-антигенов онкорнавирусов мышей и птиц как в оболочках вирионов, так и на клеточной мембране, причем корреляция между присутствием ts-антигенов на плазматической мембране и участках почкования вирионов отсутствует. Вирусные почки определяются в равной степени на поверхности клетки, несущей ts-антигены, и в участках, свободных от этих антигенов. Специфические поверхностные антигены клеточной мембраны могут включаться и не включаться при почковании в состав оболочки вириона. Помимо этих антигенов, в оболочку вирусов способны входить и другие клеточные мембранные белки, например, АТФ-аза у вируса миелобластоза птиц или H-2D-антиген, который избирательно включается в вирион вируса Френд (Weiss, 1977).

Моноспецифическая сыворотка к gp71 вируса лейкоза мышей Френд при иммуноэлектроноскопии клеточной поверхности реагировала со всеми мышиными клетками независимо от линии, способности клеток к продукции вируса или уровня трансформации. В клетках, продуцирующих F-MuLV, с помощью моносыворотки к gp71 четко метились как почкующиеся вирионы, так и другие области клеточной поверхности. MTV gp52 также выявлялся на поверхности клеток и на вирионах в клетках C_3H и DBA, продуцирующих MTV (Holder e. a., 1976). Clouyd e. a. (1977) исследовали экспрессию антигенных детерминант gp71 вируса Френд на поверхности мышиных, хомячьих и обезьяньих вируспродуцирующих клеток. Оказалось, что только мышиные клетки, продуцирующие вирус лейкоза Раушера, несли на своей поверхности ts-антигенные детерминанты gp71 вируса Френд. Клетки мышей,

продуцирующие вирусы лейкоза Френд, Раушера, Молони и Гросса, содержали внутривидовые и межвидовые группоспецифические детерминанты.

Белок gp71 обладает по крайней мере тремя классами межвидовых детерминант: a, b и c. Клетки мышей, продуцирующие вирус Френд, и клетки кошки, продуцирующие вирус лейкоза кошек, содержат все три антигенные детерминанты (a, b, c), клетки AKR+C, продуцирующие вирус Гросса,— только одну межвидовую детерминанту (c), а клетки обезьяны, продуцирующие вирус лейкоза гиббонов, — две детерминанты (в и c). В некоторых нормальных (BALB/cF, YLS-V9, C_3H) и трансформированных (C_3H/HEY, C_3H/MT, ДВА-MT, SKD-2) линиях культур на клеточной поверхности наблюдалась экспрессия одновременно двух антигенов — MuLV gp71 и MTV gp52. Иммунофлюоресцентный анализ экспрессии основного онкорнавирусного гликопротеида—gp71—показал, что все исследованные нормальные мышиные клетки, кроме BALB/3T3, содержат на поверхности антигенные детерминанты gp71 (Clouyd e. a., 1977). Причем эти детерминанты представлены главным образом группоспецифическими внутривидовыми группировками. Антигенные детерминанты gp71 экспрессировались на поверхности клеток независимо от штамма клеток (кроме BALB/3T3), трансформированного или нормального фенотипа, возраста клеток и тканевой принадлежности. Отсутствие соответствующих антигенов на поверхности клеток BALB/3T3 объясняется либо быстрым разрушением этих антигенов, либо репрессией функции соответствующего гена.

В опытах на модели вируса лейкоза Раушера обнаружено, что сразу же после формирования из своих предшественников gp69/71 появляется на наружной поверхности клеток, а p30, p15 и p12 покидают клетку как компоненты почкующегося вириона (Van Zaan e. a., 1976). Поэтому эти белки выявляются внутри клеток в очень небольших количествах: p15(E) обнаружен как внутри клеток, так и на их наружной поверхности.

Исследован механизм превращения предшественника гликопротеида MSV-MuLV в инфицированных клетках. Антисыворотка к вирусному гликопротеиду осаждает из клеточного экстракта два полипептида с молекулярными массами 80 000 и 69 000—71 000 (Witte e. a., 1977). Компонент gp80 обнаруживается в клетке ассоциированным с грубым эндоплазматическим ретикулумом и пластинчатым комплексом, оттуда он через клеточную цитоплазматическую сеть транспортируется в клеточную мембрану. Переход предшественника в оболочку клеток сопровождается процессингом его на конечные продукты — gp69/71 и p14, образующие в клеточной мембране гетеродимер p14 — gp69/71, ковалентно связанный через дисульфидную связь (или связи). Считают, что именно этот гетеродимер является тем белковым продуктом, который включается в почкующийся вирион.

Анализ экспрессии онкорнавирусных белков на поверхности

лейкозных клеток мышей линии AKR показал, что антисыворотка к gp70 осаждает гликопротеид с молекулярной массой 68 000—75 000 (Ledbetter e. a., 1977). Антисыворотки к внутренним белкам осаждают гликопротеиды с молекулярными массами 85 000 и 95 000, причем антисыворотка к p10 осаждает только gp95, но не gp85, а антисыворотка к p30 и p12 — оба гликопротеида. Полагают, что gp85 не содержит детерминант белка p10, а gp95 является предшественником gp85. Антисыворотка к p15 не осаждает поверхностный гликопротеид — предшественник внутренних белков. На поверхности лейкозных клеток присутствуют как gp70, так и gp85 и gp95, а оболочки нормальных тимоцитов мышей линии AKR включают только gp70. С помощью конкурентного радиоиммунологического теста и картирования пептидов, получаемых в результате гидролиза трипсином, проведен сравнительный анализ gp70, выявляемых на поверхности клеток мышей различных линий (Kennel, 1977). По данным пептидного анализа, gp70 из NZB и NZW в бóльшей степени похож на лабораторный штамм MuLV, чем gp70 AKR, но в то же время каждый из этих вирусов характеризуется уникальным пептидным составом для gp70.

Установлено, что объем клеточной поверхности, занятой ts-антигенами, у разных клеток значительно варьирует. Обнаружена прямая корреляция между количеством ts-антигенов, белков гистосовместимости (H-2) на плазматической мембране и фазами клеточного цикла: в середине S-фазы оно обычно снижается до нуля и, как правило, достигает максимума в G_1-фазе.

На поверхности клеток, продуцирующих онкорнавирусы, экспрессируются внутренние белки p15 и p30. Предполагают, что p30 участвует в формировании чувствительности этих клеток к N-, B- и NB-тропным вирусам (Hopkins e. a., 1977). Существенно, что цитолиз вируспродуцирующих клеток осуществляется за счет антител к межвидовым детерминантам p30, находящегося в клеточной мембране (Collins e. a., 1977). В цитолизе клеток Eveline не участвуют антитела ни к gp71, ни к p15(E); хотя эти белки находятся в оболочке клеток, антисыворотка содержит антитела к ним.

Кроме описанных вирусассоциированных белков клеточной поверхности на плазматических мембранах клеток, инфицированных и трансформированных вирусами лейкоза мышей, выявлены следующие антигены: комплементфиксирующие FMR и G; TL, синтезирующийся при спонтанных и вирусиндуцированных лейкозах и в нормальных тимоцитах; ML и E, продуцирующиеся при спонтанных лейкозах; L, выявляемый при некоторых вирусиндуцированных лейкозах; G_{1x}, обнаруживаемый на поверхности нормальных тимоцитов и лимфоцитов у мышей некоторых линий (A, AKR, 129), а также на мембранах лимфоидных клеток при вирусиндуцированных лейкозах.

На поверхности клеток эмбрионов различных видов птиц экспрессируются антигены онкорнавирусов C-типа: gp85; gp37,

p27 и p15 (Kurth e. a., 1977; Weiss, 1977). В мембранах не обнаружено двух вирусных белков — p19 и p12. В культурах клеток кур методом йодирования и специфической иммунопреципитации показано присутствие на клеточной поверхности в случае инфицирования клеток RSV и вирусом миелобластоза птиц (AMV) белка с молекулярной массой 120 000 и предшественника гликопротеида оболочки вирусов с молекулярной массой 90 000—92 000 (Buett, Diggelmann, 1980). Данные олигопептидного анализа свидетельствуют о близости белка 120 000 предшественнику белка сердцевины вируса саркомы Рауса. Авторы считают, что экспрессия на клеточной поверхности гликолизированных форм gag-полипротеидов происходит при инфекции онкорнавирусами птиц так же, как это установлено для системы вирусов лейкоза мышей.

Определено число молекул p27 FeLV на поверхности клеток лимфомы кошек — $5{,}6\times10^5$ (O'Brien, Boone, 1977). Количество других антигенов на цитоплазматических клеточных мембранах равно $1{,}6\times10^6$, что составляет около 60% общего содержания вирусспецифических антигенов, экспрессируемых на клеточной поверхности. Помимо этих белков на поверхности клеток, трансформированных онкорнавирусами, появляются эмбриональные антигены, которые могут быть в той или иной степени связанными с вирусиндуцированными белками и при определенных условиях выполнять функцию трансплантационных антигенов. Кроме описанных изменений белков поверхностных мембран, отличительной особенностью клеток, инфицированных или трансформированных онковирусами, являются повышенное содержание в их плазматических мембранах форссмановского антигена, утрата или возникновение органо- или тканеспецифических антигенов того же организма, но иной органной или тканевой специфичности (см. ниже). При этом важно подчеркнуть, что инфекция опухолеродными вирусами всегда сопровождается индукцией синтеза TSTA-антигенов, а в случае ретровирусов *C*-типа сам вирус может функционировать в качестве эффективного трансплантационного антигена в сингенных опухолевых клетках. Это приводит к наведению иммуногенности и потере туморогенности данных клеточных линий (Aoki, Sibal, 1976; Bauer e. a., 1976; Kelloff e. a., 1976).

Ферменты ретровирусов

С вирионами онкорнавирусов ассоциировано более десяти ферментов, которые выявляются по своей активности, однако не тестируются в биохимических или иммунологических методиках, использующихся для исследования полипептидного состава вирусных частиц. Таким образом, в настоящее время нет возможности связать какую-либо ферментативную активность с определенным белком вириона.

Единственное исключение составляет ферментный комплекс, катализирующий синтез ДНК на матрице РНК — РНК- и ДНК-

зависимые ДНК-полимеразы, или, как принято сейчас называть этот комплекс, обратная транскриптаза — ревертаза, составляющая 2,5% всего белка вириона (Patet, Kraoz, 1978). Обратная транскриптаза ассоциирована с сердцевиной вирионов. Данный фермент содержит практически все исследованные онкорнавирусы, бластомогенные потенции которых доказаны. Помимо этих вирусов, обратная транскриптаза обнаружена у некоторых вирусов и вирусных частиц, онкогенность которых пока не установлена. К ним относятся «пенящие» вирусы млекопитающих, «медленные» вирусы овец, частицы R-типа хомяков, частицы из лейкозных тканей и молока человека, вирус змей, вирус ящура и один из вирусов (австралийский антиген), встречающийся при инфекционном гепатите человека.

В настоящее время обратная транскриптаза выделена в препаративных количествах и очищена из следующих онкорнавирусов птиц и млекопитающих: миелобластоза, саркомы Рауса, лейкоза Раушера и Френд, лейкоза кошек, *B*-типа мышей, саркомы и лейкоза обезьян и Мезона-Пфайзера. Уровень очистки ферментного комплекса из разных вирусов находится в пределах 50—1000 раз с выходом 1—10%. Все очищенные препараты из перечисленных онкорнавирусов обладают как РНК-, так и ДНК-зависимой ДНК-полимеразной активностью, а также активностью РНК-азы Н, которая в этом комплексе действует как процессивная экзонуклеаза. Подсчитано, что около 0,4% белка вириона приходится на белок ревертазы и вирус содержит приблизительно 40 молекул ДНК-полимеразы (Krakower e. a., 1977).

Очищенная ревертаза онкорнавирусов птиц выделена в двух формах. Молекулы одной формы состоят из двух полипептидных цепей: α- и β-субъединиц, имеющих молекулярную массу соответственно 65 000—70 000 и 105 000—120 000, молекулы другой — только из α-субъединиц. В одном вирионе RSV может содержаться 2—5, а в вирионе AMV — 5—17 молекул фермента. Описан механизм освобождения активной α-субъединицы из димерной β-формы (3-я форма) ДНК-полимеразы AMV (Paras e. a., 1976). Обе формы обладают ДНК- и РНК-зависимой ДНК-полимеразными (а также Н-РНК-азной) примерно равными активностями. Из штамма B77 RSV изолированы β_2-субъединицы, которые, как было показано, фосфорилированы (Hizi e. a., 1977). Все формы ревертазы (α, αβ и β_2) транскрибируют 70S РНК вируса B77 одинаково эффективно. Синтезируемые продукты имеют равные размеры (в основном — 4—12S, а некоторые транскрипты — 18S). Эти формы фермента обладают активностью РНК-азы Н, относительная удельная активность которой в α-, β-, и αβ-формах — около 1:4:5. Следовательно, можно предположить, что β-полипептидная цепь обратной транскриптазы онкорнавирусов птиц — не просто структура, модифицирующая сродство α-полимеразы к субстрату и матрице-затравке, а ферментативно активная форма. Правда, по данным некоторых авторов, препарат

β)-субъединицы обладает очень слабой полимеразной и РНК-азной активностью, но способность связываться с матрицей у этой субъединицы выражена гораздо сильнее, чем у α-субъединицы (Gradgenett, 1976; Hizi e. a., 1977). Вместе с тем имеются факты, согласно которым по многим параметрам свойства димерных форм ДНК-полимеразы значительно ближе друг к другу, чем к свойствам α-формы ревертазы (Hizi e. a., 1977). В отношении очень важных параметров, таких как сродство фермента к вирусной РНК и размер синтезированного по этой матрице ДНК-транскрипта (с максимальной длиной в 4500 нуклеотидов), α-формы ревертазы значительно активнее двух других форм и, очевидно, поэтому αβ-форма биологически наиболее важна.

Комплекс обратная транскриптаза — РНК-аза H из вируса лейкоза Френд (F-MuLV) состоит из полипептида с молекулярной массой 84 000. После мягкой протеазной обработки ферментативного комплекса F-MuLV образуется несколько дополнительных полипептидов с молекулярными массами 78 000, 68 000 и 60 000. Свойства комплекса после ограниченного протеолиза напоминают свойства α-субъединицы ревертазы AMV, которая образуется при такой же обработке β-субъединицы ревертазы AMV. Оба фермента не транскрибируют вирусной РНК с эндогенной затравкой, не катализируют, по-видимому, синтеза двуспиральной ДНК, так как синтез становится нечувствительным к актиномицину D, а РНК-аза H в таком комплексе ведет себя как непроцессивная экзонуклеаза (Moelling, 1976).

Из одной субъединицы состоят также молекулы ревертазы из вирусов лейкоза Раушера (ферменты с молекулярными массами 70 000, 90 000 и 26 000), лейкоза кошек (70 000), сарком шерстистых обезьян (70 000), вируса Мезона-Пфайзера (120 000) и MTV (98 000). С помощью электрофореза в полиакриламидном геле показано, что молекула ревертазы из MTV состоит из двух основных (с массой 85 000 и 50 000) и двух минорных полипептидов (с массой 18 000 и 14 000). Молекулярная масса активной формы обратной транскриптазы из MTV, определенная методом седиментации в глицерине, равна 108 000, а коэффициент седиментации — 5,6 S (Marcus e. a., 1976). В очищенном препарате ревертазы R—MuLV не обнаружена активность ДНК-азы, но присутствует активность РНК-азы H (Modak, Marcus, 1977). Таким образом, выявлены существенные различия в структуре ДНК-полимераз из вирусов птиц и млекопитающих.

Методом пептидных карт выявлено, что почти все пептиды β-субъединицы ревертазы AMV присутствуют и на пептидных картах α-субъединицы. Аналогичная ситуация наблюдается и в отношении обратной транскриптазы RSV. Кроме того, пептидные карты α- и β-субъединиц ревертазы AMV очень близки к пептидным картам аналогичных субъединиц обратной транскриптазы RSV. Электрофорез в полиакриламидном геле солюбилизированных белков цельного AMV показал, что в состав вирионов входят обе

субъединицы ревертазы, и белки фермента составляют около 2% от общего количества белка вирусных частиц. Предполагают, что α-субъединица молекулы ревертазы образуется из β-субъединицы путем специфического протеолитического расщепления.

Затем было установлено, что обратным транскриптазам из *C*-типа вирусов птиц, млекопитающих и приматов присущи весьма характерные серологические черты. Антисыворотка к ревертазе птичьих онкорнавирусов специфически ингибирует обратнотранскриптазную активность вирусов *C*-типа птиц и не влияет на активность фермента из онкорнавирусов мышей, крыс, хомячков, кошек, вируса Висна и «пенящего» вируса (FV). Показано, что ревертаза RSV не имеет общих антигенных детерминант ни с одним из вирусных белков, сходна с обратной транскриптазой AMV, и ферменты обоих вирусов несут типоспецифические детерминанты (Panet, 1977). Обратные транскриптазы онкорнавирусов млекопитающих иммунологически родственны, но не идентичны. Ревертаза из вирионов *B*-типа мышей не инактивируется антисывороткой к обратной транскриптазе вирусов *C*-типа. Антитела против ревертазы из вируса кошек подавляют полимеразную активность вирусов саркомно-лейкозного комплекса мышей, кошек и вируса лейкоза хомячков и не блокируют обратнотранскриптазную реакцию онкорнавирусов птиц, MTV и вируса *C*-типа обезьян. Следовательно, ревертазы онкорнавирусов обладают видовой и межвидовой антигенностью.

В реакции нейтрализации были сопоставлены обратные транскриптазы вируса *C*-типа, выделенного из фибросаркомы шерстистых обезьян (SSV), вируса *C*-типа, изолированного из лимфосаркомы гиббона (GLV), вируса *C*-типа RD 114 и вирусов *C*-типа лисиц и птиц, а также вируса рака молочных желез обезьян (M-PMV). Перекрестная нейтрализация была получена только между обратными транскриптазами SSV и GLV, хотя обезьяны, от которых выделены вирусы, происходят из разных частей света. Антисыворотки к обратной транскриптазе M-PMV не реагировали с другими белками M-PMV и не влияли на ферментативную активность вирусов миелобластоза птиц, лейкоза, вирусов Раушера и Френд мышей, рака молочных желез мышей, лейкозов кошек, SSV и GLV. Во всех остальных случаях нейтрализация имела место только в гомологичной системе (Harewood, Ahmed, 1977). В конкурентных тестах было показано, что вирусы лейкоза мышей (Гросса, Молони, BALB/2) лишь частично подавляли иммунопреципитацию ^{125}I—ревертазы R-MuLV гомологичной антисывороткой, причем уровень блокирования не превышал 50% (Krakower e. a., 1977). В том случае, когда антисыворотку к ДНК-полимеразе R-MuLV использовали не против очищенного фермента, а против цельных вирионов, выявить отличия в ревертазах онкорнавирусов мышей не удавалось. Антисыворотка к обратной транскриптазе вирусов С-типа приматов RD114 и FeLV способна к конкуренции. Это свидетельствует о том, что реверта-

за R-MulV содержит три типа антигенных детерминант: типовые, видовые и межвидовые.

Идентифицирована обратная транскриптаза из частиц, обнаруженных в злокачественных опухолях молочных желез человека (Ohno, Spiegelman, 1977). Этот фермент иммунологически перекрестно реагирует с ДНК-полимеразой M-PMV. Подобного типа реагирование не выявлено с другими ревертазами онкорнавирусов птиц, мышей, кошек, обезьян, а также с ДНК-полимеразами, выделенными из клеток человека с мезенхимальными неоплазиями и из нормальных клеток (ДНК-полимераза α, β, γ).

Таким образом, антисыворотку к очищенному ферменту можно использовать для идентификации видовой принадлежности вирусов. Антисыворотка к полимеразе способна инактивировать фермент, но не матрицы в присутствии любой из трех экзогенных матриц: РНК, ДНК и ДНК-РНК-гибрида. Это свидетельствует о том, что обе ДНК-полимеразные активности (РНК- и ДНК-зависимые) связаны с одним белком. Переосаждением NH_4SO_2, хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе и гель-фильтрацией на сефадексе G-200 показано, что антиполимеразная активность связана с фракцией сывороточных IgG (Harewood, Ahmed, 1977).

Антитела к обратной транскриптазе SSV и GLV нейтрализуют активность фермента, выделенного из вирусоподобных частиц, полученных из крови больных лейкозом. Эти данные указывают на вероятность существования общего комплекса саркомно-лейкозных вирусов для всего отряда приматов.

Антисыворотка к обратной транскриптазе SSV и GLV не влияет на активность ревертазы эндогенного вируса *C*-типа обезьян M7, в то время как антитела против фермента эндогенного вируса кошек RD114 ингибируют полимеразную активность вируса M7. Таким образом, можно предположить о вероятном биологическом родстве между эндогенными вирусами млекопитающих, которые способны играть определенную роль в переносе генетической информации.

Используя чувствительный радиоиммунный тест, Mizutani и Temin (1976) показали, что ревертазы вирусов саркомно-лейкозного комплекса птиц и группы ретикулоэндотелиоза, которые, по данным молекулярной гибридизации, неродственны, имеют некоторое антигенное сходство. Перекрестные иммунологические реакции протекают и с клеточными ДНК-полимеразами. На этом основании авторы предполагают, что ревертазы онкорнавирусов обеих групп имеют клеточное происхождение.

Подробно охарактеризована ДНК-полимераза, ассоциированная с интерплазматическими частицами *A*-типа мышей (Kohno, Tanaka, 1977). Уровень эндогенной и экзогенной активности пропорционален концентрации вирусного белка. Оптимум действия фермента — при pH 7,3, концентрации NaCl — 90 ммоль, ДТТ — 3—4 ммоль, Mg^{2+} — 2—3 ммоль. В эндогенной реакции Mn^{2+} в два раза менее эффективен, чем Mg^{2+}, но в экзогенной

реакции, катализируемой поли (рЦ): олиго (дГ), Mn^{2+} вообще неактивен.

Вирионная РНК-аза Н представляет собой экзонуклеазу, осуществляющую деградацию РНК в РНК-ДНК-гибриде как от 5′-конца к 3′-концу, так и в обратном направлении (Leis e. a., 1976). Одноцепочечную РНК, одно- и двухцепочечную ДНК, а также ДНК в составе РНК-ДНК-гибрида РНК-аза Н не разрушает, то есть она гидролизует рибонуклеотидную цепь во всех гибридных молекулах, за исключением (^{3}Н-поли-У): (поли-дА). Продуктом реакции являются олигонуклеотиды длиной в 2—8 нуклеотидов. Эти данные позволяют предполагать, что РНК-аза Н играет существенную роль в процессе освобождения ДНК из РНК-ДНК-гибридов в полимеразной реакции. Затем одноцепочечная ДНК может использоваться для синтеза двухцепочечной ДНК. Согласно другому предположению, образующаяся молекула, состоящая из РНК-ДНК-гибрида и освобожденных коротких фрагментов одноцепочечной ДНК, инкорпорируется в хромосому клетки, где РНК-аза Н ядра (эндонуклеаза) разрушает внутренние последовательности РНК в РНК-ДНК-гибриде с последующей репарацией ДНК и образованием дуплекса ДНК. Так как ДНК-продукт на матрице 70 S РНК составляет 4—12 S, то описываемая модель исключает необходимость интеграции многих мелких фрагментов вирусных ДНК с ДНК хромосом клетки. Однако, поскольку в настоящее время нет твердых доказательств в пользу того, что вирионные РНК-азные Н-активности не являются контаминацией со стороны клеток хозяина, к предполагаемому участию РНК-азы Н в процессах интеграции вирусного генома с клеточным следует относиться пока весьма осторожно.

Показано, что РНК-аза Н из вирионов онкорнавирусов птиц может гидролизовать поли-У, поли-А и поли-А: поли-У. В отличие от РНК-азы Н из E. coli, представляющей собой эндонуклеазу, продуцирующую олигонуклеотиды с 5′-фосфатным и 3′-гидроксильным концами, продуктом деградации вирусного фермента являются главным образом динуклеотиды, а тетрануклеотиды — основным продуктом действия клеточной РНК-азы Н (Leis e. a., 1976).

У большинства онкорнавирусов РНК-аза Н ассоциирована с обратной транскриптазой. Вместе с тем у некоторых вирусов ассоциации РНК-азы Н с полимеразой обнаружить не удалось. Ревертазе и РНК-азе Н одинаково необходимы ионы металлов, сульфгидрильные реагенты и оптимум pH. Оптимальная концентрация для действия фермента Mg^{2+} равна 10—12 ммоль, Mn^{2+}— 0,3 ммоль. Активность РНК-азы прямо зависит от присутствия полидезоксинуклеотида и не зависит от наличия дезоксинуклеотидов. Антитела к полимеразе AMV нейтрализуют активность обоих ферментов. В то же время антитела к РНК-азе Н из E. coli не подавляют активности РНК-азы Н из вирионов AMV.

Очищенный ферментативный комплекс обратной транскрипта-

зы и РНК-азы H из вирионов *B*-типа MTV имеет коэффициент седиментации 5 S, что соответствует молекулярной массе около 100 000 (Dion e. a., 1977). РНК-аза H MTV также специфически гидролизует только нить РНК в составе РНК-ДНК-гибрида и по всем вышеописанным свойствам не отличается от РНК-азы H вирусов *C*-типа птиц и млекопитающих.

Из вируса миелобластоза птиц выделен белок, который восстанавливает уровень транскрипции РНК, в восемь раз повышает синтез ДНК и вытесняет нити ДНК с РНК в гибридном ДНК-РНК-комплексе. Этот белок, вероятно, являющийся специфичным для полимеразы AMV, отделяется от вирионной обратной транскриптазы при хроматографии на фосфоцеллюлозе. Данный термочувствительный недиализуемый фактор может блокировать реакции, катализируемые РНК из фагов Q и f_2.

В вирионах RSV, разрушенных нонидетом P-40, обнаружены полинуклеотидлигазная активность (ДНК-лигаза) и ДНК-нуклеаза. Полинуклеотидлигаза, как известно, соединяет разорванные фосфодиэфирные связи в одной из нитей двуспиральной ДНК. Продуктом эндонуклеазной активности являются 5-инозин- и цитозинмонофосфаты (ИМФ и ЦМФ). Активность возрастает при разрушении вириона и снижается при нагревании разрушенного вируса саркомы Рауса. Лигазная активность также обнаруживается в разрушенном вирионе RSV и не требует присутствия экзогенного АТФ.

ДНК-эндонуклеаза, обнаруженная в онкорнавирусах, не является составной частью вирионов и может быть удалена при дифференцированном скоростном центрифугировании. Наличие этого фермента в онкорнавирусах обусловлено, вероятно, контаминацией микоплазмой.

В высокоочищенных препаратах AMV, RSV, RAVI и ALV, предварительно разрушенных неионными детергентами, присутствует специфическая РНК-метилаза (N^2-гуанин-РНК-метилтрансфераза), роль которой заключается в переносе метильной группы с S-аденозилметионина на гуаниловые основания в молекуле тРНК. В результате образуется N^2-метилгуанин. Кроме описанной метилазной активности, в вирионах RSV выявлена еще одна РНК-метилаза — N^1-аденин-РНК-метилтрансфераза. Активность РНК-метилазы онкорнавирусов, очевидно, указывает на то, что аберрантное метилирование является важным звеном в неопластическом процессе. В очищенных вирионах вируса миелобластоза птиц выявлены и тРНК-синтетазы для аргинина, валина, триптофана, лейцина, цистеина и лизина. По активности преобладает лизил-тРНК-синтетаза (что соответствует обнаруженному бóльшему количеству этого вида тРНК). Обработка вирионов неионным детергентом P-40 позволила обнаружить в частицах онкорнавирусов аминоацил-тРНК-синтетазную активность, то есть фермент, связанный с транскрипцией РНК (Trávnicek, Riman, 1973). Представлены данные, свидетельствующие о том, что геном

онкорнавирусов контролирует виды тРНК, включающиеся в состав вириона.

Помимо двух классов ферментов, использующих тРНК как субстрат (РНК-метилазы и аминоацилсинтетазы), в вирионе онкорнавирусов птиц и млекопитающих определен и третий фермент этой группы — тРНК-нуклеотидилтрансфераза (Mizutani, Temin, 1976; Rhomassen e. a., 1976). Субстратом действия фермента служит 4 S РНК, входящая в состав вириона как свободный компонент, но не как связанная с 70 S РНК. Не все вирионные тРНК, подобные 4 S РНК, могут быть субстратом. Показано, что фермент катализирует присоединение АМФ и ЦМФ к 3′-концу тРНК, образуя последовательность рЦ-рЦ-рАон. Такая достройка, как предполагают, необходима для того, чтобы тРНК могли играть роль затравки для синтеза ДНК на матрице 70 S РНК.

Вирионы RSV и вируса лейкоза Раушера содержат нуклеотиды и нуклеотидкиназную активность, в частности, нуклеозид-моно-, нуклеозидди- и нуклеозидтрифосфатфосфотрансферазы. Для проявления нуклеотидкиназной активности необходимо разрушение вирионов неионными детергентами и присутствие в системе двухвалентных катионов. Инкубация разрушенных нонидетом Р-40 вирионов RSV с γ ^{32}P приводит к появлению неорганического ^{32}P, а также переносу ^{32}P к нуклеотидам — акцепторам дГТФ и дЦТФ. Поскольку часть ^{32}P отделяется в форме неорганического фосфата, в вирионе обнаружена и фосфатазная активность, причем АТФ-азная активность, специфичная для других трифосфатов, проявляется только после разрушения вириона. Установлено, что вирионная фосфатаза способна гидролизовать АТФ до АДФ⟶⟶АМФ⟶аденозина, а ЦТФ и УТФ — до цитидина и уридина соответственно. Среди нуклеотидов (около 2000 на одну вирусную частицу) идентифицированы АДФ, ЦТФ, дЦТФ, ГДФ, дАТФ (больше 100 молекул на вирион), ГМФ, УТФ, АМФ, АТФ, ТТФ, УДФ, дТМФ (50—100 молекул на вирион). В вирионах вируса саркомы Рауса выявлены гексокиназа и лактатдегидрогеназа, но отсутствует глюкозо-6-фосфатгидрогеназа (Mizutani e. a., 1971). Сравнивая специфические активности каждого фермента в целом вирионе и очищенных ядрах, все ферменты можно разделить на две группы: 1) ДНК-полимеразы, ДНК-лигаза и гексокиназа, которые обладают повышенной активностью в ядрах; 2) тРНК-нуклеотидилтрансфераза, нуклеозиддифосфатфосфотрансфераза, лактатдегидрогеназа и АТФ-аза, имеющие пониженную специфическую активность в ядрах, то есть эти ферменты не ассоциированы с сердцевиной вириона, а являются частью оболочки.

Очищенные вирионы лейкоза мышей Раушера и миелобластоза птиц обладают протеинкиназной активностью и содержат белки, являющиеся субстратом для действия этого фермента (Tsiapalis, 1977). Фосфорилирование белков значительно увеличивается, если в систему добавлять протамин. Фосфорилируются главным образом основные структурные полипептиды вириона, входящие

в состав нуклеоида. После обработки нейраминидазой и фосфолипазой *С*-вирионы вируса Раушера проявляют гемагглютинирующую активность, ассоциированную с гликопротеином, локализующимся, вероятно, на наружной мембране вириона и имеющим молекулярную массу 93 000.

Итак, в вирионах онкорнавирусов содержится весьма обширный набор белков, обладающих ферментативными активностями. Нельзя исключить, что некоторые ферментативные активности по аналогии с комплексом обратной транскриптазы обусловливаются одним и тем же белком. Предполагают, что не все вирионные ферменты кодируются вирусным геномом, а являются клеточными, включающимися в состав вириона при ассамблировании частиц в цитоплазме, либо адсорбируются на поверхности вирионов. Вопрос о происхождении таких ферментов имеет принципиальное значение, и, вероятно, наиболее реальный путь его разрешения — проведение исследований на ts-мутантах вирусов, имеющих мутационные повреждения определенного вирионного фермента. Другим, не менее важным аспектом, который также может быть уточнен на моделях ts-мутантов онкорнавирусов, является определение конкретной биологической функции и участия вирионных ферментов в репродукции вирусов. Считают, что ферменты вирионов онкорнавирусов могут, по-видимому, обеспечивать все этапы репликации вирусного генома, в том числе синтез вирусной ДНК и встраивание этой двуспиральной вирусспецифической ДНК-копии в хромосому клетки. Вирионные ферменты способны, очевидно, участвовать в процессах рекомбинации и репарации.

Продукты онкогенов ретровирусов и онкогенез

Трансляция мРНК дефектных и недефектных по трансформации штаммов RSV позволила исследовать состав и свойства продуктов экспрессии гена src. В результате получено три специфичных для трансформирующих вирусов полипептида с молекулярными массами 60 000, 25 000 и 17 000 дальтон (Beemon, Hunter, 1978). Все три белка синтезированы также при добавлении в систему трансляции изолированных из вирионов РНК с коэффициентом седиментации 23 S, 20—19 S и 18 S соответственно молекулярным размерам продуктов. Кроме того, обнаружен синтез белков 39 000 и 33 000, специфичных для трансформации. Эти белки также содержали общие с 60 000, 25 000 и 17 000 белками полипептидные последовательности и синтезировались на мРНК RSV 21—22. Сделан вывод, согласно которому синтез белка 60 000 инициируется в области 5′-конца гена src, а синтез белков 39 000, 33 000, 25 000 и 17 000 — на внутренних кодонах этого гена. Инициация синтеза всех белков происходит независимо, однако терминация осуществляется в одной и той же области 3′-конца гена src.

Установлено, что белок 60 000 одновременно и фосфорилирован и обладает фосфокиназной активностью (pp60 src). Как оказалось, он присутствует и в нормальных клетках, однако его в них в 40—100 раз меньше, чем в трансформированных клетках (Brugge e. a., 1979). ДНК многих позвоночных содержат высококонсервативную гомологичную src-последовательность, которая также представлена в полисомной РНК неинфицированных клеток и, следовательно, может определять синтез нормального клеточного белка (Oppermann e. a., 1979). Использовав антисыворотку против pp60 src для выделения близкородственного фосфопротеида (обозначенного как pp60 позвоночных) из неинфицированных клеток цыплят, перепелок, крыс и человека, авторы обнаружили, что pp60 позвоночных гомологичен pp60 src, высококонсервативен как по антигенным, так и по химическим свойствам. Кроме того, клеточный белок может обладать протеинкиназной активностью, сходной с аналогичной активностью, ассоциированной с pp60 src. Однако в ходе детального исследования выявлено, что киназа, ассоциированная с геном src RSV, отличается от всех известных протеинкиназ по специфичности нуклеотидов, зависимости от ионов и способности ингибироваться нуклеотиддифосфатами (Richert e. a., 1979). Данный фермент скорее напоминает нуклеотидкиназу или нуклеозидфосфокиназу, которые образуют фосфоферментные промежуточные комплексы.

Получены данные, свидетельствующие о значительном полиморфизме pp60 src у вирусов сарком птиц (Beemon e. a., 1979). Sefton e. a. (1979) тестировали наличие в p60 src протеинкиназы, способной фосфорилировать тяжелую цепь иммуноглобулинов. Наблюдаемая в случае ts-мутанта RSV NY 68 (способного трансформировать клетки при 36°*C*, но не при 41°*C*) корреляция дефицита в активности протеинкиназы с неспособностью к трансформации клеток при повышенной температуре дает основание предполагать, что протеинкиназная активность, ассоциированная с pp60 src, действительно играет ключевую роль в трансформации.

Фосфотрансферазная активность и белок pp60 src ассоциированы с фракцией клеточных мембран, отделяемых методом центрифугирования в градиенте сахарозы (Krueger e. a., 1980). Оказалось, что RSV-индуцированная фосфотрансферазная активность отличается от известных клеточных киназ, которые способны использовать только пуриновые трифосфаты. Авторы подчеркивают, что представленные ими данные о свободном состоянии pp60 src в цитоплазме противоречат ранее полученным. Выявлены две функции, ассоциированные с геном src RSV: стимуляция клеточного роста и трансформация (Tanak, Kaji, 1979). Они экспрессируются дифференцированно в зависимости от типа мутации в гене src.

Поли-А-содержащая 35 S РНК из дикого типа RSV и его ts-мутант по трансформации в бесклеточной системе in vitro индуцировали синтез pp60 src белка. С этим белком ассоциирована

протеинкиназная активность, но для белка, синтезированного РНК ts-мутанта, уровень активности был в 30 раз меньше. Фосфорилирование белка pp60 src не связано с синтезом этого протеина de novo. Отмечена четкая связь между степенью фосфорилирования pp60 src и уровнем активности ассоциированной с этим белком протеинкиназы (Ziemiecki, Friis, 1980).

На концах src- и env-генов выявлены гомологичные участки (Yamamoto e. a., 1980). Вероятно, наличием именно этих участков и можно объяснить образование трансформационно-дефектных вирусов. Установлено, что общий «с» участок длиной в 326 нуклеотидов, присутствующий на 3′-конце молекулы РНК ретровирусов, играет ключевую роль в жизненном цикле вируса. Эти регуляторные последовательности, расположенные внутри «с» участка, включают промоторные участки для инициации транскрипции, сигнал полиаденирования и последовательности, комплементарные 3′-концу как src-, так и env-участков, которые связаны с генерацией трансформационно-дефектных делеций (Yamamoto e. a., 1980). Кроме того, во всех без исключения трансформирующих штаммах RSV и лишь в некоторых нетрансформирующих вариантах обнаружен небольшой фрагмент в зоне 5′-конца, вероятно, играющий определенную роль в экспрессии трансформации (Tsichlis, Coffin, 1980). Оказалось также, что участок генома RSV, картируемый между генами env и src, также связан с геном src и является либо структурной частью, либо контролирующим элементом для экспрессии этого гена.

Последовательности генов src ретровирусов сарком птиц различных штаммов включали от 9 до 19 олигонуклеотидов, локализовались в области приблизительно 600—2800 нуклеотидов от 3′-концевых поли-*A* индивидуальных РНК этих вирусов и отсутствовали соответственно в вирусных РНК штаммов, дефектных по трансформирующей способности (Wang Lu-Hai e. a., 1980). Показано, что 12 олигонуклеотидов генов src в районе 3′-конца высококонсервативны среди разных штаммов вирусов сарком птиц. Некоторые штаммы исследованных ретровирусов птиц содержат от одного до трех специфических олигонуклеотидов в гене src. 5′-конец гена src является местом делеций. Представлены также предварительные данные, согласно которым специфические последовательности генов src ретровирусов птиц происходят из клеточной генетической информации. Обнаружена высокая гомология генов src различных штаммов ретровирусов сарком птиц. Авторы приходят к заключению, что гены src разных штаммов вирусов сарком птиц и клеточные последовательности src имеют общее происхождение, хотя наблюдается отчетливая дивергенция вирусных генов src и соответствующих клеточных последовательностей. Следовательно, олигонуклеотидные фингерпринты могут быть успешно использованы для классификации близко родственных вирусов сарком и соответствующих последовательностей клеточного генома.

Идентифицирован фосфорилированный белок pp78 gag-x, являющийся продуктом генов gag и src вирионной РНК вируса саркомы кошек FeSV (Donner e. a., 1980).

Вирус саркомы мышей Харви (H-MSV), как известно, содержит два вида генетической информации — последовательности, родственные хелперному вирусу лейкоза мышей, и последовательности, происходящие из генома клеток крыс. Внутри этих последовательностей располагается ген src, кодирующий белок pp21, функционирование которого непосредственно связано с поддержанием трансформированного фенотипа клетки (Langbeheim e. a., 1980). Оказалось, что нормальные клетки крыс, мышей, летучих мышей, норок, хомяков, кроликов, индеек, кошек, собак, лошадей, обезьян и человека включают белок p21, осаждаемый сывороткой, содержащей антитела к белку pp21 H-MSV. В отличие от вирусиндуцированного белка, который фосфорилирован, этот белок нормальных клеток разного видового происхождения не фосфорилирован. По данным фингерпринтного анализа оба белка структурно очень сходны. Представленные данные свидетельствуют о том, что ген, кодирующий белок, связанный с трансформацией, присутствует в нормальных клетках многих видов позвоночных, то есть высококонсервативен. Показано, что онкоген, кодирующий белок pp21, отсутствует в геноме дефектного экзогенного H-MSV (штамм 30 S) (Young e. a., 1980). Src-ген H-MSV, имеющий размеры в 1,1 кб на 5′-конце молекулы РНК, замещает генетический материал в геноме вируса 30 S либо до, либо в процессе образования H-MSV. Canaani e. a. (1979) представили данные, свидетельствующие о том, что ген src вируса саркомы Молони мышей M-MSV также расположен на 5′-конце генома и происходит из генома клеток мышей. В специальной работе установлено, что другой рекомбинантный вирус мышей и крыс — вирус саркомы мышей Кирстен (K-MSV), также кодирует синтез белка pp21, который необходим для поддержания трансформированного состояния фибробластов, индуцированного этим вирусом (Shih e. a., 1979).

Таким образом, в настоящее время концепцию онкогена опухолеродных вирусов можно считать вполне экспериментально обоснованной. Во-первых, достоверно показано, что потеря этой генетической информации (онкогена) сопровождается потерей трансформирующей способности онковируса. Во-вторых, в случае ts-мутантов перенос трансформированных клеток на непермиссивную температуру быстро приводит к восстановлению нормального фенотипа клеток. Открытие онкогенов, очевидно, по-новому сориентирует разработку методов терапии рака. Не исключено, что в будущем, вероятно, появятся химические препараты, блокирующие действие продуктов онкогенов.

Важно подчеркнуть, что в настоящее время исследования механизмов вирусного онкогенеза перешли на качественно новый этап, поскольку анализу подвергаются не только тотальные пре-

параты вирусспецифических РНК, но и продукты отдельных вирусных генов: ^{3}H-ДНКenv, ^{3}H-ДНКgag, ^{3}H-ДНКsrc и ^{3}H-ДНКpol. Естественно, такие возможности значительно расширили наши знания относительно функционирования вирусного генома и роли отдельных вирусных генов в проявлении той или иной вирусной функции. Понятно, что экспрессия интегрированного вирусного генома (его отдельных генов) является одним из основных факторов, контролирующих проявление вирусных функций в трансформированной клетке. Вместе с тем, хотя и выделен онкоген — ген src ретровирусов — и определены продукты этого гена, однако до сих пор неясен механизм трансформирующего действия его продуктов, так же как и продуктов онкогенов ДНК-содержащих опухолеродных вирусов.

У ДНК-содержащих опухолеродных вирусов онкоген тесно связан с репродуктивной способностью вируса, в то время как у ретровирусов ген src для репродукции не обязателен. Src-специфические последовательности присутствуют во всех вирусах сарком птиц и мышей и в нормальных клетках соответствующих естественных хозяев (птиц и мышей). Отличие вирусов лейкозов от вирусов сарком состоит в отсутствии у первых трансформирующего фибробласты гена src, этот фрагмент отсутствует также в геноме вирусов сарком, дефектных по трансформации. Гена src ретровирусов птиц нет в ретровирусах и клетках млекопитающих, а также в геноме ДНК-содержащих опухолеродных вирусов (Frankel e. a., 1976, 1977; Wang e. a., 1976; Stehelin e. a., 1976, 1977). Src-специфических последовательностей, как правило, нет и у эндогенных ретровирусов и, по-видимому, они не могут присутствовать во всех нормальных клетках, во всяком случае в той функциональной форме (или в качестве функционирующего гена), в которой они находятся в трансформированной клетке. Ген src ретровирусов в основном, как установлено, интегрируется в уникальные участки клеточного генома в количестве одной или нескольких копий на клетку. Высказываются предположения, что после интеграции онкоген способен функционировать уже в качестве индивидуального гена, причем транскрипция может осуществляться как с клеточных, так и с вирусных src-последовательностей или с их определенных частей. Не исключено, что именно такие условия транскрипции обусловливают синтез белков, ответственных за трансформацию и за поддержание трансформированного фенотипа.

Транскрипция src-последовательностей в нормальных клетках идет на низком уровне (1—3 копий на клетку) и лишь незначительно увеличивается в клетках, трансформированных экзогенными ретровирусами или химическими канцерогенами (3—8 копий).

Итак, все приведенные выше факты относительно гена src, включая и прямые эксперименты (обнаружение в геноме нормальных клеток онкогенов ретровирусов, а также их продуктов), позволяют заключить, что src-специфические последовательности

(или онкогены) ретровирусов птиц и мышей имеют клеточную природу и, вероятно, представляют собой гены, ответственные за клеточный цикл или какие-то важные его физиологические функции, например за организацию клеточной поверхности, или являются генами контроля частоты митозов, что, естественно, может быть взаимосвязано, и т. д. Поскольку в разных тканях организма гены (скорее всего, их более десяти), участвующие в контроле митозов, полностью не совпадают, то есть некоторые из них различны, то и онкогены ретровирусов должны отличаться друг от друга. Действительно, во-первых, трансформирующие гены ретровирусов птиц, вызывающие разные типы злокачественных новообразований (саркомы, лейкозы и рак), оказались совершенно различными, а, во-вторых, в некоторых случаях даже онкогены у вирусов сарком одного и того же вида животного (птиц и грызунов) могут быть отличны (Frankel e. a., 1976, 1977; Sheiness e. a., 1978). Вместе с тем нельзя исключить, что такие различные гены могут быть функционально однородными, то есть синтезировать белки с близкими функциями. Следовательно, весьма вероятно, что вирусные онкогены могут происходить от разных клеточных генов, принимающих участие в регуляции деления клеток. Поскольку ретровирусы индуцируют различные неопластические процессы и содержат в своем геноме различающиеся онкогены, то можно предполагать, что эволюция РНК-содержащих онкогенных вирусов должна осуществляться таким механизмом, при котором включения и возможные модификации различных клеточных генов, имеющих отношение к регуляции деления клетки, наделяют каждый вирус способностью вызывать характерные для него опухоли. В этом отношении определенный интерес представляет исследование нуклеотидных последовательностей геномов позвоночных, гомологичных предполагаемым трансформирующим генам некоторых ретровирусов птиц. Было показано, что выявленные гомологи высококонсервативны у цыплят, уток и перепелов и необходимы как для нормального клеточного роста и развития, так и для вирусного онкогенеза (Sheiness e. a., 1980). Указанные эксперименты были проведены на проонкогене — предполагаемом гомологе трансформирующего гена вируса миелобластоза птиц (МС 29). Для выявления свойств проонкогена авторы провели рестрикционный анализ ДНК, полученной от индивидуальных цыплят. Оказалось, что у 18 цыплят проонкоген локализовался только в одном постоянном участке клеточного генома и не был сцеплен с про-src-клеточным гомологом трансформирующего гена src вирусов сарком птиц. Вместе с тем в расположении соседних генов эндогенного ретровируса обнаружена высокая вариабельность. Из цитоплазмы фибробластов кур изолирована поли-А-содержащая РНК размером в 2,8 тыс пар оснований, являющаяся транскриптом проонкогена МС 29. Эмбриональные клетки уток и перепелов также содержали РНК таких же размеров, комплементарную гомологу проонкогена. Таким

образом, проонкоген, как и про-src-ген, является обычным нормальным локусом генома позвоночных, экспрессия которого необходима для нормального развития и роста.

Sheiness e. a. (1980) с целью доказательства существования специфических нуклеотидных последовательностей в вирусе MC 29, способном трансформировать фибробласты и макрофаги в культуре, а также индуцировать миелоцитоматоз, карциномы и саркомы у птиц (эти последовательности обозначены как ^{onc}MCV), исследовали геном нескольких ретровирусов птиц и сравнивали нуклеотидные последовательности в геномах MC 29 и вирусов сарком птиц (ASV). Показано, что не менее 50% последовательностей, входящих в состав гена env вирусов группы ASV, обнаружены также и в геноме MC 29. Кроме того, геном содержит и другие сегменты, имеющие общие нуклеотидные последовательности в геноме других вирусов сарком и лейкозов птиц (часть из них выявляется в составе гена gag). Полученные факты свидетельствуют о том, что ^{onc}MCV является специфическим трансформирующим геном, присутствие которого в вирусном геноме определяет клетки-мишени трансформирующего действия вируса. Учитывая наличие общих фрагментов в геномах ASV и MC 29, авторы предполагают, что эти вирусы имеют общее филогенетическое происхождение и приобретают разный онкогенный потенциал путем захвата различных трансформирующих генов, вероятно, клеточной природы.

Важно отметить, что, несмотря на различия, выявленные в нуклеотидных последовательностях геномов нелейкомогенных эндогенных вирусов, вирусов сарком и лейкозов (лабораторные штаммы), их до сих пор нельзя связать с теми функциями ретровирусов, которые обусловливают лейкомогенную активность. Таким образом, механизм действия вирусов лейкозов пока совершенно неясен.

Установлено, что развитие лейкоза у мышей AKR, нормальные клетки которых содержат эндогенный вирус лейкоза Гросса (не более 3,3—3,8 копий), сопровождается так же как и в случае с вирусами сарком увеличением в 1,5—2 раза доли функционирующих вирусспецифических последовательностей в клеточном геноме (Berns, Jaenusch, 1976).

Ретровирус *C*-типа обнаруживается у мышей AKR с рождения, однако лейкоз и гибель животных наблюдаются, как правило, после шестого месяца жизни. Из тканей лейкемических и предлейкемических мышей этой линии выделены вирусы нового типа, обозначенные MCF, которые способны трансформировать клетки норки (Elder e. a., 1977). Показано, что единственное отличие этого вируса от непатогенного AKR (Гросса) заключается в белке gp70 (продукт гена env), который оказался рекомбинантом между экотропным и ксенотропным вирусами.

На основании первых экспериментальных подходов авторы предполагают, что гипотетический ген leuc, вероятно, может пред-

ставлять собой рекомбинантный ген env, возникающий в результате рекомбинации этого гена у эндогенных вирусов разных классов (экотропных и ксенотропных). Косвенным подтверждением этой гипотезы рекомбинационной природы вирусов лейкозов может служить вирус лейкоза Френд (F-MuLV), представляющий собой рекомбинант экотропного и ксенотропного эндогенных вирусов (Troxler e. a., 1977). Недавно были представлены данные, согласно которым генетическая информация, ответственная за трансформирующую способность F-MuLV, заключена во фрагменте в 4,1 кб, содержащем ген env, концевые повторы и участок «с» (Oliff e. a., 1980).

Установлено также, что онкогенность вирусов саркомы мышей возникла вследствие рекомбинации генома вируса лейкоза мышей с геномом эндогенного вируса *С*-типа крыс, то есть механизм рекомбинации, видимо, является основным в происхождении онкогенных потенций РНК-содержащих вирусов. Таким образом, вероятнее всего, после того как осуществляется интеграция и вследствие этого появляется возможность рекомбинационного эффекта на уровне провируса основная роль в образовании вирусов сарком и лейкозов принадлежит, по-видимому, генам src и env (длина этих генов — 1,5—1,7 кб, 3′-конец — более консервативен, 5′-конец — более изменчив).

Вместе с тем когда интеграция полного вирусного генома не обусловливает трансформацию, но происходит продукция вирусных частиц, в которой основная роль принадлежит гену gag, он приобретает определенное значение и для онкогенеза. Дело в том, что эти вновь образующиеся вирионы могут включать в свой геном модифицированные src-последовательности, которые, попадая в другие клетки, способны функционировать как онкогены, то есть вызывать трансформацию. Нельзя также исключить, что в процессе рекомбинации ретровирус, возможно, приобретает онкоген из клетки.

В отношении ДНК-содержащих опухолеродных вирусов предполагают, что их онкогены в составе вирусного генома прошли длительную эволюцию и стали обязательной составной частью репродуктивной способности вируса.

Таким образом, в настоящее время совокупность имеющихся фактов дает возможность полагать, что бластомогенная активность гена src является доминантной прежде всего при неопластической трансформации и, вероятно, определяется сочетанием следующих факторов: 1) интеграцией в определенные места клеточного генома дополнительных src-специфических последовательностей из экзогенных вирионов ретровирусов; 2) особыми условиями их транскрипции, в частности, по-видимому, в сочетании с транскрипцией клеточных src-последовательностей. По данным анализа всего материала по механизмам вирусного онкогенеза, трансформированный фенотип клетки обусловливается взаимодействием продуктов онкогенов опухолеродных вирусов и определен-

ными функциями клетки, которые проявляются (активируются или дерепрессируются) при экспрессии трансформирующего белка pp60 src.

Наличие вирусных онкогенов и клеточных src-генов, способных активироваться различными мутагенами, является веским аргументом в пользу возможного существования общего звена в механизме неопластического превращения клеток биологическими (вирусы), физическими и химическими канцерогенами. Данное обстоятельство открывает новые подходы в исследовании механизма канцерогенеза, вызываемого не только вирусами. При этом принципиально важно, что сейчас появляется возможность исследовать клеточные гены, нарушение функционирования которых вызывает трансформацию, причем такие гены, включенные в состав генома опухолеродного вируса, могут быть получены в чистом виде и их продукты накоплены и охарактеризованы. Следует подчеркнуть, что этот аспект работы по изучению механизмов вирусного онкогенеза, а именно — выявление клеточных функций, участвующих в трансформации, и анализ действия продуктов онкогенов, представляется наиболее трудоемким и сложным.

Трансформирующие последовательности, или ^{3}H-ДНК-транскрипты, онкогенов пока получены у птиц и грызунов. Успехи, связанные с исследованиями вируса HL 23 V (предполагают, что его источником являются лейкозные клетки человека), позволяют считать, что, вероятно, в ближайшем будущем будет синтезирован ДНК-транскрипт онкогена этого вируса и, таким образом, появится возможность для анализа геномов клеток приматов и человека (Reitz e. a., 1976).

В заключение необходимо, прежде всего, заметить, что на сегодняшний день основным достижением и главным успехом вирусогенетической теории рака является то принципиально новое, что эта теория дала и дает для понимания и разработки не только сущности злокачественного роста, но и других центральных проблем общей биологии, в частности, проблемы эндогенных вирусов и связанных с ними узловых вопросов генетики и дифференцировки. Сейчас, вероятно, представляется реальная возможность выявить звено, снижающее эффект агентов, ингибирующих размножение нормальных клеток. Это может иметь несомненный практический выход. В настоящее время наиболее перспективным подходом для решения указанного кардинального вопроса современной онковирусологии, по-видимому, необходимо считать тщательный анализ экспрессии гена src и ее ассоциации с изменениями, приводящими к трансформированному фенотипу клетки. Особо следует подчеркнуть, что идентификация продукта онкогенов, исследование механизмов возникновения этих генов, анализ их функционирования и действия являются на ближайшие годы глобальными проблемами онкогенеза. При этом перспективен поиск таких экспериментальных систем, в которых, во-пер-

вых, будет осуществляться дифференцированная экспрессия вирусных функций, обусловливающих трансформацию, а, во-вторых, будут отсутствовать последовательности эндогенных вирусов, идентичные экзогенному ретровирусу. Хорошим примером подобных систем может служить уже имеющийся большой набор линий клеток млекопитающих, трансформированных вирусами сарком птиц. Весьма вероятно, что аналогичные системы широко распространены в естественных условиях, в частности, у человека. Относительно же редкое их обнаружение, по-видимому, объясняется значительными трудностями идентификации продуктов отдельных вирусных генов.

Первые шаги в исследовании злокачественных новообразований человека с использованием современных возможностей позволили выявить в клетках сарком, лейкозов и рака молочной железы основные компоненты ретровирусов: высокомолекулярную 60—70 S РНК и ревертазу, а в некоторых случаях — и их вирионы.

Таким образом, полученные факты указывают, с одной стороны, на весьма вероятную природу сарком, лейкозов, лимфом и злокачественных опухолей молочных желез у человека, а с другой — на общие закономерности и механизмы онкогенеза определенных типов неоплазий млекопитающих, которые, возможно, могут детерминироваться близкими или идентичными в функциональном отношении генами ретровирусов.

В настоящее время проводится широкий перекрестный анализ вирусных частиц, изолированных из крови, костного мозга и других тканей больных злокачественными новообразованиями, с известными ретровирусами животных. В частности, показано, что геномы вирусов, полученных от больных лейкозами, имеют большую гомологию (80—90%) с вирусом сарком шерстистых обезьян (SAV) и вирусом лимфосаркомы гиббонов (GaLV). В некоторых случаях были обнаружены вирусы, родственные эндогенному вирусу павианов (Sahagan, Heseltine, 1980). Вместе с тем роль этих изолированных вирусов в этиологии лейкоза и других злокачественных новообразований человека остается неясной.

Глава II

АНТИГЕННАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ В ПРОЦЕССЕ НЕОПЛАСТИЧЕСКОГО ПЕРЕРОЖДЕНИЯ КЛЕТОК

Сложность перестройки функционирования иммунитета всегда имеет место в процессе онкогенеза и является отражением глубоких изменений антигенного спектра ткани-мишени, сопровождающих опухолевую трансформацию, вызванную канцерогенами или опухолеродными вирусами. Эти изменения сводятся к четырем основным типам: 1) появление поверхностных опухолевых специфических трансплантационных антигенов TSTA; 2) возникновение вирусспецифических и вирусиндуцированных антигенов в случае вирусного канцерогенеза; 3) появление эмбриональных белков; 4) утрата и появление органо- или тканеспецифических антигенов, свойственных нормальным клеткам данного организма, но другой органной или тканевой специфичности.

В данной главе представлен главным образом материал по антигенной трансформации клеток, возникающей в процессе химического канцерогенеза, а также рассмотрены эмбриональные, органо- и тканеспецифические и гетерогенные антигены опухолевых клеток.

Антигены трансплантационного типа злокачественных новообразований, индуцированных химическими канцерогенами

Функциональная активность поверхностных антигенов трансплантационного типа (TSTA), индуцированных химическими или физическими канцерогенами в неопластически трансформированных ими клетках, проявляется в создании трансплантационной резистентности к прививке той же опухоли (трансплантационный тест). Изучение иммунитета к опухолям, вызванным химическими канцерогенными веществами у инбредных мышей, а затем пассируемым (не более 2-х пассажей) на сингенных животных, было начато еще в середине 40-х гг. Gross (1943). Работая с саркомой, индуцированной метилхолантреном, у мышей C_3H, Gross отметил, что у 21 из 115 мышей, привитых этой опухолью

внутрикожно, опухоль рассасывалась. Аналогичные эксперименты в строго контролируемых с точки зрения иммуногенетики условиях были проведены Foley (1953). Рассасывание метилхолантреновых опухолей у мышей линии C_3H/He достигалось путем перевязки основания опухолевого трансплантата. Мыши с рассосавшимся новообразованием были высокоиммунны к реинокуляции изологичной опухоли. Так, вторично привитый трансплантат саркомы S-215 рассосался у 30 из 44, а саркомы S-339 — у 11 из 12 мышей. Таким образом, в экспериментах было четко продемонстрировано наличие специфического противоопухолевого иммунитета у подопытных животных.

Это фундаментальное открытие подтвердилось на многих тест-системах и получило дальнейшее развитие в исследованиях Prehn и Main (1957). Было показано, что животные, предварительно иммунизированные опухолью, оказались резистентными к реинокуляции изологичной саркомы, в то время как у мышей, иммунизированных нормальными тканями, опухоль развивалась так же, как и у контрольных. Иммунизация клетками одной опухоли и прививки другой саркомы, также индуцированной у сингенных мышей метилхолантреном, оказались неэффективными. Иными словами, перекрестные реакции между TSTA новообразований, вызванных одним и тем же канцерогеном у одной и той же линии мышей, отсутствовали. Далее Klein e. a. (1960) на значительном экспериментальном материале доказали, что действительно, после предварительной иммунизации изогенных мышей клетками первичноиндуцированной саркомы, вызванной метилхолантреном (с целью приготовления препаратов для иммунизации клетки опухоли обрабатывали ультрафиолетовыми лучами), была возможна выработка иммунитета у животных против только соответствующей линии саркомы, но не какой-либо другой из 12 остальных, индуцированных метилхолантреном.

Этот факт строгой индивидуальной специфичности TSTA-антигенов, индуцированных химическими канцерогенами, в дальнейшем был подтвержден на всех исследованных тест-системах с различными химическими канцерогенами: метилхолантреном, бензпиреном, дибензантраценом и т. д. (Prehn, 1960; Koldovsky, 1961; Old e. a., 1962; Klein, 1966, 1970; Pellis e. a., 1980). При этом использовались разные методические приемы. Например, Fritz e. a. (1976) у мышей линии $C_3f/HeCr$ создавали состояние резистентности путем иммунизации клетками опухоли с последующей ампутацией пораженной конечности. Эксперименты были проведены с двумя саркомами, одна из которых была первоначально индуцирована метилхолантреном, а другая — бензпиреном. В качестве контрольной опухоли был использован рак молочной железы мышей C_3H. Через 10 дней мышам прививали определенное количество клеток этих сарком и рака молочной железы. Иммунизация оказалась эффективной только в отношении тех опухолевых клеток, которые были предварительно приви-

ты данным животным. Иммунные сыворотки, полученные от мышей с удаленной опухолью, в присутствии комплемента оказывали более сильное цитопатогенное действие на клетки этих двух видов сарком, чем нормальная сыворотка сингенных мышей. Абсорбция иммунных сывороток клетками сарком резко снижала их цитопатогенное действие, тогда как абсорбция нормальными тканями не уменьшала эффекта.

Еще более показательные результаты были получены Globerson и Feldman (1964). В их экспериментах четко выявлялось антигенное различие мышиных сарком, индуцированных 3—4-бензпиреном, причем различающиеся по антигенам опухоли были индуцированы в противоположных точках одного и того же животного. Таким образом, эти данные еще раз подтвердили, что опухоли, индуцированные химическими канцерогенами, имеют индивидуальные TSTA-антигены, и иммуногенность этих антигенов, ассоциированных с опухолью, зависит прежде всего от индуцирующих их канцерогенов. Например, метилхолантрен индуцировал более иммуногенные саркомы, чем дибензантрацен (Old e. a., 1962).

Предполагают, что при действии канцерогенов на клетки неопластическая трансформация, вероятно, сопровождается в основном случайными мутациями. В результате этих мутаций на клеточной поверхности появляются индивидуальные антигены в отличие от TSTA (природа последних предопределена опухолеродным вирусом). Вместе с тем в некоторых случаях отмечены перекрестные реакции по TSTA между новообразованиями, индуцированными химическими канцерогенами, а также между TSTA, индуцированными химическими канцерогенами, и опухолеродными вирусами (Ankerst e. a., 1974; Proctor e. a., 1974; Hayami e. a., 1977). Аналогичные перекрестные реакции наблюдались и в опытах in vitro между новообразованиями разного генеза (Porta, Parmiani, 1976). Во многих тест-системах природа обнаруженных перекрестнореагирующих поверхностных антигенов не выяснена (Berczi, Froese, 1980). Большинство исследователей считают, что указанная реактивность обусловливается перекрестнореагирующими эмбриональными антигенами, отличными от TSTA-антигенов. Эти эмбриональные белки, экспрессированные на поверхности трансформированных клеток вирусами и канцерогенами, в ассоциации с TSTA-антигенами или самостоятельно могут иногда функционировать в качестве трансплантационных антигенов и вызывать иммунный ответ организма, приводящий при определенных условиях к элиминации опухолевых клеток (Coggin e. a., 1980; Weppner, Coggin, 1980). Bosslet и Schirrmacher (1980) обнаружили, что клонирующие линии метастазирующего новообразования, вызванного химическим канцерогеном, освобождают связанный с опухолью TSTA-антиген при адаптации к Т-клеточной противоопухолевой иммунологической реакции. Эти изменения фенотипа дают возможность клеткам опухоли избегать

иммунной деструкции и прогрессировать даже в лимфоидных органах, например, в селезенке. Потеря TSTA в описанной системе отличается от феномена антигенной модуляции, имеющего место при лейкозе тимуса. В последнем случае TSTA более стабилен и наследуется во многих последовательных генерациях лейкозных клеток. Предполагается, что выявленные изменения обусловлены скорее генетическим (ген регуляторного типа), чем эпигенетическим механизмом.

Итак, отличительной особенностью TSTA-антигенов, индуцированных различными канцерогенами, является их высокая индивидуальная специфичность. Накопились убедительные факты, свидетельствующие о тесной связи поверхностных TSTA-антигенов с генами, несущими информацию для комплекса антигенов гистосовместимости, то есть об их ассоциации с нормальными аллоантигенами системы H-2 (Porta, Parmiani, 1976; Baldwin, Price, 1977). Такая связь обнаружена на многих тест-системах в опытах in vivo и in vitro (Klein, 1977; Carbone e. a., 1978; Perry, Greene, 1980).

Опухолеассоциированные антигены

Антигенные отличия опухолевых тканей от нормальных, кроме синтеза TSTA- и вирусспецифических антигенов, обусловливаются, с одной стороны, эпигеномными изменениями, то есть дерепрессией (появление новых антигенов) и репрессией («упрощение» антигенной структуры) определенных клеточных генов, а с другой — нарушением механизмов транскрипции и посттранскрипционных модификаций. Эти белки, возникающие, вероятно, вследствие неопластической трансформации, могут появляться на различных стадиях опухолевой прогрессии в результате изменений в функционировании генетического аппарата клетки. Естественно, они могут встречаться в нормальных клетках на разных этапах развития организма. В дифференцированных клетках они или отсутствуют, или находятся в неопределяемых количествах. Эти антигенные сдвиги имеют место в тканях новообразований любого генеза. В последующих подразделах будут приведены материалы, касающиеся главным образом антигенов, которые появляются в процессе вирусного онкогенеза. К сожалению, этот вопрос специально не изучался и в этом направлении пока имеются лишь единичные работы.

Классификация антигенов неопластически трансформированных клеток на опухолеассоциированные, эмбриональные и гетерогенные указывает лишь на тип иммунных сывороток, выявлявших соответствующий антиген. I группа обнаруживается антисыворотками к опухолевой ткани, II — к эмбриональной того же вида животных, III — к тканям животных другого биологического вида.

Berman (1972) в 1965 г. с помощью реакции преципитации в геле был найден антиген Д в саркоме хомяка А-12 (индуцирован-

ной аденовирусом 12-го типа человека), отсутствующий в нормальных тканях. Для исследования тканевых, цитоплазматических, растворимых антигенов И. С. Башкаев и А. И. Агеенко (1970, 1978) использовали реакцию преципитации в геле и иммуноэлектрофорез.

После абсорбции кроличья сыворотка к саркоме *А*-12 не реагировала с антигенами печени, почек, мышц, селезенки, нормальной сыворотки, но давала две четкие линии с водно-солевым экстрактом саркомы, одна из которых сливалась с линией преципитации к антигену легкого. Следовательно, саркома, кроме легочного, содержит еще один тканевый антиген. Последний полностью инактивировался при кипячении в течение часа, при 30-минутном нагревании до 56°*С*, при действии 50%-ного ацетона и 50%-ного спирта, но был устойчив к эфиру и хлороформу. Судя по положению линии преципитации, тканевый антиген имел бóльший коэффициент диффузии, чем легочный тканевый, и, возможно, бóльший молекулярный вес. При реакции преципитации в геле в концентрации антигена 50 мг/мл титр легочного антигена был 1 : 64, саркомного — 1 : 4-1 :8. При иммуноэлектрофорезе вся картина заметно усложнилась. В саркоме выявился спектр, состоящий, по меньшей мере, из трех дуг преципитации: одной — в области быстрых α_1-глобулинов и двух — в области γ-глобулинов. Антиген зоны α_1-глобулинов и один γ-глобулинов были серологически идентичны легочному тканевому антигену; второй антиген, расположенный в зоне γ-глобулинов, — саркомному тканевому. Дуги, находящиеся в зоне β-глобулинов, пока не идентифицированы. Неясным оставалась, однако, специфичность тканевого саркомного антигена. Поэтому были проведены опыты с адсорбцией в геле по Бьёрклунду. Насыщение геля водно-солевым экстрактом легкого в ряде опытов вело к исчезновению линий преципитации как к легкому, так и к саркоме.

Описанные наблюдения свидетельствуют о том, что, по-видимому, выявленная разница между антигенами ткани аденовирусной саркомы хомяка и ткани легкого является не качественной, а количественной и вызвана резким увеличением концентрации одного из нормальных антигенов в опухолевой ткани. Связано ли это с опухолевой трансформацией клетки или с гистологическим упрощением строения ткани при канцерогенезе, пока не ясно. Таким образом, с помощью иммунодиффузионных методов в саркоме хомяка, вызванной аденовирусом 12-го типа, удалось обнаружить нарастание концентрации одного из нормальных тканевых антигенов. Возможно, выявленный феномен обусловлен активацией определенных участков генома клетки в процессе опухолевой трансформации под действием ДНК-содержащего опухолеродного вируса.

В дальнейших исследованиях была изучена саркома SA7(C8) мышей СВА, индуцированная аденовирусом обезьян SA7(C8). После массивной адсорбции экстрактом из нормальных органов

мышей СВА антисыворотка к саркоме была испытана в перекрестных опытах иммунодиффузии с гомологичными антигенами (Башкаев, Агеенко, 1978). В качестве контролей использовали водно-солевые экстракты печени, селезенки, почки, легкого, мышцы из нормальных мышей СВА. Антисыворотка к саркоме SA7(C8) давала одну линию преципитации с антигеном саркомы и не реагировала с антигенами нормальных органов мыши. Следовательно, в опухолях мыши, индуцированных вирусом, также выявляется тканевый антиген, синтезирующийся в нормальных органах.

Существенно важным для понимания механизма антигенной трансформации клетки при канцерогенезе является связь между опухолеассоциированными антигенами. Наличие антигенной общности показано ранее для ряда аденовирусных опухолей хомяка и мыши (Sjögren e. a., 1967; Агеенко с соавт., 1977). Поэтому авторы предприняли сравнительное изучение антигенных изменений сарком, вызванных у хомяков бычьим аденовирусом 3-го типа (*A*3) и аденовирусом 12-го типа человека (*A*12).

В опытах использовали два перевиваемых штамма саркомы *A*-3: а) штамм, полученный в лаборатории вирусологии Центра Онкологии МА НРБ (София); б) штамм, полученный старшим научным сотрудником Н. М. Стрижаченко в Ветеринарной Академии (Москва). Сначала изучали саркому *A*-3 хомяка.

Антисыворотка к опухоли после истощения давала четкие линии преципитации с гомологичным экстрактом и не реагировала с сывороткой крови нормального хомяка. Следовательно, саркома *A*-3 содержит антиген, не выявляемый в нормальных тканях хомяка (Башкаев, Агеенко, 1978).

Такой же антиген был обнаружен в саркоме хомяка, вызванной аденовирусом 12-го типа человека с помощью той же специфической антисыворотки к саркоме *A*-3. Причем линия преципитации к саркоме *A*-12, сливаясь с линией преципитации к саркоме *A*-3, дала картину полной серологической идентичности. Следовательно, саркома хомяка *A*-12 содержит тканевый антиген, отличный от антигенов нормальных тканей и близкий опухолеассоциированному антигену саркомы *A*-3. Важно отметить, что во всех трех исследованных аденовирусных опухолях животных методом иммунодиффузии выявляются антигенные изменения, носящие или количественный (саркома *A*-12 хомяка), или качественный характер (саркомы *A*-3 хомяка и SA7(C8) мыши).

Итак, методом иммунодиффузии в аденовирусных саркомах *A*-3 и *A*-12 обнаруживается серологически сходный вирусиндуцированный тканевый антиген. Общность опухолеассоциированного антигена сарком, вызванных у хомяка аденовирусами крупного рогатого скота (тип *A*3) и человека (*A*12), можно объяснить следующими причинами: 1) биологической близостью этих двух типов аденовирусов, а следовательно, антигенным сходством белков, индуцированных этими вирусами; 2) наличием кроме типо-

специфических общих антигенных детерминант комплекса *Т*-антигена аденовирусов разных типов и присутствием подобных детерминант в сложных опухолеассоциированных антигенных саркомах, индуцированных разными аденовирусами. Поскольку эти объяснения не носят альтернативный характер, а второе является по сути следствием первого, то более логично предположить, что данная общность обусловливается наличием одних антигенных детерминант в белках, индуцированных аденовирусами *А*3 и *А*12, а также то, что синтез этих антигенов, по-видимому, не контролируется непосредственно структурными вирусными генами, а является отражением измененной функции клеточного генома. Эти антигены, вероятно, появляются позднее *Т*-антигенов. Во всяком случае методом иммунодиффузии в момент синтеза *Т*-антигенов они не определяются (Агеенко, 1974).

Ранее И. С. Башкаевым и А. И. Агеенко (1965, 1967, 1978) было показано существование большой группы опухолеассоциированных антигенов, в основном относящихся к классу растворимых антигенов цитоплазмы, общих для новообразований разных видов животных, вызванных опухолеродными вирусами и различными канцерогенами. По мнению авторов, появление при трансформации новых растворимых антигенов в цитоплазме клетки представляет собой завершающее звено сложной многоступенчатой биохимической перестройки, вызванной канцерогенным фактором независимо от его природы. Последние звенья патологической цепи, по-видимому, одинаковы для разных видов этих воздействий, что выражается в иммунологической антигенной общности у опухолей, вызванных разными типами онкогенных агентов.

Возможно, обнаруженные растворимые антигены аденовирусной опухоли, появляющиеся на более поздних стадиях канцерогенеза, отражают определенные этапы опухолевой прогрессии и являются одним из определяющих ее факторов. Поэтому существенно важным представляется изучение функциональной роли растворимых антигенов этого типа в механизме вирусного онкогенеза.

Эмбриональные антигены опухолевых клеток

Раковые эмбриональные антигены, содержащиеся в опухолевой и эмбриональной ткани, к настоящему времени выявлены во многих новообразованиях вирусной и химической природы, а также в различных опухолях человека. Антигенная общность эмбриональных и опухолевых тканей человека впервые была обнаружена Hirszfeld и Halber (1932). Эмбриональные α-глобулины определены в гепатомах, вызванных у мышей химическими канцерогенами (Абелев, 1963, 1970), и в гепатомах человека (Татаринов, 1964). Впоследствии этот антиген был найден в ткани первичного рака печени и тератобластоме человека (Абе-

лев, 1970). В. Я. Рогальский (1965), Gold e. a. (1970) выявили в ткани аденокарциномы толстого кишечника раковый эмбриональный антиген, который затем был выделен в чистом виде и идентифицирован как гликопротеид. В сыворотках больных аденокарциномой толстого кишечника содержались эмбриональные антигены. На ранних стадиях данного заболевания эти белки определялись у 45%, при распространенном процессе — у 88—96% больных. После радикального удаления опухоли содержание раковых эмбриональных антигенов снижалось до нуля (Zamcheck e. a., 1972). Указанные антигены были выявлены в желудочном соке больных раком желудка и идентифицированы как эмбриональные сульфогликопротеиды. Иногда они содержались и в желудочном соке и слизистой нормального желудка. Эмбриональный белок, находящийся в плаценте и сыворотках беременных женщин, определялся при различных раковых новообразованиях. Раковые эмбриональные антигены были обнаружены у больных раком легкого, молочной железы, мочевого пузыря, поджелудочной железы, яичника, предстательной железы и при других локализациях. Эти белки имели электрофоретическую подвижность β-глобулинов и по химическим и серологическим свойствам отличались от α-глобулинов и описанных выше раковых эмбриональных антигенов (Alexander, 1972; Zamcheck e. a., 1972). Появление эмбриональных белков не специфично для бластоматозного процесса, поскольку в 50% они определяются у больных с алкогольным циррозом печени, при заболеваниях почек, панкреатите, колите и у здоровых людей старше 50 лет. Раковый эмбриональный антиген также обнаруживается в нормальной печени и при ее циррозе, хотя в значительно меньшей концентрации (1:5 000—1:10 000), чем при метастазах рака толстого кишечника в печень (Alexander, 1972; Zamcheck e. a., 1972; Gcudero e. a., 1980; Trichopolos e. a., 1980).

В саркомах и карциномах, индуцированных химическими канцерогенами и опухолеродными вирусами, были найдены главным образом эмбриональные антигены трансплантационного типа. Эти белки выявлялись при выработке специфического иммунитета к различным опухолям с помощью предварительной вакцинации гомологичной, а в некоторых случаях и гетерологичной эмбриональной тканью (Ambrose e. a., 1971; Girardi e. a., 1971, 1973). Girardi e. a. (1973) вводили новорожденным сингенным хомякам LVG/LAK или LSH/LAK аденовирус 31-го типа, а в возрасте 4 недель иммунизировали их облученной сингенной эмбриональной тканью. При этом ткань 10-дневного эмбриона снижала число хомяков с опухолями на 40—50%, в то время как ткань 14-дневного эмбриона подобного угнетения онкогенеза не вызывала. Аналогичные результаты были получены и с вирусом SV 40 на этой же системе. Облученная 10-дневная эмбриональная ткань создавала иммунитет у взрослых хомяков к прививкам 1000—5000 опухолевых клеток SV 40. Иммунизация хомяков этой тканью вызы-

вала у них образование цитотоксических антител, выявляемых с помощью диффузионных камер, содержащих клетки опухоли SV 40 и имплантированных внутрибрюшинно. Цитотоксические антитела были обнаружены также у беременных и рожавших хомяков, у девственных животных они не определялись. Введение взрослым хомякам необлученной эмбриональной ткани вызывало у них развитие тератомоподобных новообразований. У таких животных цитотоксические антитела к поверхностному антигену опухолей SV 40 и трансплантационный иммунитет к указанной опухоли отсутствовали (Girardi e. a., 1973). У мышей BALB/c, иммунизированных сингенной эмбриональной тканью, облученной 5000 Р, рост клеток селезенки, инфицированных вирусом лейкоза Раушера, в диффузионных камерах тормозился на 49—60% (Girardi e. a., 1971). В экспериментах Ambrose e. a. (1971) хомяков линии LVG, зараженных неонатально вирусом SV 40, иммунизировали вирусом SV 40, облученными опухолевыми сингенными клетками, эмбриональной тканью человека, клетками почки взрослого человека, лиофилизированными сингенными клетками опухоли, клетками 10-дневного плода хомяка. Иммунизация облученными опухолевыми клетками тормозила онкогенез в 100% случаев, вакцинация эмбриональной тканью человека и вирусом SV 40 — в 50 и 62%. Berman (1972) методами непрямой иммунофлюоресценции и перекрестной адсорбции обнаружил наличие антигенов, общих для поверхностей, трансформированных разными онкогенными вирусами, и эмбриональных клеток хомяка. Очевидно, опухолевые и эмбриональные клетки, даже гетерологичные, содержат общие антигены, локализующиеся на поверхностных мембранах.

Новообразования, индуцированные онкогенными вариантами аденовирусов, не исследовались на наличие антигенной реверсии, поэтому И. С. Башкаев и А. И. Агеенко (1978) предприняли попытку иммунодиффузионными методами обнаружить эмбриональные антигены в саркомах хомяков, вызванных аденовирусом человека 12-го типа (*A*12). Объектом изучения были избраны три группы экспериментальных аденовирусных опухолей хомяков: 1) первичноиндуцированные саркомы *A*-12, вызванные введением новорожденным хомякам аденовируса 12-го типа человека; 2) первичные саркомы *A*-12, прошедшие ряд пассажей на взрослых хомяках; 3) саркомы, возникшие после введения хомякам суспензии клеток легкого без макроскопически видимых метастазов от животных-носителей саркомы *A*-12 (Агеенко, 1974). Эмбриональную ткань хомяка брали от самок в последнюю треть беременности (10—13 день).

Были получены кроличьи антисыворотки к водно-солевому экстракту перевивной саркомы *A*-12 и эмбриональной ткани хомяка. Антисыворотки к последней после массивной адсорбции экстрактами из нормальных органов давали две линии преципитации с экстрактом эмбриона и не реагировали с антигенами из органов взрослого животного. Далее сыворотки испытывали с

водно-солевыми экстрактами разных групп аденовирусных сарком. Установлено, что как в первичных, так и в перевивных саркомах *А*-12 эмбриональный антиген обнаруживался в половине изученных образцов. Этот антиген, выявленный в саркоме *А*-12 антиэмбриональной сывороткой, был идентичен с одним из эмбриональных антигенов, определяемым той же сывороткой в эмбриональном экстракте. Новообразования, возникшие у хомяков после введения суспензии клеток легкого от опухолевых животных, не содержали указанного антигена. В последующем он был изучен в перекрестных опытах сравнения с использованием специфической антисыворотки к перевивному штамму этой саркомы.

Как уже отмечалось ранее, в саркоме *А*-12 выявляется два тканевых антигена, один из них идентичен тканевому легочному, второй — содержится в легком, но в меньшей концентрации, чем в опухоли. Опыты с использованием двух тест-систем показали, что эмбриональный антиген саркомы, выявляемый антиэмбриональной сывороткой, серологически идентичен второму тканевому антигену саркомы, обнаруживаемому специфической сывороткой к саркоме *А*-12. Однако интенсивная адсорбция в геле по Бьёрклунду насыщением агара антигеном легкого перед опытом вела к исчезновению линии преципитации к эмбриональному антигену опухоли. Следовательно, этот антиген содержится и в ткани легкого хомяка. Поскольку антиэмбриональные сыворотки после истощения не реагировали с экстрактами легкого даже при концентрации антигена 50 мг/мл, можно заключить, что концентрации эмбрионального антигена в легком ниже, чем в опухоли.

По-видимому, в аденовирусной опухоли происходит увеличение концентрации тканевого белка, серологически идентичного эмбриональному антигену. Так как этот антиген специфичен для эмбриона и, в некоторой мере, для опухоли, его, вероятно, можно отнести к группе канцероэмбриональных антигенов. Отрицательные реакции с антиэмбриональной сывороткой у половины образцов саркомы *А*-12, по-видимому, связаны с низкой концентрацией эмбрионального антигена в этих опухолях. Отсутствие этого антигена в опухолях *А*-12, возникших из легочных метастазов, можно объяснить утратой его в ходе опухолевой прогрессии или возникновением метастатических опухолей из клона клеток, не содержавшего этот эмбриональный антиген.

Во второй серии опытов была исследована возможная связь опухолеассоциированного антигена аденовирусных сарком с эмбриональным. Для этого водно-солевые экстракты из сарком А-3 и А-12 испытывались совместно с водно-солевым экстрактом эмбриона хомяка против антисыворотки к саркоме *А*-3. Антисыворотка давала четкую линию преципитации с эмбрионом хомяка, а сам характер линии свидетельствовал о том, что выявляемый антиген идентичен опухолеассоциированному антигену аденовирусных сарком хомяка *А*-3 и *А*-12.

Далее авторы попытались прямым способом выявить эмбрио-

нальный антиген в опухоли. Водно-солевые экстракты сарком *А*-3 и *А*-12 были испытаны с антисывороткой к ткани эмбриона хомяка, истощенной нормальными тканями. Антиэмбриональная специфическая сыворотка выявляла в экстрактах сарком *А*-3 и *А*-12 по одному тканевому антигену. Значит, в аденовирусных саркомах хомяка содержится эмбриональный антиген. Результаты опыта с антисывороткой к саркоме *А*-3 указывают на то, что аденовирусный *А*-3 опухолеассоциированный антиген имеет иммунологическое сходство с эмбриональным тканевым. Вероятно, он является канцероэмбриональным антигеном, как и антиген аденовирусной саркомы *А*-12 хомяка.

В последующих опытах были исследованы эмбриональные антигены, индуцированные у мышей линии СВА аденовирусом обезьян SA7(C8). Антисыворотка к эмбриону мыши давала две специфические линии преципитации с эмбриональным антигеном: одну сильную полосу ближе к лунке с антисывороткой и вторую, тонкую, к лунке с антигеном. Антиэмбриональная сыворотка реагировала также с водно-солевым экстрактом саркомы SA7(C8). Эмбриональный опухолевый антиген был идентичен второму эмбриоспецифическому антигену мыши. Далее специфичность тканевых антигенов была проверена в перекрестных опытах адсорбции с этими двумя тест-системами, для чего специфическую иммунную сыворотку к саркоме мыши SA7(C8) истощали антигеном эмбриона мыши и наоборот. Оказалось, что адсорбция антиопухолевой сыворотки тканью эмбриона полностью снимала реакцию как с антигеном эмбриона, так и с антигеном саркомы.

Антиэмбриональная сыворотка после истощения антигеном саркомы сохраняла одну линию преципитации с экстрактом эмбриона и совсем не реагировала с опухолевым антигеном. Это подтверждает вывод о серологической идентичности опухолеассоциированного антигена саркомы SA7(C8) и одного из тканевых антигенов эмбриона мыши СВА. Следовательно, выявляемый опухолеассоциированный тканевый антиген аденовирусной саркомы SA7(C8) серологически близок эмбриональному антигену мыши.

Итак, появление в неопластически трансформированных клетках эмбриональных антигенов или их вариантов, в том числе изоформ некоторых ферментов, вероятно, представляет собой общую закономерность бластоматозного процесса. К настоящему времени определена большая группа канцероэмбриональных антигенов в опухолях разной природы и локализации: в карциномах печени и герминальных тератокарциномах (α-фетопротеин), новообразованиях кишечника и яичников (раковоэмбриональный антиген), опухолях желудка (фетальный сульфогликопротеин), трофобластных опухолях (антиген беременности), различных карциномах (канцерофетальный антиген), новообразованиях, индуцированных вирусами и канцерогенами (эмбриональные антигены трансплантационного типа), при вирусном эритробластозе

(антиген эритробластов) и т. д. (Hirai, Alpert, 1975; Burtin, 1980; Staab e. a., 1980; Zoznoza e. a., 1980). Причины, обусловливающие синтез этих белков, практически лишь начинают исследоваться. Предполагают, что в некоторых случаях они связаны с гистогенезом опухоли из эмбриональных клеток, непролиферирующих и находящихся в ткани в стадии покоя. Иногда синтез эмбриональных белков объясняют дедифференцировкой или ингибированием этого процесса в опухолевых клетках. Нельзя также исключить, что опухолевая трансформация клеток сопровождается случайной или закономерной реверсией механизмов генетического контроля к эмбриональному типу регуляции, которая включает в работу гены, ответственные за синтез эмбриональных белков. Об этом свидетельствует сходство, зафиксированное на разных тест-системах, между опухолью и эмбриональной тканью, в отношении изоферментного состава пируваткиназы, некоторых трансаминаз эмбрионального типа, ЛДГ, аденилаткиназы, глутаминазы, ДНК-полимеразы и т. д., а также по чувствительности к действию различных индукторов (Wu, 1973; Шапот, 1975). Вместе с тем экспериментально не обоснован ни один из предполагаемых вариантов синтеза эмбриональных белков в опухолевых клетках.

Следует отметить, что некоторые из выявленных канцероэмбриональных антигенов уже изучены в иммунобиологическом аспекте как иммунорегуляторы, например, α-фетопротеин (АФП). Мышиный АФП оказывает минимальное влияние на первичный ответ IgM-антител и значительно воздействует на вторичный ответ IgM-, IgG- и IgA-антител на зависимый от тимуса антиген (эритроциты барана), но не на независимый от тимуса антиген DNP-фикол (Gershwin, 1980). Депрессорный ответ не связан с цитотоксическим действием. Мышиный АФП in vitro стимулирует образование супрессорных *Т*-клеток. При угнетении однонаправленной реакции смешанной культуры лимфоцитов АФП не препятствует образованию *Т*-клеток киллеров. В некоторых опытах обнаружено его иммуностимуляторное действие. Доза АФП, вызывающая биологическое воздействие, является фармакологической, но не физиологической, Она равна фармакологическим дозам и может быть образована в организме при гепатоме и некоторых других новообразованиях. Доза АФП, образуемая в неонатáльном периоде, вероятно, не может значительно влиять на онтогенез и (или) созревание иммунной системы. Некоторое угнетающее действие мышиного АФП зависит от его способности связывать эстрогены, в то время как α-фетопротеин человека их не связывает. Понятно, что подобного рода работы имеют прямое практическое значение.

В заключение этого раздела необходимо указать, что на многих тест-системах выявлена связь раковоэмбриональных антигенов с антигенами главного комплекса гистосовместимости (Hirai e. a., 1980).

Экспрессия реверсивных антигенов в опухолевых клетках (гетерогенные антигены)

Гетерогенные антигены, общие для разных видов животных, обнаруживаются в некоторых опухолях человека и животных. Появление их в опухоли свидетельствует о глубокой антигенной реверсии в клетке, происходящей в процессе неопластической трансформации. Важно отметить, что, например, в крови больных различными злокачественными новообразованиями систематически в определенном проценте случаев (25 и более) выявляются антитела к *T*-антигену *A*12 вируса. Учитывая высокую онкогенную активность аденовирусов, выявленную в опытах на животных, включая и обезьян (Mukai e. a., 1980), и их постоянное наличие в слизистых дыхательных путей человека (у 65—70% детей до 12 лет присутствуют сильноонкогенные *A*12 и *A*18), интерес представляла попытка обнаружить общие тканевые антигены в опухолях человека и новообразованиях животных, индуцированных вирусом *A*12.

В первой серии опытов И. С. Башкаев, А. И. Агеенко и И. Я. Коган (1972) исследовали возможность общности антигенов ткани рака желудка и саркомы *A*-12 хомяка. Антисыворотка к саркоме хомяка при реакции преципитации в геле давала, как описано выше, две полосы преципитации, одна из которых была общей с антигенами легкого. Эта антисыворотка была испытана в опытах иммунодиффузии с антигенами из ткани желудка, взятой от разных больных, и из нормальных органов человека. Сыворотка выявила гетерогенные антигены в 5 из 12 изученных опухолей желудка и реагировала, хотя и слабее, с антигенами нормальных органов человека. Для выяснения специфичности найденных антигенов был поставлен опыт с адсорбцией иммунной сыворотки различными антигенами человека, которую вели в геле по Бьёрклунду. Антигены из легкого хомяка не снимали гетерогенных реакций, следовательно, гетерогенный антиген не был связан с нормальными тканевыми антигенами хомяка. Адсорбция сывороткой человека не убирала линии преципитации к раковому антигену. Гетерогенные реакции к раку желудка человека полностью исчезали после адсорбции экстрактом слизистой нормального желудка. Следовательно, общность ткани рака желудка человека и аденовирусной саркомы хомяка связана с тканевым гетерогенным антигеном, который имеется в нормальном желудке человека.

Далее было показано, что антисыворотка к раку желудка человека выявляет гетерогенный антиген в саркоме *A*-12 и нормальных органах хомяка. Линии преципитации к этой саркоме не убираются адсорбцией антигеном слизистой толстой кишки человека и исчезают после адсорбции антигеном нормального желудка человека и селезенки хомяка. Это говорит о том, что гетерогенный антиген ткани рака желудка человека связан с нор-

мальными тканевыми антигенами желудка, общими с селезенкой хомяка.

Таким образом, данные, полученные перекрестно двумя сыворотками, полностью совпадают и позволяют сделать вывод, что в ткани саркомы *А*-12 хомяка нарастает концентрация одного из тканевых гетерогенных антигенов, имеющего серологическую общность с антигенами слизистой желудка человека.

Несколько далеко в эволюционном плане заходит антигенная реверсия. И. С. Башкаев и А. И. Агеенко (1978) в опытах иммунодиффузии испытали экстракты сарком *А*-12 хомяка с антисывороткой к ткани лягушки (Rana tempozaria). Эта сыворотка после истощения водно-солевыми экстрактами нормальных органов хомяка давала четкую линию преципитации с экстрактом саркомы *А*-12. Следовательно, в опухоли *А*-12 хомяка содержится гетерогенный антиген, общий с тканями лягушки и отличный от гетерогенных антигенов нормальных тканей хомяка.

Интерес представляло выяснение взаимоотношения найденного гетерогенного и ранее обнаруженного канцероэмбрионального антигенов саркомы *А*-12 хомяка. Для этого водно-солевой экстракт саркомы *А*-12 был испытан попарно одновременно со специфическими антисыворотками против саркомы *А*-12 эмбриона хомяка и ткани лягушки. Характер слияния образовавшихся линий преципитации указывает на то, что гетерогенный антиген саркомы серологически идентичен эмбриональному, выявляемому эмбриоспецифической сывороткой, кроме того, он идентичен одному из тканевых антигенов опухоли, серологически сходному с эмбриональным антигеном хомяка. Поскольку гетерогенный антиген серологически сходен как с эмбриональным, так и с опухолевым тканевым антигеном саркомы *А*-12, не исключено, что гетерогенный детерминант входит в состав канцероэмбрионального антигена саркомы *А*-12 хомяка.

Новые вирусспецифические, поверхностные, ядерные и цитоплазматические белки *А*12 синтезируются в инфицированных клетках через несколько часов после заражения их вирусом. Поэтому принципиальное значение для понимания эпигеномной перестройки, обусловливаемой онковирусом в процессе опухолевого превращения клеток, имеет исследование кинетики появления растворимых цитоплазматических белков, связанных с вирусной инфекцией.

Была изучена общность растворимых цитоплазматических тканевых антигенов ФЭК, зараженных аденовирусом 12-го типа, и саркомы хомяка, вызванной этим же вирусом. Антисыворотка к ФЭК, инфицированным вирусом *А*12, была испытана по реакции преципитации в геле с антигенами из ткани сарком хомяка и нормальных тканей хомяка и крысы, а также с антигенами, полученными из первичных культур, незараженных или инфицированных вирусом А12. Иммунная сыворотка дала четкие линии преципитации с антигеном саркомы и слабее реагировала с ан-

тигенами из нормальных органов хомяка и крысы. Специфичность реакций была показана в опытах с применением адсорбции. Оказалось, что гетерогенный антиген саркомы хомяка, общий с клетками ФЭК, отличен от нормальных гетерогенных антигенов его органов. Адсорбция антигеном легкого крысы приводила к исчезновению реакций с нормальными органами крысы и хомяка и не убирала линий преципитации к антигенам саркомы хомяка. Следовательно, гетерогенный антиген аденовирусной саркомы серологически отличен от нормальных антигенов легкого крысы. Экстракт из незараженных культур ФЭК полностью снимал все линии преципитации к гомологичным антигенам из этих клеток, инфицированных вирусом *A*12, и из незараженных ФЭК и нормальных органов хомяка. Реакция с антигенами из органов сохранялась, по-видимому, вследствие большого сродства тканевых экстрактов.

Таким образом, гетерогенные реакции антисывороток к ФЭК с экстрактами аденовирусных сарком хомяков связаны с гетерогенным антигеном саркомы, идентичным нормальным антигенам ФЭК. Поскольку адсорбция экстрактом из незараженных клеток ФЭК снимает эти перекрестные реакции, то они не связаны с антигенами ФЭК, появившимися в клетке под действием аденовируса. Данные адсорбции показывают, что этот антиген саркомы отличен от антигенов нормальных органов взрослых крыс и хомяков. Принимая во внимание, что использованная в этом опыте антисыворотка получена при иммунизации ФЭК, можно предположить, что гетерогенный антиген, по-видимому, связан с эмбриональной тканью крысы. Контрольные опыты с антисывороткой к нормальным органам мыши показали, что наличие этого антигена не зависит от увеличения концентрации в опухоли неспецифических тканевых антигенов, имеющих повышенное серологическое сходство с антигенами других видов животных. Возможно, в опухолях хомяка происходит нарастание концентрации гетерогенного тканевого антигена, общего с эмбриональным антигеном крыс.

В следующей серии опытов для изучения эмбриональных гетерогенных антигенов, общих с опухолями человека, была применена антисыворотка к ФЭК, инфицированным аденовирусом 12-го типа человека. Антигены, полученные из ткани рака желудка человека, были испытаны с этими антисыворотками. 10 из 14 образцов рака желудка и 3 из 6 рака легкого содержали гетерогенный антиген, общий с опухолью хомяка. Сыворотка к фибробластам крысы давала линии преципитации с антигенами из ткани рака желудка и с антигенами из нормальных органов человека (желудок, селезенка, легкое). Специфичность этих реакций была изучена в опытах адсорбции в геле по Бьёрклунду. Было установлено, что адсорбция иммунной сыворотки антигенами слизистой нормального желудка и сывороткой человека не снимала линии преципитации к раку желудка. Реакция с раковым антигеном

человека резко ослаблялась после адсорбции экстрактом легкого. Только 1 из 3 раковых антигенов продолжал давать линии преципитации с антисывороткой к ФЭК после такой адсорбции. Адсорбция экстрактом легкого крысы полностью снимала реакции с антигенами рака желудка человека. Следовательно, антигенная общность клеток эмбриона крысы с тканью рака желудка обусловливалась наличием в опухоли нового гетерогенного антигена, отличного от таковых слизистой нормального желудка человека и серологически близкого тканям легкого человека и крысы. Кроме того, он серологически отличен от гетерогенного антигена аденовирусной саркомы *А*-12, выявляемой этой же антисывороткой. Об этом свидетельствуют характер пересечения линий преципитации в агаре, давших реакцию полной неидентичности, и разная степень сродства с антигеном легкого крысы.

Представленные материалы согласуются с данными других авторов о нарастании содержания гетерогенного форсмановского антигена в опухоли и при трансформации, детерминированной онковирусами, а также с наблюдениями, показавшими антигенное сходство ткани рака желудка человека и эмбриона крысы (Sheppard e. a., 1971).

В заключительной серии экспериментов А. И. Агеенко с соавт. (1977) исследовали саркому SA7(C8), вызванную у мышей CBA обезьяним аденовирусом SA7(C8). Антисыворотка к саркоме SA7(C8) после истощения нормальными органами мыши давала четкую реакцию с экстрактом желудка лягушки. Антисыворотка к ткани лягушки также выявляла линию преципитации с экстрактом саркомы. Опыты по сравнению показали, что оба антигена идентичны, хотя и неполностью, о чем свидетельствует характерная «шпора» при пересечении линий. Оказалось, что антигенная реверсия в аденовирусной опухоли мыши ведет к появлению канцероэмбрионального и гетерогенного антигенов, близких к антигенам лягушки. Представленные результаты совпадают с данными, полученными при изучении аденовирусной саркомы *А*-12 хомяка и других новообразований.

Обнаруженный феномен можно объяснить резким увеличением при канцерогенезе одного из нормальных гетерогенных тканевых антигенов, имеющихся в очень малых количествах в гомологичной нормальной ткани, из которой возникла опухоль. Альтернативное объяснение позволяет считать этот антиген нормальным компонентом эмбриональной клетки-предшественницы, которая является мишенью онкогенного фактора, в данном случае опухолеродного вируса.

Весьма сложно объяснить общность опухолевых антигенов сарком крысы с тканевыми антигенами рака желудка человека. Вероятно, она связана с дерепрессией в ткани рака желудка древних гетерогенных антигенов, общих с антигенами сарком крыс и мышей и отличающихся от гетерогенных антигенов нормальных высокодифференцированных тканей. Исходя из этого,

можно предположить, что опухолевые антигены более гетерогенны, то есть более антигенно удалены от вида хозяина, чем нормальная его ткань.

Итак, представленные в этом разделе экспериментальные материалы продемонстрировали изменения широкого спектра растворимых антигенов клетки. Отмечено появление резких количественных изменений — нарастание концентрации тканевого легочного антигена (антигенная инверсия), а также появление эмбриональных антигенов (антигенная реверсия). Выявлена антигенная общность эмбрионального и опухолеассоциированного антигенов аденовирусных сарком. Найдена связь этих антигенов с гетерогенными антигенами, характерными для других биологических видов.

Однако обнаруженные антигены существенно отличаются от известных канцероэмбриональных антигенов: α-фетопротеина Абелева и антигена Голда. Аденовирусные антигены не являются строго тканеспецифическими, они иммунологически сходны у разных видов животных. Поскольку маловероятно, что аденовирус может индуцировать одинаковый, нормальный клеточный антиген независимо от вида ткани и хозяина, в данном случае возможны различные объяснения.

По мнению авторов, обнаружение большой группы перекрестнореагирующих антигенов (опухолеассоциированные эмбриональные, гетерогенные), общих для аденовирусных опухолей, может быть объяснено гистогенезом этого типа опухоли. Нельзя исключить, что мишенью для вируса служат эмбриоподобные клетки, находящиеся в стадии покоя. Они менее тканеспецифичны, недифференцированы и по своим свойствам близки к эмбриональной ткани. Изменения растворимых антигенов отражают поздние стадии трансформации и носят более широкий характер, чем изменения поверхностных трансплантационных антигенов клетки. Это объясняет отсутствие тканевой и видовой специфичностей обнаруженных аденовирусных антигенов. Так как объектом действия вируса являются эмбриоподобные клетки, начинающие после трансформации пролиферировать, то появление в опухоли эмбриональных антигенов естественно. Эмбриональные клетки несут в себе многочисленные рекапитуляции по закону Мюллера-Геккеля, в том числе и антигенную рекапитуляцию. Поэтому вполне очевидно, что опухоли, возникающие из этих клеток, имеют антигены, общие с другими видами животных, — гетерогенные антигены. Это говорит, по-видимому, об обширных процессах генетической дерепрессии, приводящей к функционированию, казалось бы, прочно закрытых генов, оставшихся от эволюционных предков человека.

Таким образом, появление тканевых гетерогенных антигенов в опухоли представляет собой новый тип антигенной реверсии в опухолевой клетке.

Глава III

ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРИ ОПУХОЛЕВОМ РОСТЕ

Иммунный ответ — это сложный, многоэтапный, последовательный процесс, осуществляемый на молекулярном и клеточном уровнях, начинающийся в организме с распознавания чужеродных антигенов и заканчивающийся накоплением иммунных эффекторных клеток и антител. В нашу задачу не входит описание всех многочисленных событий, которые предшествуют формированию эффекторного звена иммуногенеза, а также рассмотрение трех основных клеточных классов: *Т*- и *В*-лимфоцитов и макрофагов, определяющих иммунный ответ организма (см. у Петрова, 1976; Брондза, Рохлина, 1978; Фонталина, Певницкого, 1978; Петрова с соавт., 1981). Вместе с тем для понимания этой и последующих глав необходимо хотя бы схематично представить разнообразные субклассы вышеуказанных клеточных классов, находящихся под генетическим контролем организма. Иммунный ответ опосредуется многими факторами, которые либо усиливают, либо подавляют иммунологическую реакцию, осуществляемую *Т*- и *В*-системами иммунитета. Эти две весьма самостоятельные системы действуют кооперативно и, в зависимости от характера и специфики антигена, а также от генетических и физиологических особенностей организма, обеспечивают накопление одного или двух типов эффекторных клеток: *Т*-лимфоцитов или *Т*-киллеров (лимфоцит-убийца) или цитотоксических *Т*-клеток и *В*-лимфоцитов (после взаимодействия с *Т*-лимфоцитами и макрофагами), превращающихся в плазматические клетки, активно синтезирующие антитела, то есть иммуноглобулины различных классов (IgM, IgG, IgD, IgE, IgA).

Тимусзависимая *Т*-система иммунитета состоит из *Т*-лимфоцитов, формирующихся в тимусе[1], а затем расселяющихся в тимусзависимые зоны (периваскулярные пространства селезенки, паракортикальные зоны лимфатических узлов, пейеровы бляшки и т. д.). Считают, что *Т*-клетки формируются в тимусе из костномозговых предшественников (*То* или претимические *Т*-клетки)

[1] Название вилочковой или зобной железы, принятое в иммунологии.

и в процессе созревания проходят стадии T_1 и T_2. T_1-лимфоциты — относительно, короткоживущие, нерециркулирующие лимфоидные клетки, которыми богаты тимус и селезенка. Жизненный цикл T_2-лимфоцитов более долгий (4—6 мес), они являются рециркулирующими клетками и составляют основную массу лимфоцитов крови, лимфы и лимфатических узлов. T_1-лимфоциты содержат особые дифференцировочные Ly-антигены: Ly1, Ly2 и Ly3, которые утрачиваются ими (либо Ly1, либо Ly2 и Ly3) в процессе превращения в T_2-клетки. T_2-лимфоциты представляют собой весьма разнородные субпопуляции, которые в зависимости от функции и присутствия тех или иных дифференцировочных антигенов подразделяются на *Т*-хелперы, или помощники ($Ly1^+$, $Ly23^-$), *Т*-киллеры ($Ly23^+$, $Ly1^-$), *Т*-супрессоры ($Ly23^+$, $Ly1^-$) и *Т*-клетки, осуществляющие реакции гиперчувствительности замедленного типа (Cantor e. a., 1978; Gershon, Metzler, 1978). Кроме того, эффекторные клетки (*Т*-киллеры) *Т*-системы иммунитета ответственны за трансплантационный и противоопухолевый иммунитет и другие реакции клеточного и тканевого иммунитета. *Т*-хелперы оказывают помощь в процессе антителообразования *В*-системой иммунитета. *Т*-супрессоры обеспечивают *Т*-клеточную регуляцию иммунного ответа как минимум тремя субпопуляциями *Т*-лимфоцитов: Ly23-супрессорами, Ly123-супрессорами (регулируют деятельность как хелперов, так и Ly23-супрессоров) и есть данные, что T_1-лимфоциты также обладают супрессорной активностью (Kappler, Marrack, 1975). Установлено, что селезенка и печень более богаты Т-супрессорами, а лимфоузлы — хелперами, как и их предшественниками (Cantor, 1971; Vuitton e. a., 1977).

Считают, что трансформация *Т*-киллеров в *Т*-хелперы и наоборот, по-видимому, невозможна. Процесс дифференцировки в сторону хелперов, киллеров или супрессоров, вероятно, начинается еще в тимусе, но возможен и в периферических лимфоидных органах. Регулируется он гормонами тимуса и контролируется генетически (Петров с соавт., 1981). В молодом возрасте в тимусе преимущественно имеет место дифференцировка в направлении супрессоров, в старом — наоборот, в сторону киллеров и хелперов. Процесс дифференцировки сопровождается появлением на клеточной мембране *Т*-лимфоцитов антигенраспознающих рецепторов, которые, вероятно, не идентичны у разных субпопуляций (Брондз, Рохлин, 1978). В частности, в отличие от хелперов *Т*-супрессоры обладают рецепторами к Fc-фрагменту иммуноглобулинов и могут реагировать на некоторые тимусзависимые антигены, тогда как хелперы на них не реагируют. Популяции зрелых *Т*-лимфоцитов содержат рецепторы к данному антигену, то есть они клонированы по сродству к антигену. В результате иммунизации тимусзависимыми антигенами *Т*-лимфоциты пролиферируют и дифференцируются в эффекторные, рециркулирующие *Т*-клетки и в *Т*-клетки памяти. Первые при контакте с антигеном

продуцируют и выделяют различные медиаторы — лимфокины, которые и осуществляют разнообразные эффекты *Т*-клеточной системы иммунитета. Главная функция *Т*-лимфоцитов заключается в способности распознавать продукты генов основного комплекса тканевой совместимости и реагировать против них (Paul, Benacerraf, 1977).

В-лимфоциты формируются из предшественников *В*-клеток (непосредственно из стволовых гемопоэтических клеток) в костном мозге (у птиц, вероятно, в фабрициевой сумке) и затем расселяются главным образом в тимуснезависимые зоны периферических лимфоидных органов (мякотные тяжи белой пульпы селезенки, фолликулы лимфатических узлов). Они обладают высокой радиочувствительностью и имеют относительно короткий жизненный цикл. Незрелые B_1- и зрелые B_2-лимфоциты отличаются способностью фиксировать антиген строением и особенностями иммунного ответа. Основным отличием зрелых B_2-лимфоцитов является присутствие на их клеточной мембране иммуноглобулинов, синтезированных самим лимфоцитом, а также рецепторов к Fc-фрагменту антител и C_3-рецепторов к комплементу. Последние два рецептора являются неспецифическими, общими для всех *В*-клеток. Fc-рецепторы обеспечивают связывание *В*-лимфоцита с Fc-фрагментом молекулы глобулина, а. C_3-рецепторы позволяют *В*-клеткам образовывать комплексы антиген-антитело-комплемент. Наличие этих рецепторов дает возможность проводить идентификацию *В*-клеток по их способности образовывать розетки с эритроцитами, нагруженными комплексами антиген-антитело или комплемента. Вместе с тем разделение лимфоидных клеток с помощью этого теста не является абсолютным, поскольку показано, что некоторые субпопуляции *Т*-клеток также содержат Fc- и C_3-рецепторы, в частности, субпопуляция антигенреактивных T_2-лимфоцитов, несущая Ly1- и небольшое количество Thy-1 (Q)-антигены.

В-клетки многих животных содержат на поверхности антигены MBLA и PSA. Популяции зрелых *В*-клеток клонированы по сродству поверхностных иммуноглобулинов к различным антигенам и гаптенам. Большинство природных и синтетических антигенов (например, трансплантационные, тканеспецифические, сывороточные и т. д.) — тимусзависимые. Тимуснезависимые антигены — это главным образом высокополимерные полисахариды или белки, обладающие неспецифической митогенной активностью. Иммунный ответ на антигены этого класса, как правило, ограничивается синтезом IgM-антител, а иммунологическая память при этом выражена слабо. Синтез IgG и IgE-антител обычно осуществляется на тимусзависимые антигены.

Иммунологическая специфичность рецепторов *В*-лимфоцитов сохраняется у потомков данной клетки и впоследствии определяет специфичность секретируемых ею иммуноглобулинов. Причём этот процесс протекает в отсутствие антигенного стимула. У та-

ких нестимулированных *B*-клеток на поверхности обычно содержатся IgM и IgD, а у примированных *B*-клеток (клетки памяти) находятся IgM, IgG и IgE, то есть они, вероятно, на своей мембране имеют больше рецепторов, чем нестимулированные лимфоциты. Существует более многочисленная популяция B_2-лимфоцитов, для которых необходима кооперация с *T*-клетками; B_1-лимфоциты не нуждаются в такой кооперации. Первая популяция несет на своей мембране Ia-антиген и рецепторы к третьему компоненту комплемента C_3, а также, по-видимому, содержит более аффинные антигенспецифические рецепторы и обладает способностью переключаться на синтез IgG и формировать клетки памяти. B_1-клетки, вероятно, состоят из менее зрелых лимфоцитов, обладающих прямо противоположными признаками и реагирующих с тимуснезависимыми антигенами. Важно подчеркнуть, что B_1-лимфоциты при определенных условиях могут реагировать и на тимусзависимые антигены в отсутствие *T*-клеток. Следовательно, подразделение антигенов на *T*-зависимые и *T*-независимые весьма условно. Наконец, существуют B_3-лимфоциты, которые не трансформируются в антителообразующие клетки и аналогично *T*-лимфоцитам осуществляют киллерную функцию в отношении клеток-мишеней, на поверхности которых адсорбированы IgG-антитела, соединяясь с их Fc-фрагментами.

Считают, что наряду с *T*-хелперами и *T*-супрессорами существуют *B*-хелперы и *B*-супрессоры, выполняющие не менее важные функции в регуляции иммунного ответа (Петров с соавт., 1981). Показано, что определенные субпопуляции *B*-клеток осуществляют регуляторную супрессорную роль в различных иммунологических системах: антителогенезе, пролиферации лимфоидных и кроветворных клеток, реакциях клеточного иммунитета и т. д. В некоторых случаях супрессорный эффект *B*-клеток имеет, вероятно, локальный характер, обусловленный их расселением в определенные тимуснезависимые зоны.

Наконец, третьим необходимым компонентом иммунного ответа как на тимусзависимые, так и тимуснезависимые антигены являются макрофаги или, как их еще называют, *A*-клетки. Общепризнано, что макрофаги выполняют связывающие функции между различными механизмами иммунной системы. С помощью вырабатываемых ими медиаторов — монокинов или контакта клетки с клеткой макрофаги выступают в различных ролях: клетки-эффекторы, клетки-хелперы и клетки-супрессоры. Филогенетическая древность макрофагов и их специфическая функция опознавания антигена, а затем представления его на своих клеточных мембранах дает возможность считать их центром эволюции иммунной системы. В свою очередь их активация может быть модулирована специфическими продуктами других активированных клеток с более ограниченными иммуно-опознавательными механизмами. Итак, как видно, участие макрофагов в иммунном ответе очень многообразно, но прежде всего они фагоцитируют антигенсодер-

жащий материал и, переваривая излишки фагоцитированного антигена, тем самым регулируют интенсивность антигенного стимула. При этом «обработанный» макрофагами антиген значительно повышает иммуногенность и превращается в так называемый суперантиген, который на поверхности макрофага преподносится *B*-клеткам. Недавно было обнаружено, что в состав суперантигена макрофагами включаются продукты основного комплекса гистосовместимости (I-локуса) и этот растворимый комплекс антиген-Ia-продукты предоставляется макрофагами *T*-хелперам. Кроме того, иммуногенность суперантигена увеличивается благодаря формированию на поверхности макрофага решетки из многочисленных молекул антигена, а в случае тимусзависимого антигена образуется решетка из комплексов антиген-*T*-рецептор.

К настоящему времени накопился большой экспериментальный и клинический материал, свидетельствующий о том, что опухолевый рост всегда сопровождается иммунологической реакцией организма, интенсивность которой зависит от специфики бластоматозного процесса и многих других факторов, которые будут разобраны в этой и в последующих главах.

Т- и В-системы иммунитета и бластоматозный процесс

Совокупность экспериментальных данных, полученных на разных тест-системах, убедительно свидетельствует об определяющей роли специфически активированных лимфоцитов в различных феноменах тканевого иммунитета: трансплантационном и противоопухолевом иммунитетах, гиперчувствительности замедленного типа, аутоиммунных процессах, иммунологической толерантности и т. д. (Waksman, 1959; Winn, 1960; Amas, 1962; Nossal, 1962; Медуницын, 1963; Фриденштейн, Гельфанд, 1963; Брондз, 1965; Петров с соавт., 1981; и др.).

Значение лимфоцитов в реакции организма на опухоль было показано еще Da Fana (1912), который доказал, что резистентность к трансплантируемым клеткам злокачественных новообразований может быть обусловлена иммунологической активностью лимфоцитов, иммунных к опухоли животных. С этого времени изучению гуморальных и клеточных факторов иммунной защиты при опухолевом росте было посвящено огромное число работ. К сожалению, первые исследования этого направления проводились на моделях злокачественных новообразований, длительное время перевиваемых на неинбредных животных. Поэтому эксперименты не могли дать представления об истинных иммунологических механизмах противоопухолевой резистентности, поскольку невозможно было дифференцировать специфический противоопухолевый иммунитет от трансплантационного (Ellis, Kind, 1952; Staerk, 1953; Bollag, 1955; Радзиховская, 1958; и др.).

Изучение иммунитета к опухолям, индуцированным химическими канцерогенными веществами у инбредных мышей и пасси-

руемым на сингенных животных (не более 1—2 пассажей), было начато, как уже отмечалось, в середине 40-х гг. (Gross, 1943; Goldfeder, 1945; Apterman, Levis, King, 1946, 1949; Foley, 1953). В большинстве этих опытов рассасывание опухоли достигалось перевязкой основания внутрикожно привитого трансплантата. Мыши с рассосавшейся опухолью были высокоиммунны к последующей прививке той же опухоли. Prehn, Main (1957), Prehn (1959) подтвердили данные о наличии иммунной реакции мышей на саркомы, индуцированные метилхолантреном. Во всех этих экспериментах противоопухолевый иммунитет выражался в увеличении продолжительности жизни, замедлении роста опухолей и рассасывании последних у иммунизированных животных. При этом имела место строгая индивидуальная специфичность индуцированной резистентности, которая возникала только по отношению к опухоли, взятой для иммунизации, и отсутствовала по отношению к другим новообразованиям, индуцированным тем же канцерогеном у изологичных мышей.

Было показано наличие специфической иммунологической реакции и к спонтанным опухолям при условии полного изоантигенного тождества опухоли и реципиента (Hirsch e. a., 1958; Koldovsky, 1961; Riggins, Pilsh, 1964; и др.). Однако иммунитет в этих случаях был выражен слабее, чем по отношению к новообразованиям, индуцированным химическими канцерогенными веществами.

Особенно интересные и важные факты были получены исследователями при изучении опухолей вирусной этиологии. Habel (1961) и независимо от него Sjögren (1961) описали явление, получившее затем название «феномена резистентности». Авторы обнаружили, что инокуляция вируса полиомы взрослым животным, невосприимчивым к его онкогенному действию, создавала у них резистентность к клеткам новообразований, вызванных этим вирусом. Причем для роста опухоли у подопытных животных требовалась доза клеток, в 10—100 раз превышающая ту, которая дает начало опухолевому росту у контрольных животных (вирус полиомы им предварительно не вводился).

Последующее изучение феномена резистентности показало, что его удается воспроизвести и по отношению к другим опухолям вирусной природы (Habel, Eddy, 1963; Defendi, 1963; Sachs, 1962; Klein, Sjögren, Klein, 1962; Радзиховская, 1964; Пригожина, Ставровская, 1964; и др.). Характерной особенностью индуцированной онкогенными вирусами резистентности является то, что она возникает очень быстро после введения вируса и сохраняется неограниченно долгое время (Habel, 1962; Koch, Sabin, 1963; Sjögren, 1964; и др.). Феномен резистентности, подобно другим иммунологическим явлениям, отличается высокой специфичностью. Этот факт единодушно подчеркивается всеми цитированными выше авторами. Вместе с тем в отличие от опухолей, вызванных введением химических канцерогенных веществ, резистентность

к вирусным новообразованиям не носит строго индивидуального характера, а распространяется на все опухоли, индуцированные данным вирусом у животных аллогенных линий, а иногда и разных видов. Это является убедительным аргументом в пользу ведущей роли вируса в индукции антигенов трансплантационного типа в процессе опухолевой трансформации клетки.

В 60-е гг. были проведены исследования по выяснению механизма цитотоксического действия иммунных лимфоцитов на клетки различных новообразований. Klein, Sjögren, Klein (1960) в опытах in vivo клетки саркомы, первичноиндуцированной метилхолантреном, смешивали с суспензией клеток регионарных лимфатических узлов. В этих условиях иммунные лимфоциты вызывали отчетливое подавление бластоматозного процесса, что выражалось в снижении процента прививаемости и удлинении латентного периода роста опухоли.

Аналогичный эффект был получен и в отношении клеток спонтанной аденокарциномы молочных желез мышей СВА, на которые иммунные лимфоциты оказывают цитотоксическое действие. Благодаря этому увеличивается продолжительность жизни животных (Koldovsky, 1961).

В последующем Rosendy и Maan (1961) разработали методику, позволяющую изучить действие иммунных лимфоцитов на клетки-мишени в культуре ткани. В результате было установлено, что иммунные лимфоциты вызывали разрушение опухолевых клеток через 48 ч после контакта с ними. Противоопухолевое действие иммунных лимфоцитов было продемонстрировано также с помощью метода «подавления образования колоний», предложенного Hellström (1963, 1967). Первичные фибросаркомы, индуцированные метилхолантреном у мышей линии C_3H, Hellström e. a. (1967, 1968) культивировали in vitro. Через 2—6 дней после начала культивирования к культурам добавляли взвесь лимфоцитов из регионарных лимфатических узлов сингенных мышей, иммунизированных соответствующей опухолью. После 3—4 дней совместного культивирования опухолевых клеток и лимфоцитов в чашках Петри было отчетливо выражено антибластическое действие последних. Это выражалось в уменьшении количества образуемых опухолевыми клетками колоний (на 63,4—65,8%) по сравнению с контролем. Аналогичным действием обладали клетки лимфатических узлов мышей, у которых за 3—8 дней до экстирпации узлов удаляли аутохтонную первичную опухоль.

На различных моделях вирусного канцерогенеза был осуществлен адаптивный перенос противоопухолевого иммунитета клетками селезенки, лимфатических узлов и вилочковой железы, а также было выявлено цитотоксическое действие иммунных лимфоцитов на злокачественно трансформированные клетки (Sjögren, Hellström e. a., 1967; и др.). Важно обратить внимание на то, что в опухолях, вызванных химическими канцерогенами и опухолеродными вирусами у млекопитающих и птиц, различными мето-

дами in vivo и in vitro постоянно выявлялось присутствие TSTA-антигенов, на которые и был направлен иммунный ответ. Вместе с тем, хотя иммунологическое изучение опухолей человека in vitro позволило обнаружить у онкологических больных клеточную и гуморальную иммунные ответные реакции на опухоль соответствующего гистологического типа, вопрос о наличии на поверхности этих новообразований TSTA-антигенов до сих пор остается открытым. Объясняется это прежде всего редкой возможностью проведения подобных исследований в аутохтонной системе, а также значительной вариабельностью иммунологических ответных реакций у одного и того же больного. Тем не менее в этом направлении за последние десять лет накоплен большой материал (Gold, Shuster, 1980). Особый интерес представляют исследования Hellström e. a. (1968, 1969, 1970, 1971), которые методом ингибиции колоний изучали иммунологическую активность лимфоцитов людей, страдающих различными типами новообразований (нейробластомы, опухоль Вильмса, саркома мягких тканей, карциномы гортани, аденокарциномы легкого и толстого кишечника, меланома и др.), а также лимфоцитов людей, у которых эти опухоли регрессировали после лечения. Было показано, что на формирование колоний клетками нейробластомы задерживающее действие оказывали аутологичные лимфоциты, а также лимфоциты больных с нейробластомами. Лимфоциты здоровых лиц или больных с другими опухолями не обладали подобным действием. Блокирующий эффект свойствен лимфоцитам матерей, у детей которых были нейробластомы. Лимфоциты больных нейробластомами способны подавлять образование колоний аутохтонных опухолевых клеток тех же нейробластом независимо от того, были ли лимфоциты получены из крови больных с активным опухолевым процессом или больных, не имеющих симптомов болезни в результате проведенной терапии. Причем сыворотка первой группы больных снижала ингибирующий эффект лимфоцитов, в то время как сыворотка второй группы больных таким свойством не обладала.

Авторы изучали действие лимфоцитов каждого больного на клетки того же гистологического типа опухоли, которая была у донора, и на клетки опухолей других гистологических типов. Лимфоциты больных опухолями того же гистологического типа, что и клетки-мишени, оказывали на них цитоксическое действие, но не разрушали клетки опухолей других гистологических типов. На клетки нормальных тканей они также не оказывали действия.

Лимфоциты 57 из 59 исследованных (96%) подавляли образование клеточных колоний в культуре с аутохтонными опухолевыми клетками или разрушали их в цитотоксическом тесте. Лимфоциты 78 из 87 исследованных (89%) аналогично действовали на аллогенные клетки опухолей таких же гистологических типов, как и опухоли доноров.

Для 7 групп опухолей (меланома, карцинома, эндометрия,

различные саркомы, опухоли кишечника, молочной железы, яичка) получены доказательства антигенной перекрестной реакции опухолей одного и того же гистологического типа. В 5 из 7 изученных случаев лимфоциты, взятые у больных меланомами, снижали количество образовавшихся колоний аллогенных опухолевых клеток. Это свидетельствует о том, что меланомы обладают общими трансплантационными опухолевыми антигенами, что характерно для вирусных новообразований. Активность лимфоцитов проявлялась независимо от наличия у больных симптомов прогрессивного развития болезни или состояния ремиссии. На фибробласты подкожной клетчатки лимфоциты больных меланомой не оказывали цитотоксического эффекта. Тот факт, что лимфоциты больных с другими видами опухолей не действуют или действуют на клетки меланомы, указывает на наличие специфичности противоопухолевого иммунитета и специфических антигенов трансплантационного типа.

Те же закономерности получены при исследовании карциномы кишечника. Опухолевые клетки были взяты у 12 больных. У 5 из 7 лимфоциты оказались активными по отношению к аутохтонным опухолевым клеткам. Показано, что карциномы кишечника обладают перекрестной иммунологической реактивностью. Лимфоциты больных раком молочной железы, легких, меланомой и саркомами были неактивными против клеток карциномы кишечника. Интересно отметить, что в одном случае рака кишечника связанный с лимфоцитами противоопухолевый иммунитет выявлен через 29 лет после удаления опухоли.

Аналогичные результаты, в которых показана цитотоксичность лимфоцитов к аутохтонным и аллогенным клетками опухоли, были получены Currie e. a. (1970) у больных хорионкарциномой, Bubenik e. a. (1970) — при раке мочевого пузыря и т. д.

Таким образом, активное участие иммунных лимфоцитов в специфическом противоопухолевом иммунитете было наглядно продемонстрировано в отношении опухолей, индуцированных химическими канцерогенами и вирусами, а также у животных со спонтанными новообразованиями. Этой же способностью обладали лимфоциты больных, страдающих различными типами злокачественных новообразований. Однако, несмотря на присутствие в организме опухоленосителей специфически стимулированных лимфоцитов, опухоли прогрессивно росли. Оказалось, что одним из факторов, обусловливающих ускорение их роста, являлись «усиливающие» антитела, которых, как правило, определяли в сыворотках мышей с различными солидными опухолями разной природы. В то же время сыворотки мышей с лейкозами, лимфомами и лимфосаркомами главным образом содержали цитотоксические антитела (Wahren, 1963; 1966; Aoki, Bayse, Old, 1966; Old, 1967; Klein, Klein, 1964; и др.) Аналогичные результаты были получены и в отношении разных опухолей у других млекопитающих и у человека (Hellström e. a., 1970, 1971). Во всех этих исследованиях,

проведенных на различных тест-системах, было достоверно показано, что сыворотка организма опухоленосителя содержала антитела, которые могли усиливать или, наоборот, подавлять рост неопластически трансформированных клеток. В последующем было установлено участие фракций 7S и 19S, входящих в систему сывороточных иммуноглобулинов, в индукции усиления и резистентности к опухолям различной этиологии. Полагают, что IgM-антитела оказывают в основном цитотоксический, а IgG — усиливающий (блокирующий) эффект на опухолевые клетки-мишени (Möller, 1966). Действительно, экспериментально показано, что IgG-антителами значительно легче вызвать иммунологическое усиление опухолевого роста (Batchelor, 1968; Chard, 1968; Irwin e. a., 1968; Bubenik, 1968). Стимуляция неопластического процесса вызвана синтезом антител, не связывающих комплемент. Мышиный глобулин содержит электрофоретически медленно перемещающиеся фракции γ-2 и быстро перемещающиеся фракции γ-1. При этом первая обладает цитолитической и связывающей комплементактивностью, а вторая стимулирует рост опухоли (Chard, 1968). Broder e. a. (1968) подтвердили, что фракция γ-2, полученная из сыворотки морской свинки, иммунизированной опухолью, задерживает, а расщепленный пепсином фрагмент F (ab) γ-1 усиливает рост опухоли.

Интересные данные были получены Bubenik e. a. (1965). В сингенной системе на мышах с индуцированной метилхолантреном саркомой авторы показали, что эффективные компоненты специфической противоопухолевой сыворотки содержались всегда во фракциях IgG и IgM. Причем усиливающая активность присутствовала в обеих. Однако первая превышала по своей стимулирующей способности вторую. В сыворотках, которые оказывали ингибирующее действие на опухолевый рост, обе фракции также были эффективными. При этом фракция IgM оказывалась более цитотоксичной, чем фракция IgG.

Изучение механизма специфического усиления роста индуцированной метилхолантреном саркомы на линейных мышах было проведено Bloom e. a. (1970). Они исследовали цельную сыворотку мышей и фракции IgG и IgM в цитотоксической реакции с клетками опухоли. Было показано, что в сыворотке резистентных мышей титр антител значительно выше, чем у несенсибилизированных животных, а в сыворотке мышей с усиленным ростом опухоли он ниже, чем у контрольных животных. Опыты по цитотоксичности фракций показали, что IgM-фракция оказывала ингибирующее действие на рост опухоли независимо от того, получена ли она из сыворотки мышей резистентных или с усиленным ростом опухоли. Усиливающий эффект цельной сыворотки связан с IgG-антителами доноров обеих групп.

Материалы, указывающие на существенную роль IgG и IgM-антител в стимуляции и торможении лейкемогенеза, вызываемого у мышей вирусом Раушера, были получены В. С. Тер-Григоровым

с соавт. (1971) в ЛЭТО МНИОИ им. П. А. Герцена. Было показано, что необратимое прогрессирование вирусного лейкоза Раушера у мышей $C_{57}BL/6$ сопряжено с персистенцией продукции IgG-антител против группоспецифического антигена мышиных лейкозов, способных блокировать цитотоксический эффект IgM-антител той же специфичности и резко стимулировать лейкемогенез in vivo. При регрессирующем варианте лейкоза наблюдается более значительная продукция антител против группоспецифического, а позднее против типоспецифического антигена.

Таким образом, все работы, приведенные в этом разделе, свидетельствуют о том, что организм отвечает на растущую в нем опухоль специфической иммунологической реакцией, проявляющейся в выработке иммунных лимфоцитов и гуморальных изоантител.

Взаимодействие клеточного и гуморального факторов иммунитета

При изучении механизма взаимодействия клеточного и гуморального факторов иммунитета в реакции на опухоль прежде всего было обнаружено, что иммунные лимфоциты и гуморальные антитела могут действовать синергично или находиться в состоянии антагонизма. В первоначальных экспериментах на мышах Koldovsky (1961, 1962) показал, что клетки иммунных лимфоцитов, а также сыворотка крови ингибировали рост индуцированных канцерогенами опухолей при введении мышам, которым были привиты эти новообразования. Синергизм действия гуморальных антител и иммунных лимфоцитов был подтвержден Gorer (1961) на клетках сингенной саркомы.

Антагонизм клеточного и гуморального факторов иммунитета продемонстрировал Mitchison (1965) в аллогенной системе. Möller (1967) подтвердил этот факт в сингенной системе, показав, что клетки лимфоузлов и селезенки мышей-носителей аденокарциномы вызывали торможение роста этой опухоли у интактных мышей, а сыворотка опухоленосителя — усиление ее роста. Б. Д. Брондз (1964) сообщил, что гуморальные антитела блокируют in vitro цитотоксический эффект иммунных лимфоцитов на опухолевые клетки-мишени. Такие же результаты получил Möller (1965). В последующих экспериментах этого направления Hellström e. a. (1968, 1969) было обнаружено, что лимфоциты людей и животных (мыши, кролики) с растущими или регрессирующими аутохтонными спонтанными или индуцированными вирусами опухолями иммунологически активны и подавляют образование in vitro колоний опухолевых клеток. Сыворотки с регрессировавшими опухолями в присутствии комплемента ослабляли цитотоксическое действие иммунных лимфоцитов при их добавлении в культуру опухолевых клеток. Авторы полагают, что различия

иммунного статуса людей и животных с прогрессирующей или регрессирующей опухолью не связаны с изменениями функциональных свойств их лимфоцитов. Присутствие же в сыворотке опухоленосителя усиливающих антител приводит к тому, что они, соединяясь с антигенами опухолевых клеток-мишеней, защищают их от цитотоксического действия иммунных лимфоцитов. Аналогичные результаты получены Bubenik e. a. (1970) при изучении больных с карциномой мочевого пузыря. У части больных (4 из 9) сыворотка обнаруживала блокирующую активность, которая полностью уничтожала цитотоксическое действие лейкоцитов.

Оказалось, что синергический цитопатогенный эффект иммунных лимфоцитов и гуморальных антител зависел от концентрации последних в сыворотках опухоленосителей. При высокой концентрации происходило синергическое их действие, при низкой — имело место блокирование киллерной способности лимфоцитов (Skurzak, Klein, 1972).

Таким образом, вышеприведенные работы свидетельствуют о том, что судьба неопластически трансформированных клеток в значительной степени определяется силой и эффективностью иммунологического ответа организма на опухоль. Если иммунные лимфоциты и гуморальные антитела находятся в состоянии синергизма, то происходит деструкция опухолевых клеток, а в случае их антагонизма — отключение клеточного иммунитета, в результате чего создаются благоприятные условия для усиления опухолевого роста.

Сывороточные и клеточные факторы, блокирующие противоопухолевый иммунитет

Определяющим звеном иммунологического механизма защиты от трансформированных клеток являются иммунные лимфоциты. В связи с этим вопрос о достаточном количестве этих специфически стимулированных лимфоидных клеток и функциональной способности лимфоидной ткани в процессе канцерогенеза уже давно приобрел первостепенное значение. В монографии Burnet (1970) приводятся обширные сведения относительно лимфоцитарной инфильтрации (очаговой и диффузной) вокруг новообразований. Отмечено, что с увеличением числа рецидивов возрастает клиническая степень злокачественности и в ряде случаев при этом наблюдается уменьшение лимфоидной инфильтрации. Чем интенсивнее лимфоцитарная инфильтрация, тем дольше живет больной.

Kaliss (1958) один из первых обратил внимание на то, что гуморальные антитела могут защищать опухоли от иммунологической деструкции. В последнее время накапливаются материалы, свидетельствующие о функциональной дефектности лимфоцитов в организме опухоленосителя, тогда как в системе in vitro они

цитотоксичны для аутологичных опухолевых клеток. Оказалось, что в сыворотках животных и больных с прогрессирующими опухолями наряду с популяциями сенсибилизированных лимфоидных клеток находятся также и сывороточные факторы, специфически блокирующие их активность. Sjögren e. a. (1971) показали, что сыворотка мышей с прогрессивно растущими саркомами, индуцированными вирусом Молони или метилхолантреном, блокировала цитотоксический эффект лимфоцитов, иммунных по отношению к опухолеспецифическим антигенам аутологичных новообразований. Блокирующий эффект специфически исчезал в результате адсорбции сыворотки соответствующими типами опухолевых клеток и снова обнаруживался при их элюировании в условиях низких значений pH. Из элюата были выделены активные низко- и высокомолекулярные фракции, ни одна из которых в отдельности не ингибировала цитотоксический эффект лимфоцитов, в то время как их смесь в отношении 1 : 1 обладала специфическим блокирующим эффектом. Авторы предполагают, что ингибирующий фактор сыворотки животных с опухолью представляет собой комплекс антиген-антитело, способный связываться с лимфоцитами, иммунными к этим антигенам. В последующей серии экспериментов Sjögren e. a. (1971) обнаружили, что сыворотки крыс, иммунных к опухолям, вызванным вирусом полиомы, препятствуют подавлению гомологичной блокирующей сывороткой цитотоксической реакции, обусловленной лимфоцитами in vitro. Весьма интересным представляется то, что введение этих сывороток привело почти к полной регрессии опухолей у 4 животных из 5. Этот эффект был вызван не антивирусными антителами и, очевидно, не сывороточной аутотоксичностью, так как трансплантированные клетки вырастали до пальпируемых опухолей, прежде чем подвергались регрессии. Подобная регрессия никогда не наблюдалась у контрольных крыс. Аналогичные данные были получены и на клиническом материале. Культуры опухолевых клеток (клетки-мишени) различного типа Hellström e. a. (1971) инкубировали при 37°C с сыворотками больных, имевших опухоль того же типа, или с контрольными сыворотками здоровых людей и больных с опухолями другого типа. После окончания инкубации сыворотки удаляли и к клеткам-мишеням добавляли лимфоциты, полученные из крови аутологичных или других больных с опухолями гомологичного типа. О цитотоксической активности лимфоцитов судили по задержке формирования колоний и по цитотоксической реакции. Сыворотки больных с активно растущей опухолью блокировали противоопухолевую активность лимфоцитов в отношении клеток-мишеней гомологичного типа. Подобной активностью обладали 67 из 81 испытанной сыворотки. Реакция, блокированная так же как и цитотоксическая противоопухолевая активность лимфоцитов, была высокоспецифична. Крайне важно для практики, что в сыворотках леченых больных находились антитела, обеспечивающие эффективное действие иммунных лимфо-

цитов, вероятно, за счет блокирования антител, ускоряющих рост опухоли.

На некоторых тест-системах было показано, что функцию блокирующего фактора выполняет растворимый антиген опухолевой клетки (Lewin, 1973; Hellström, Hellström, 1974; Burtin, 1974; Loller, 1976). Причем иногда действие этого фактора, как и в ранее описанных экспериментах Sjögren (1971), осуществлялось одновременно на уровне как клеток-эффекторов, так и клеток-мишеней. Currie и Beshmen (1972) удалось выделить из сыворотки больных меланомой высокомолекулярный блокирующий фактор, который обнаруживал сродство к лимфоцитам и клеткам опухоли, то есть обладал свойством комплекса антиген-антитело. Указанный фактор был изолирован из сывороток многих больных с относительно медленным течением опухолевого процесса. У лиц с быстро растущей меланомой блокирующий эффект сыворотки был обусловлен содержавшимся в ней низкомолекулярным компонентом, имеющим сродство к лимфоцитам. По мнению авторов, он является опухолевым растворимым антигеном.

Блокирующие факторы были элюированы из сывороток больных и животных с новообразованиями; последующая инъекция этих препаратов приводила к усилению роста опухоли in vivo (Bansal e. a., 1972; Ran, Witz, 1972).

Baldwin e. a. (1972) искусственным образом получили блокирующий комплекс путем смешения неблокирующих гипериммунных сывороток (свободных от растворимых опухолевых антигенов) с опухолевыми антигенами, растворенными папаином. Эти комплексы оказывали блокирующее действие после инкубации с клетками-мишенями. Во всех исследованиях предполагалось, что Т-лимфоциты являлись эффекторными цитотоксичными клетками, и блокировалась именно их активность.

Как уже отмечалось, Hellström e. a. (1971, 1973) обнаружили в сыворотках у большинства больных, страдающих злокачественными новообразованиями, блокирующие факторы, в то время как в состоянии ремиссии или в результате проведенного лечения эти факторы отсутствовали. Однако не всегда имела место корреляция. Отмечены случаи, когда блокирующая активность присутствовала в сыворотках животных-носителей опухоли (Неррпег, 1969; Ankerst, 1971; Baldwin, 1973) и в периоды ремиссии у больных, пораженных меланомой (Hellström e. a., 1973), и, наоборот, блокирующие факторы не всегда обнаруживались в сыворотках больных-опухоленосителей (Hellström e. a., 1971; Byrne e. a., 1973). Нельзя исключить, что в феномене блокирования принимают участие и *Т*-лимфоциты (*Т*-супрессоры). На ранних этапах иммунного ответа клетки селезенки обладают способностью блокировать цитопатогенный эффект иммунных лимфоцитов (Klein, 1972). Феномен усиления опухолевого роста у мышей может быть получен переносом жизнеспособных *Т*-лимфоцитов, сенсибилизированных к антигену H-2^a, а не к антигену самой

опухоли (Kirkwood, Gershon, 1974). Предполагают, что гуморальные антитела, изменяя молекулярную структуру и растворимость опухолевых антигенов или комплексов антиген-антитело, побуждают *Т*-лимфоциты к осуществлению иммунодепрессивных функций, что приводит к развитию феномена усиления опухолевого роста. Наконец, были получены прямые доказательства появления у животных с прогрессивно растущими новообразованиями *Т*-клеток-супрессоров, угнетающих иммунологические реакции и способствующих усилению опухолевого роста и метастазирования (Treves e. a., 1974; Гамбаров с соавт., 1975; Khaitov e. a., 1976; Fujimoto e. a., 1976). Установлено, что у мышей-опухоленосителей *Т*-супрессоры появляются уже через 24 ч после инокуляции опухолевых клеток и определяются в течение всего времени развития новообразования (Fujimoto e. a., 1976). В период регрессии опухоли они отсутствуют (Kirchner e. a., 1974). Существенно, что наряду с *Т*-супрессорами в лимфоидной ткани мышей с прогрессивно растущими новообразованиями разной природы (спонтанные, вызванные опухолеродными вирусами и химическими канцерогенами) появляются и *В*-супрессоры, также угнетающие иммунный ответ, опосредованный *Т*-клетками на митогены и аллогенные клетки-мишени (Goroczynski, 1974; Kulburn e. a., 1974). После регрессии опухолей эти супрессоры быстро исчезают. При трансплантации различных опухолей (асцитных и солидных) происходит повышение активности супрессоров как в костном мозге, так и в селезенке сингенных мышей (Петров с соавт., 1980; Пчелинцев, 1980). Аналогичные данные были получены при химическом канцерогенезе у мышей с опухолями, вызванными метилхолантреном. В селезенке таких мышей отмечено усиление активности *Т*- и *В*-супрессоров, угнетающих антителогенез in vivo (Арипова, 1978). Показано, что опухолеспецифические супрессорные клетки могут быть активированы при иммунизации клетками селезенки от животных-опухоленосителей (Huber e. a., 1980).

Итак, можно считать доказанным, что в крови при опухолевых заболеваниях присутствует фактор (факторы), подавляющий функциональную активность лимфоцитов против опухолевых клеток in vivo. In vitro иммунные лимфоциты разрушают аутологичные клетки опухоли, однако этот эффект отсутствует при добавлении сыворотки того же больного или животного. Угнетение, по-видимому, вызывается антителами, которые защищают клетки-мишени от лимфоцитов. Последние могут быть блокированы растворимыми опухолевыми антигенами, комплексом антиген-антитело или антителами против лимфоцитов. Кроме этих сывороточных блокирующих факторов выявлена своеобразная дефектность лимфоцитов больных злокачественными новообразованиями (Wolbegr, Goelzer, 1971). Оказалось, что большинство исследованных опухолей освобождают в среду вещества, угнетающие миграцию лимфоцитов, которая у больных не влияет на миграцию лимфоцитов здоровых. Наконец, у животных-опухоленосителей имеет место

нарастание активности *Т*- и *В*-супрессоров, угнетающих иммунологическую реактивность. Вероятно, описанные в этом разделе сывороточные и клеточные факторы, блокирующие иммунный ответ на трансформированные клетки, представляют собой определенные звенья сложного механизма иммунодепрессии, всегда сопровождающей опухолевый рост.

Функции и активность Т- и В-лимфоцитов в противоопухолевом иммунитете

Выделение *Т*- и *В*-систем иммунитета, реализующих иммунный ответ, произошло в середине 60-х гг. нашего столетия. Поэтому в соответствии с современными представлениями анализ противоопухолевой реактивности должен включать разбор имеющихся данных (правда, пока еще явно недостаточных), которые характеризуют участие различных лимфоидных субпопуляций, обеспечивающих иммуногенез и его контроль при опухолевом росте. К настоящему времени мы располагаем довольно значительным экспериментальным и клиническим материалом, свидетельствующим о том, что бластоматозный процесс любой природы всегда сопровождается иммунологической недостаточностью, которая является следствием нарушения миграционной способности и дифференциации стволовых клеток, процессов миграции и кооперации *Т*- и *В*-лимфоцитов, а также, как уже отмечалось, активацией *Т*- и *В*-супрессоров (Петров, Хаитов, 1977; Петров с соавт., 1981). Перечисленные выше нарушения отдельных звеньев иммуногенеза при канцерогенезе обусловлены главным образом функциональным угнетением и уменьшением количества лимфоидных клеток (Kaibara e. a., 1970; Oren e. a., 1971; Stjernswärd e.a., 1972). Вместе с тем важно отметить, что организм в основном иммунологически реагирует на неопластически трансформированные клетки (точнее на TSTA-антигены) выработкой двух типов эффекторных клеток: *Т*-киллеров и *В*-лимфоцитов-продуцентов специфических гуморальных антител. Причем процесс антителогенеза при опухолевом росте осуществляется с помощью специфически активированных *Т*-хелперов.

На ранних этапах канцерогенеза, как правило, всегда имеет место усиленная киллерная *Т*-клеточная активность, которой принадлежит основная роль в элиминации опухолевых клеток (Baldwin, Robins, 1977; Lopez e. a., 1977; Knight e. a., 1979; Fernandez-Cruz e. a., 1980; Gabizon, Trainin, 1980). Реакция *Т*-киллеров с клетками-мишенями определяется как специфичностью и количеством TSTA-антигена, так и антигенами тканевой совместимости. В случае вирусного канцерогенеза установлено, что антигены, вовлекаемые в реакцию противоопухолевого клеточного иммунитета, относятся к системе генов H-2^D и H-2^K (Doherty, Zinkernagel, 1977). Хелперный эффект *Т*-лимфоцитов, как выяснилось, опре-

деляется геном H-2, с ним же связаны реакции на растворимый опухолевый и вирусные антигены опухолеродных вирусов. В процессе прогрессивно растущих новообразований при угнетении или отсутствии киллерного эффекта *Т*-лимфоцитов деструкция трансформированных клеток осуществляется за счет цитотоксичности, опосредованной гуморальными антителами. Этот тип цитотоксической реакции, зависимой от комплемента, во многих случаях поддерживается в организме значительно более длительное время, чем *Т*-клеточный киллерный иммунитет (Doherty, Zinkernagel, 1977; Wagner, Rollinghoff, 1977; German, 1978). Кроме того, гуморальные антитела осуществляют зависимое от них цитотоксическое действие *Т*-киллеров на опухолевые клетки (Baldwin, Robins, 1977).

На некоторых тест-системах были предприняты попытки выяснить роль *В*-системы иммунитета в экспрессии генетической резистентности к возникновению и росту новообразований. В частности, в этом отношении была исследована саркома Рауса, резистентность к которой у цыплят является доминантным признаком, регулирующимся геном, сцепленным с большим комплексом гистосовместимости. McBride e. a. (1978) изучили влияние удаления сумки Фабриция на экспрессию этого признака у двух инбредных линий цыплят, гомозиготных по различным аллелям большого комплекса гистосовместимости, но отличающихся по гену, регулирующему резистентность к вирусу Рауса. После удаления сумки Фабриция устойчивые птицы становились чувствительными к RSV. Полученные результаты не дали ответа на вопрос, связана ли резистентность с *В*-клетками или с другой популяцией, зависимой от сумки Фабриция.

На системе вируса саркомы мышей Молони M-MSV была исследована возможность осуществления цитотоксического действия высокоактивных цитотоксических *Т*-лимфоцитов через H-2-барьер. После стимуляций M-MSV иммунных к M-MuLV клеток селезенки мышей сингенными антигеннородственными клетками лейкоза Молони M-MuLV получены высокоактивные *Т*-киллеры (Collavo e. a., 1978). Цитотоксический эффект был направлен только против H-2 совместимых клеток-мишеней, обладающих TSTA-антигеном M-MSV. Вместе с тем в тесте торможения цитотоксичности холодными мишенями наблюдалась слабая, но определяемая способность аллогенных клеток лейкоза M-MuLV блокировать цитотоксическую активность *Т*-киллеров. Кроме того, при предварительной (за 14 дней) стимуляции иммунных к M-MSV клеток селезенки, инокулированных вирусом мышей аллогенными клетками лейкоза Молони, отмечен сильный цитотоксический эффект против сингенных и аллогенных опухолевых клеток, несущих на поверхности TSTA-антиген M-MSV.

Изучение ранних этапов в специфическом лизировании опухолевых клеток сенсибилизированными *Т*-лимфоцитами показало, что механизм этого цитолизиса включает адгезию цитотоксиче-

ских *T*-киллеров и клеток-мишеней, требующую ионов Mg^{2+}, но не Ca^{2+} и осуществляющуюся в течение 2 мин при 37°*C*, процесс программирования лизиса, который реализуется за 10 мин контакта *T*-киллера с клетками-мишенями и характеризуется необратимостью, зависимостью от Ca^{2+}, и финальный этап — лизис клеток-мишеней, не требующий контакта с *T*-киллером и дивалентных катионов и осуществляющийся в течение 1 ч и более (Gately e. a., 1980).

Установлено, что существенная роль в эффекторной фазе противоопухолевого иммунитета принадлежит макрофагам.

Противоопухолевая активность макрофагов

Активация макрофагов в процессе опухолевого роста относится к неспецифической защите организма от трансформированных клеток. В данном разделе освещена роль макрофагальных клеток в кооперативных взаимодействиях с *T*- и *B*-лимфоцитами при канцерогенезе.

Многочисленные факты, свидетельствующие о значительной роли макрофагов в афферентных и эфферентных реакциях по отторжению опухолей, были получены еще Gorer в 1956 г. Однако в то время эти исследования не привлекли особого внимания и даже в 60-е гг. иммунологические феномены часто рассматривали как результат взаимодействия двухклеточной системы *T*- и *B*-лимфоцитов. Принципиально новым явилось доказательство участия макрофагов в осуществлении неспецифического гомеостатического контроля над развитием опухоли (Hibbs e. a., 1972; Keller, 1973; Olivotto e. a., 1974; Mathe e. a., 1975; Mathe, Rapaport, 1976). Вместе с тем Evans и Alexander (1972) выделяют две категории макрофагов; 1) вооруженные макрофаги, проявляющие специфическую цитотоксичность по отношению к определенным клеткам-мишеням; 2) активированные макрофаги, которые токсичны к различным клеткам-мишеням. Это заключение было обосновано собственными данными авторов, свидетельствующими о том, что макрофаги, взятые от мышей, иммунизированных опухолевыми клетками, приобретают способность угнетать рост клеток этого новообразования in vitro. Этот эффект был специфичен, так как макрофаги мышей, иммунизированных аллогенными опухолевыми клетками, не оказывали действия на клетки сингенной опухоли и наоборот.

Оказалось, что макрофаги обладают способностью переносить резистентность к новообразованиям, в частности, как это было показано Harmel e. a. (1975), к саркоме, индуцированной метилхолантреном. Саркому пассировали на взрослых тимэктомированных и сублетально облученных мышах C_3H—HeN. Ежедневное внутрибрюшинное введение мышам, привитым саркомой, кополимерпирена вызывало удлинение латентного периода развития опу-

холи и снижение процента прививаемости. Макрофаги, полученные из брюшной полости мышей, инокулированных кополимерпиреном, смешанные с определенным количеством опухолевых клеток, подавляли рост опухоли при введении смеси подкожно. У интактных мышей они не оказывали ингибирующего действия. В опытах in vitro было установлено, что макрофаги резистентных мышей вызывают лизис только таких опухолевых клеток, которые находятся в непосредственной близости. Это обстоятельство указывает на контактный механизм их действия.

Исследование роли макрофагов в противоопухолевой резистентности показало также, что опухоли, богатые макрофагами, менее склонны к метастазированию, чем те, которые их не содержат или содержат в малых количествах (Birbeck, Carter, 1972; Eccles, Alexander, 1974). Спонтанная цитотоксичность макрофагов в тесте in vitro против клеток меланом и лейомиосарком человека более сильно выражена, чем цитотоксичность моноцитов (Mukherji, 1980). На многих моделях опухолевого роста отмечено повышение фагоцитарной активности и адгезивных свойств макрофагов в опытах in vivo и in vitro (Allisoh, 1978; Laurentaci, Tato, 1980). Вместе с тем выявлено и усиливающее влияние макрофагов на рост различных сингенных новообразований (Gabizon e. a., 1980). Усиливающий эффект не нарушался после облучения макрофагов в дозе 800—2000 рад и опосредовался секреторными продуктами макрофагов. Он не был связан с угнетением радиочувствительных элементов иммунной системы реципиентов и, по-видимому, являлся результатом прямой стимуляции опухолевых клеток. Активированные макрофаги, полученные из брюшной полости после внутрибрюшинного введения Corynebacterium parvum, заметно угнетали рост опухолей. В то же время макрофаги от мышей с фибросаркомой усиливали опухолевый рост и отменяли противоопухолевое действие *Т*-лимфоцитов этих мышей. Неактивированные макрофаги при определенных условиях также нарушали механизмы *Т*-клеточной противоопухолевой защиты у мышей с новообразованиями (Gabizon e. a., 1980). С другой стороны, во многих работах было установлено, что неиммунные макрофаги могут стать специфически цитотоксическими по отношению к опухолевым клеткам после инкубации с иммунными лимфоидными клетками или с бесклеточной надосадочной жидкостью культуры иммунных лимфоидных клеток со специфичными опухолевыми клетками (Evans e. a., 1972; Van Loveren e. a., 1974). Полагают, что специфическая цитотоксичность вооруженных макрофагов объясняется их способностью связывать цитофильные антитела.

На разных тест-системах было показано, что макрофаги, изолированные из регрессирующих опухолей, при культивировании их in vitro выделяют в среду растворимый, диализируемый и термостабильный фактор, угнетающий включение тимидина в клетке. Иными словами, проведенные эксперименты позволяют предпола-

гать, что и этот фактор обладает эффективным противоопухолевым действием (Una, 1976; Russel e. a., 1977).

Наконец, во многих работах установлено прямое участие макрофагов в кооперативном ответе *Т*- и *В*-лимфоцитов при канцерогенезе. Показано, например, что предшественники *Т*-киллеров не пролиферируют и не дифференцируются в эффекторные клетки в отсутствие макрофагов (Igrashi e. a., 1977). Без соответствующих монокинов, продуцируемых макрофагами, не происходит дифференцировки *В*-лимфоцитов в плазматические эффекторные клетки, синтезирующие специфические антитела (Watson, 1975). Вместе с тем следует отметить, что изменения в лимфоидных клетках под влиянием медиатора могут иметь разные последствия (активация или супрессия) не только в зависимости от природы медиатора, но и от физиологического состояния клетки, на которую действует сигнал. Особенно наглядно это проявляется при бластоматозном процессе в течение прогрессивного роста опухоли, когда макрофаги наряду с другими лимфоидными клетками усиливают опухолевый рост и отменяют противоопухолевое действие *Т*-лимфоцитов (Gabizon e. a., 1980).

Итак, активированные макрофаги могут осуществлять различные прямые (в том числе и цитотоксические) и регулирующие эффекты, а также, как было установлено, играть большую роль в регуляции активности естественных киллеров при опухолевом росте (Santoni e. a., 1980).

Естественные киллеры и канцерогенез

Естественная невосприимчивость к неопластически трансформированным клеткам определяется суммой врожденных неспецифических защитных механизмов, среди которых центральное место занимают лимфоидные клетки, не несущие типичных маркеров *Т*- и *В*-клеток. Первые сообщения о таких клетках, обладающих способностью оказывать цитотоксическое действие без предварительной специфической стимуляции (сенсибилизации), появились в начале 70-х гг. Fröland и Natvig (1973) обнаружили в периферической крови человека 14,5% лимфоцитов, не имеющих маркеров *Т*- и *В*-клеток и обладающих комплементнезависимой цитотоксичностью по отношению к клеткам-мишеням, покрытым специфическими антителами. Greenberg (1973) назвал эти лимфоидные клетки нуль-лимфоцитами (*О*-лимфоциты). Затем были охарактеризованы *Т*- и *К*-лимфоциты, обладающие подобными свойствами (McLennan, 1974; Horwitz, Lobo, 1975). И, наконец, были описаны естественные (или нормальные) лимфоидные клетки-киллеры (NK-клетки — natural Killer cells), также лишенные мембранных рецепторов *Т*- и *В*-клеток, но в отличие от *К*-лимфоцитов осуществляющие цитотоксичность в отсутствие специфических антител (Cooper e. a., 1977; Trinchieri e. a., 1977; Welsh,

1978). В данном разделе в основном приведены сведения относительно роли лимфоидных клеток, не имеющих маркеров *Т*- и *В*-лимфоцитов, в противоопухолевой резистентности, более же подробные характеристики этих клеток можно найти в обзорах Б. Т. Билынского, Я. В. Шпарика (1980) и Р. В. Петрова с соавт. (1980).

О-лимфоциты представляют собой популяцию медленно делящихся лимфоидных клеток, отличных от эритроидных, гранулоцитарных и моноцитарных клеточных линий, которые не обладают фагоцитарной способностью и не прилипают к стеклу (Stobo e. a., 1973; Parish, 1975). Получены факты, свидетельствующие о том, что, вероятно, среди *О*-лимфоцитов имеются предшественники *Т*- и *В*-лимфоцитов (Ryser, Vassalli, 1974; Brier e. a., 1975; Chess e. a., 1975, 1976; Chiao e. a., 1978; Hokland e. a., 1978; Kaplan, 1978). Предполагают, что *В*-лимфоциты костного мозга происходят из *О*-лимфоцитов. Вместе с тем *В*-клетки периферических лимфоидных органов отличаются от *О*-лимфоцитов тем, что последние не содержат на мембране C_3-рецептор (или же плотность этого рецептора очень низкая), имеют на поверхности легкие (вместо тяжелых) цепи иммуноглобулинов и различаются по ответу на липополисахарид. Высказываются предположения, что часть популяции *О*-лимфоцитов является незрелой формой *В*-лимфоцитов, на ранней стадии дифференцировки несущих на мембране Fc-рецепторы, но не имеющих иммуноглобулинов и обладающих антителозависимой цитотоксической активностью (Haegert, 1978). На промежуточной стадии дифференцировки такие клетки содержат на мембране иммуноглобулины и также обладают антителозависимой цитотоксичностью. На последней стадии созревания *В*-лимфоциты сохраняют иммуноглобулины, но утрачивают антителозависимую цитотоксическую активность. Правда, наряду с этим не исключается возможность дифференцировки *О*-лимфоцитов в субпопуляцию *В*-лимфоцитов, для которых характерна высокая антителозависимая цитотоксичность и присутствие на мембранах высокой плотности иммуноглобулиновых детерминант (Brier e. a., 1975).

Установлено, что *О*-лимфоциты человека синтезируют нерастворимый макромолекулярный холодовой глобулин с молекулярной массой 185 000 дальтон, сходный по физическим свойствам с таким же белком *Т*-клеток, однако отличающийся от него по антигенным свойствам. Hauptman e. a. (1979) считают, что обнаруженный глобулин является новым маркером *О*-лимфоцитов человека.

Таким образом, популяция *О*-лимфоцитов неоднородна, а функции их, как показано, весьма разнообразны. Они отвечают на антигенную и митогенную стимуляции, выполняют функции отвечающих субпопуляций в смешанной культуре, а часть из них представляет собой эффекторные клетки в антителозависимой цитотоксичности (Caraux e. a., 1978; Hokland e. a., 1978). Кроме того,

установлено, что 5% периферических *О*-лимфоцитов в крови человека обладают как антителозависимой, так и естественной киллерной активностью (Ozer e. a., 1979). Эта популяция *О*-лимфоцитов не содержит на мембране иммуноглобулинов, Ia-подобного антигена и рецептора для эритроцитов барана. Получены данные, указывающие на то, что клетки, опосредующие естественную и антителозависимую цитотоксичности, не экспрессируют на мембране антиген HLA-DR и, вероятно, не относятся к *В*-лимфоцитам (Ng Ah-Kau e. a., 1980).

В периферической крови человека выявлено около 20% L-лимфоцитов (labile receptor — лабильный рецептор), также не несущих маркетов *Т*- и *В*-клеток (Horwitz, Lobo, 1975). Для этой популяции характерно присутствие на мембране высокоавидных трипсинрезистентных Fc-рецепторов для связывания иммуноглобулинов IgG нормальной сыворотки человека и морской свинки при 4°*С*. При повышении температуры до 37°*С* происходит потеря L-клеткой рецептора (освобождение в среду), отсюда и возникло название L-лимфоциты.

Предполагают, что L-клетки представляют собой самостоятельную гемопоэтическую линию, которая, очевидно, занимает промежуточное положение между лимфоцитами и моноцитами, поскольку по особенностям строения ядра они сходны с моноцитами, а по электронно-микроскопической характеристике — с лимфоцитами (Horwitz, Sarrett, 1977; Horwitz e. a., 1978). Выделяют две субпопуляции L-лимфоцитов: первая характеризуется низкой плотностью Ia-антигена на мембране $Fc^+Ia^+M^-$, вторая содержит миелоидный M-антиген, обнаруживаемый антимиелоидной сывороткой $Fc^+Ia^-M^+$. Главным образом выявляется небольшое число L-клеток, несущих оба антигена $Fc^+Ia^+M^+$. L-лимфоциты обладают выраженной антителозависимой клеточной цитотоксической активностью, которая, вероятно, играет определенную роль в противоопухолевом иммунитете.

К-лимфоциты (killer cells — клетки-киллеры), обладающие цитотоксической активностью в отсутствие комплемента без сенсибилизации (от интактных животных) в отношении клеток-мишеней, покрытых специфическими антителами, морфологически представляют собой малые и средние лимфоциты (Wisloff e. a., 1974; Calder e. a., 1974; Hieschberg e. a., 1975; Ström e. a., 1975). Им не свойственна фагоцитарная активность и они не прилипают к нейлоновой вате и стеклу. Природа этой гемопоэтической линии не установлена, поэтому пока преждевременно говорить о какой-то особой популяции этих лимфоидных клеток. Предполагают, что они также могут быть отнесены к еще неидентифицированным предшественникам *Т*- или *В*-клеток. Некоторые авторы отождествляют их с *О*-лимфоцитами. Нельзя исключить, что *К*-лимфоциты представляют собой гетерогенную популяцию с высокой плотностью на мембране Fc-рецепторов (Wisloff e. a., 1974; Brier e. a., 1975; Oers e. a., 1977). Цитотоксичность *К*-лимфоцитов

очень высока — одна клетка может лизировать не менее десяти клеток-мишеней (Брондз, Рохлин, 1978). Антителозависимая клеточная цитотоксичность, осуществляемая *К*-клетками, зависит от многих факторов и требует непосредственного контакта эффекторных *К*-клеток с клетками-мишенями (Perlmann, McLennan, 1974; Gelfand e. a., 1975; Strom e. a., 1975; Isturiz, Gardoni, 1977; Shore e. a., 1977; Kalmar e. a., 1978; McLennan, 1978).

К-лимфоциты обнаружены у мышей, крыс, кроликов, морских свинок и человека. Они, очевидно, выполняют существенную роль в поддержании постоянства внутренней среды животных и человека, оказывая антителозависимую цитотоксичность против различных чужеродных клеток (аллогенные и аутологичные лимфоциты, ксеногенные эритроциты и т. д.), в том числе и опухолевых. Причем у больных с опухолями разной локализации интенсивность антителозависимой клеточной цитотоксичности значительно больше, чем у здоровых лиц (Брондз, Рохлин, 1978; Guttierrez, 1978).

Естественные киллеры, или NK-лимфоциты, разрушающие нативные, не покрытые антителами нормальные и опухолевые клетки, были обнаружены у кур, мышей, крыс, морских свинок, кошек, свиней, лошадей и человека. NK-клетки, как было показано во многих работах, лизируют опухолевые клетки различных новообразований (меланом, тимом, мастоцитом, плоскоклеточного рака и т. д.). Особенно чувствительны к их разрушающему действию неопластические клетки гемопоэтического происхождения (Wolf e. a.. 1976; Cannon e. a., 1977; Grohman e. a., 1978; Menon, Stefani, 1978; Potter, Moare, 1978; Hershey, 1979; Barada e. a., 1980; Eremin e. a., 1980; Stern e. a., 1980). Активность NK-лимфоцитов в селезенке мышей-носителей опухолей снижена по сравнению с контрольными животными (Gerson e. a., 1980), кроме того, в опухолях in situ она аналогична активности в селезенке мышей-опухоленосителей. Добавление интерферона и удаление прилипающих лимфоидных клеток из взвеси клеток опухолей приводило к усилению активности NK-лимфоцитов.

Получены данные, указывающие на то, что взаимодействия между NK-лимфоцитами и клетками-мишенями, зараженными вирусами, в том числе и опухолеродными, чрезвычайно сложны и в каждом конкретном случае зависят от природы клеток-мишеней и вируса, а также от степени инфицирования (Welsh, Hallenbeck, 1980). Stern e. a. (1980) исследовали способность естественных клеток-киллеров (использовали клетки селезенки) в деструкции клеток эмбриокарциномы мышей, лишенных продуктов главного комплекса гистосовместимости. NK-клетки эффективно лизировали клетки эмбриокарциномы (линии PSMB, OCI5SI, Nulli-SCCI, PCI3); дифференцированные эндодермальные клетки мышей либо хуже лизировались (линии OCI5SI—END и PSA5E), либо были полностью резистентны к лизису (линии PYS-2 и F9.AC.9). Лизис чувствительных клеток-мишеней не устранялся адсорбцией клеток селезенки на нейлоновой вате или обработкой их одним

комплементом либо в сочетании с антисывороткой к Thy-1. Показана способность NK-лимфоцитов прикрепляться к монослою клеток эмбриокарциномы. Авторы считают, что, поскольку на клетках мышиной эмбриокарциномы отсутствуют антигенные продукты главного комплекса гистосовместимости, они являются удобными мишенями для дифференцировки естественной киллерной активности, опосредованной NK-лимфоцитами, от *T*-клеточного опосредованного лизиса. В серии работ была изучена связь между естественной цитотоксичностью и киллерной функцией активированных лимфоцитов. Анализ исследованных цитотоксичностей показал, что активированный киллерный эффект связан с *T*-лимфоцитами и не обусловлен NK-клетками, вызывающими естественную цитотоксичность. Обе цитотоксичности генерируются самостоятельно in vitro (Masucci e. a., 1980).

Оказалось, что бестимусные мыши nude (безволосые) обладают наиболее высоким уровнем естественных клеток-киллеров, причем у самцов они более активны, чем у самок (Welsh, 1978). Наибольшее количество NK-лимфоцитов, как и *K*-клеток, определяется в селезенке и периферической крови, в то время как в лимфатических узлах и костном мозге они находятся в незначительном количестве, а в тимусе и грудном протоке практически отсутствуют (Glimcher e. a., 1977; Altman, Rapp, 1978; Haller e. a., 1978; Potter, Moore, 1978; Eremin e. a., 1980). NK-лимфоциты не фагоцитируют, не прилипают к стеклу, пластику и нейлоновой вате. Вместе с тем выявлена субпопуляция NK-клеток, которые в отличие от типичных клеток этого типа прилипают к нейлоновой вате и могут неспецифически лизировать любые неопластически трансформированные клетки (Kall, Koren, 1978; Roder, Kiessling, 1978; Barada e. a., 1980). Цитотоксический эффект NK-лимфоцитов не зависит от числа моноцитов, а в некоторых случаях даже снижается в их присутствии (Levy e. a., 1978; Santoli e. a., 1978). Однако имеются исследования, в которых, наоборот, отмечена максимальная активность NK-клеток при добавлении моноцитов (De Vries e. a., 1978). Показано, что активированные макрофаги играют большую роль в регуляции активности NK-лимфоцитов (Santoni e. a., 1980).

Обнаружена регуляция естественной киллерной активности NK-лимфоцитов с помощью интерферона. Minato e. a. (1980) установили, что клетки селезенки мышей nude способны вырабатывать интерферон и обладают естественной киллерной активностью по отношению к инфицируемым персистирующими вирусами опухолевым клеткам, но не к неинфицированным клеткам родителей in vitro. Показано, что клетки, выделяющие интерферон и обладающие такой активностью, представлены одним и тем же фенотипом $Qa5^+$, $Ly5^+$ и несут ганглио-N-тетраозилцерамид. 35% клеток указанного фенотипа, обладающих естественной цитотоксичностью, экспрессируют на мембране антиген Ly 1,2. Естественная киллерная активность против зараженных вирусами опухо-

левых линий клеток неспецифически усиливается in vitro и in vivo при предварительном контакте с инфицированными вирусом опухолевыми клетками. Причем в усилении этой активности принимает участие химически гомогенный интерферон. Оказалось, что клетки-мишени для действия интерферона серологически отличаются от клеток, обладающих естественной киллерной активностью. Обработка клеток селезенки антисывороткой к антигену Ly5 и комплементом приводила к утрате естественной цитотоксичности и способности вырабатывать интерферон. Однако при инкубации с интерфероном в течение 1—3 ч как естественная цитотоксичность, так и чувствительность к обработке антисывороткой к антигену Ly5 и комплементом восстанавливались. Обработка спленоцитов антисывороткой к антигену Qa5 и комплементом снимала естественную киллерную активность, которая не восстанавливалась при добавлении экзогенного интерферона. Авторы приходят к заключению, что интерферон продуцируется клетками фенотипа $Ly5^+$ при ответе к зараженным вирусами опухолевым клеткам и действует на клетки-предшественники этого фенотипа, вызывая их дифференцировку в эффекторные клетки фенотипа $Ly5^+$, обладающие естественной киллерной активностью. Предполагают также, что интерферон может действовать опосредовано, индуцируя выделение лимфокинов, которые в свою очередь активируют NK-лимфоциты. Таким образом, все агенты, индуцирующие продукцию интерферона, способствуют усилению естественной киллерной активности.

NK-лимфоциты человека, так же как и *K*-клетки, имеют на мембранах высокую плотность Fc-рецептора для IgG. Удаление лимфоцитов, содержащих этот рецептор, или же его блокада агрегированным IgG всегда приводит к исчезновению естественной цитотоксичности (Jondal, Pross, 1975; Waller e. a., 1976; Muchmore e. a., 1977; Parrillo, Fauci, 1978). Считают, что специфичность действия NK-лимфоцитов обусловливается по меньшей мере двумя факторами: наличием на их мембране NK-рецепторов к определенным клеткам-мишеням и специфичностью естественных антител IgG, связываемых Fc-рецепторами (Takasugi e. a., 1977). Следовательно, NK- и *K*-лимфоциты, по-видимому, представляют собой различные субпопуляции, одна из которых содержит NK- и Fc-рецепторы, а вторая — только Fc-рецептор. Однако нельзя исключить, что NK- и *K*-лимфоциты — это различные стадии дифференцировки лимфоидных клеток одного типа (Koren, Williams, 1978). Таким образом, природа NK-лимфоцитов до сих пор не изучена. Имеющийся фактический материал позволяет предполагать, что NK-клетки не принадлежат к зрелым *T*- и *B*-лимфоцитам, макрофагам, моноцитам и гранулоцитам, а представляют, по-видимому, самостоятельную линию мононуклеарных клеток, независимую от тимуса (Haller e. a., 1978; Roder, Kiessling, 1978).

Среди NK-клеток различают эндогенные естественные килле-

ры, присутствующие у мышей в норме в небольшом количестве, и индуцированные, которые появляются после стимуляции интерфероном (Welsh, 1978). Специфичность и проявление эндогенных NK-лимфоцитов генетически предетерминированы уровнем костномозговых клеток-предшественников. Степень чувствительности к эндогенным и индуцированным NK-клеткам разных клеточных линий неодинакова. Однако установлено, что вследствие индукции in vivo естественные киллеры мышей приобретают способность лизировать большое число исследованных клеточных линий независимо от их чувствительности к эндогенным NK-лимфоцитам. Показано, что индуцированные NK-клетки экспрессируют на мембранах больше *Q*-антигена, чем эндогенные. Чувствительность к лизису, вероятнее всего, связана с локальным повышением уровня интерферона или с изменением мембраны и не коррелирует с генами главного комплекса гистосовместимости. Следует отметить, что NK-лимфоциты некоторых линий мышей способны лизировать сингенные клетки-мишени, что может играть, как считают, определенную роль в аутоиммунных процессах.

Развитие, активность и функционирование NK-клеток осуществляются полигенным контролем. Гены эти наследуются по доминантному типу и один из локусов сцеплен с генами H-2 (основного комплекса гистосовместимости). Вместе с тем в популяции нетипичных NK-лимфоцитов, неспецифически прилипающих к нейлоновой вате, не обнаружено генетического контроля (Roder, Kiessling, 1978). Поскольку NK-клетки обладают способностью оказывать цитотоксическое действие против клеток родительского генотипа, считают, что активность их тесно связана с функционированием клеток, ответственных за проявление аллогенной ингибиции и контролируемых генами гемопоэтической гистосовместимости — Hh-генами (Lotzova, Savary, 1977; Savary, Lotzova, 1978; Welsh, 1978). Кроме того, выявлена связь NK-лимфоцитов с M-клетками, опосредующими генетически детерминированную резистентность мышей к воздействию вируса Френд на гемо- и иммунопоэз, которые также контролируются Hh-генами (Welsh, 1978).

Итак, на основании имеющегося экспериментального материала можно предполагать, что спонтанная клеточная цитотоксичность представляет собой весьма эффективную автономную, сильно реагирующую защитную систему, которая может распознавать широкий спектр детерминант и в силу этого, вероятно, осуществлять контроль за возникновением главным образом спонтанных моноклональных новообразований. О значительной роли естественных клеток-киллеров в противоопухолевой защите свидетельствуют следующие факты: 1) низкая частота спонтанных опухолей у бестимусных мышей, а также у мышей с высоким содержанием *K*-лимфоцитов; 2) выявлена прямая корреляция между активностью естественных киллеров in vivo и резистентностью к индукции бластоматозного процесса; 3) мыши с высоким со-

держанием NK-лимфоцитов более резистентны к сингенной лимфоме; 4) стимуляция активности NK-лимфоцитов интерфероном или другими агентами усиливает противоопухолевую резистентность; 5) мыши с блокированными облучением *Т*- и *В*-системами иммунитета, но сохраненной активностью NK-лимфоцитов резистентны к трансплантации опухолевых клеток; 6) противоопухолевая резистентность у мышей с полностью блокированной системой иммунитета восстанавливается костным мозгом, обработанным анти-Q-сывороткой, от мышей с высокой активностью *К*-клеток; кроме того, в клинике в процессе лечения интерфероном отмечены ремиссии у больных с лимфомами, что связано с повышением активности NK-лимфоцитов (Welsh, 1978).

Считают, что естественные клетки-киллеры, лимфоидные клетки, которые не несут маркетов *Т*- и *В*-лимфоцитов, обеспечивающие комплементзависимое цитотоксическое действие, а также макрофаги являются первым неспецифическим звеном противоопухолевой защиты. Эта система играет важную роль в иммунологическом надзоре, осуществляя в основном распознавание и элиминацию очень малых (а иногда и единичных) количеств неопластически трансформированных клеток.

Вероятно, одновременно начинает функционировать и специфическая противоопухолевая защита, вырабатывающая антитела и *Т*-лимфоциты на специфический трансплантационный опухолевый антиген. Эта система способна отторгать уже большие количества опухолевых клеток. Иными словами, эти две системы значительно дополняют друг друга, поскольку первая распознает и уничтожает субпороговые количества неопластических клеток, а вторая элиминирует относительно большие количества клеток новообразований. Кроме того, они, по-видимому, не только дополняют, но и зависят друг от друга, так как показано, что появление даже небольших количеств специфических антител, например, обеспечивает условия для цитотоксического действия *К*-лимфоцитов. Предполагают даже, что при подавлении системы естественной резистентности не функционирует и система специфического противоопухолевого иммунитета. Важно отметить, что NK-лимфоциты появляются у мышей только на 3—4-й неделе жизни, то есть, собственно, тогда, когда заканчивается интенсивная пролиферация клеток, обусловленная ростом организма. Следовательно, в период наиболее возможного появления неопластически трансформированных клеток эффекторные клетки, которые, как считают, играют основную роль в иммунологическом надзоре, отсутствуют. Исходя из этого Р. В. Петров с соавт. (1981) постулируют существование какого-то пока неизвестного механизма иммунологического надзора, впоследствии передающего свои функции NK-лимфоцитам.

Глава IV

КАНЦЕРОГЕНЕЗ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ГОМЕОСТАЗИС

Трансформация in vitro дает возможность на генетически однородной популяции клеток (в случае клонированных линий) количественно в стандартных условиях (доза вируса, число клеток, условия культивирования и др.) изучать последовательные этапы опухолевого превращения клеток. Трансформация in vivo позволяет исследовать другие не менее важные аспекты вирусного, химического и лучевого канцерогенеза — функциональные взаимоотношения между злокачественно измененной клеткой, точнее, между антигенной конверсией, возникающей в онкогенезе, и иммунокомпетентной системой организма.

Основные этапы вирусного и любого другого канцерогенеза включают следующие узловые моменты: 1) трансформацию нормальных клеток в опухолевые, наследственно передающуюся последующим популяциям клеток; 2) размножение трансформированных клеток, приводящее к образованию опухоли: злокачественно измененные клетки не всегда могут размножаться в организме и иногда подавляются иммунологическими механизмами; 3) прогрессию, то есть развитие опухоли путем устойчивых необратимых качественных изменений одного или нескольких признаков. Общеизвестно, что бластоматозный процесс представляет собой весьма динамичную систему. Формирование опухолевого узла, с одной стороны, зависит от способности самой опухоли «обеспечивать» свой рост (инвазия, метастазирование и т. д.), а с другой — от убивающей опухолевые клетки активности организма, которая обусловливается многими факторами, включая иммунокомпетенцию. Вероятно, наряду с перестройкой функционирования клеточного генома и в случае вирусного онкогенеза внесением опухолеродным вирусом дополнительной генетической информации главными механизмами, определяющими антигенный профиль трансформированной клетки, являются клеточные факторы иммунной системы, обеспечивающие генетическое постоянство индивидуума и поэтому несущие доминирующую часть нагрузки в защите организма от неопластической трансформации (естественно, остальная доля участия в этом процессе ложится

на гуморальный компонент противоопухолевого иммунитета). При этом большое значение имеет естественная резистентность (см. гл. III). Помимо постоянного иммунологического «пресса» на ту или иную популяцию трансформированных клеток, по-видимому, немаловажная, а может быть, определяющая роль принадлежит созданию селективных преимуществ для какой-либо трансформированной популяции клеток по типу иммунологической стимуляции. Наконец, при онкогенезе может возникать аутоиммунная реакция.

Представления о дефектности противоопухолевого иммунитета до настоящего времени в основном базировались на экспериментальном и клиническом материале. Полученные данные свидетельствуют о том, что размножение трансформированных клеток в организме обусловливается ослаблением, нарушением и извращением иммунологической реактивности (иммунного надзора) вследствие количественной недостаточности и качественной разнонаправленности клеточного и гуморального компонентов иммунной реакции, иммунодепрессии, иммунологического паралича, толерантности, то есть иммунной «блокады», а также функционирования блокирующих факторов (Агеенко, 1974, 1975; Городилова, 1974, 1975; Уманский, 1974, 1975; Говалло, 1977; Боева, Городилова, 1979).

Антигенная трансформация и ее роль в канцерогенезе

Анализ многочисленных исследований антигенных изменений в динамике, которые претерпевают ткани-мишени (по сравнению с гомологичными или нормальными тканями), показал, что с помощью такого подхода не может быть решен вопрос о роли этих белковых сдвигов в канцерогенезе. Поэтому принципиально важной является разработка новых методических приемов, которые бы способствовали накоплению информации в данном направлении. Прежде всего важно выявить функциональную связь между опухолеассоциированными антигенами трансформированных клеток и приобретением ими селективных преимуществ по типу иммунологического усиления роста.

Эмбриональные антигены

Известно, что на плазматических поверхностных мембранах трансформированных клеток находятся вирусиндуцированные и эмбриональные антигены, способные вызывать иммунологическую реакцию в аутосистеме. Вместе с тем роль эмбриональных антигенов, которые постоянно экспрессируются в опухолевых тканях различной природы и гистологического строения, в том числе и на поверхности неопластически измененных онковирусом клеток,

до сих пор окончательно не ясна. Дело в том, что иммунизация опухолевой эмбриональной тканью на ранних этапах канцерогенеза приводит к неоднозначным результатам в отношении опухолеобразования и роста трансформированных клеток. В одних случаях наблюдается блокирование развития бластоматозного процесса, в других — подобный эффект не был получен.

В связи с этим А. И. Агеенко и В. С. Ерхов (1976) исследовали возможность функционирования эмбриональных антигенов в качестве трансплантационных в сингенной системе, а также их способность вызывать иммунологическую реакцию в аутосистеме. Полученные данные показали, что на 7-й день иммунизации клетками сингенной первичной саркомы, индуцированной аденовирусом обезьян SA7 (C8), в селезенке мышей линии CBA накопились спленоциты, вызывающие лизис эмбриональных фибробластов и опухолевых клеток. Следовательно, клетки сарком SA7 (C8) содержат эмбриональный антиген, экспрессированный на поверхности эмбриональных фибробластов (на 14—16-й день беременности подопытных животных).

Если справедливо предположение о том, что опухолеассоциированный поверхностный трансплантационный антиген является эмбриональным, то адсорбция иммунных клеток селезенки на монослое эмбриональных фибробластов должна вызывать как минимум снижение их цитотоксической активности в отношении опухолевых клеток. Действительно, адсорбция на монослое фибробластов эмбриона приводила к истощению их цитотоксической активности в отношении эмбриональных фибробластов, но не опухолевых клеток, индуцированных вирусов SA7 (C8). Таким образом, антигены, присутствующие на поверхности данных фибробластов, при сингенной иммунизации могут выступать в качестве трансплантационных, представленных на поверхности опухолевых клеток сарком. В то же время опухолевые клетки на своих мембранах содержат антигены, отсутствующие на фибробластах эмбриона. Этот факт согласуется с данными Baldwin (1974), показавшим, что иммунизация сингенными клетками сарком, индуцированных метилхолантреном, вызывает повышение уровня клеточных факторов, иммунных к эмбриональным фибробластам. Введение животным, находящимся в латентном периоде химического канцерогенеза, лимфоцитов, иммунных к эмбриональным фибробластам, или же лимфоидных клеток многократно беременных мышей не снижало опухолеобразования.

В проведенных нами исследованиях в селезенке мышей линии CBA ранних сроков латентного периода канцерогенеза не удалось выявить лимфоцитов, разрушающих эмбриональные фибробласты, хотя они оказывали цитотоксическое действие на опухолевые клетки. Эти факты, по-видимому, еще раз подчеркивают различие опухолеассоциированного трансплантационного и эмбрионального антигенов, а также позволяют предполагать, что в аутосистеме имеются механизмы, блокирующие цитотоксическую ре-

акцию на эмбриональные антигены. Результаты, полученные в опыте на системе мыши линии СВА + аденовирус SA7 (C8), указывают на различную природу эмбрионального и опухолеассоциированного трансплантационного антигенов, что согласуется с выводами других авторов (Baldwin, 1974; Hellström, Hellstrom, 1975; Tevethia, Tevethia, 1975). Вместе с тем нельзя исключить, что опухолеассоциированный трансплантационный антиген, индуцированный вирусом SA7 (C8), является вирусспецифическим трансплантационным опухолевым антигеном TSTA, содержащим эмбриональные детерминанты.

Итак, на поверхности опухолевых клеток находятся как минимум две группы антигенов, одна из которых представлена эмбриональными антигенами, способными вызывать иммунный ответ в сингенной системе.

Толерантность, аутоиммунные реакции и канцерогенез

В следующей серии экспериментов А. И. Агеенко и В. С. Ерхов (1976) предприняли попытку выяснить, имеется ли специфическая клеточная реакция отторжения в аутосистеме, направленная на эмбриональные антигены.

Известно, что, с одной стороны, утрата толерантности и аутоиммунитет являются частыми, если не постоянными, компонентами канцерогенеза, а с другой — мыши (линий NZB, NZW) и их гибриды, представляющие собой модели аутоиммунитета, отличаются высокой частотой опухолеобразования. Если предположить, что исход взаимодействия иммунный лимфоцит—клетка-мишень неоднозначен, то вполне логично использовать в качестве доказательства о наличии специфических иммунных лимфоцитов к антигенам эмбриональных клеток высокую специфичность первой фазы иммунологического взаимодействия — распознавание и адсорбцию. Такой принцип обнаружения иммунных лимфоцитов тем более обоснован, если учесть, что ситуация, при которой происходит адсорбция иммунных лимфоцитов или гуморальных антител без каких-либо других эффектов, является обычной для определенных антигенов.

С помощью адсорбционного теста с ^{51}Cr авторы показали, что у мышей линии СВА на 20—30-й день латентного периода в селезенке накапливаются иммунные спленоциты к антигенам эмбриональных фибробластов. У мышей линии $C_{57}BL/6$, нечувствительных к онкогенезу, индуцированному аденовирусом SA7 (C8), подобные клетки в селезенке отсутствуют. Эти данные не полностью согласуются с представлениями о том, что противоопухолевая резистентность обусловлена иммунологической реакцией на эмбриональные антигены. Такие результаты могут иметь несколько объяснений. Во-первых, они позволяют предположить, что обнаруженные иммунные спленоциты не вызывают реакцию оттор-

жения в системе in vivo. Во-вторых, резистентность мышей $C_{57}BL/6$ к онкогенезу, индуцированному вирусом SA7 (C8), обусловлена неиммунологическими механизмами.

Выявлено, что иммунные спленоциты не оказывают цитотоксического действия на эмбриональные фибробласты в системе in vitro (по тесту высвобождения ^{51}Cr из фибробластов эмбриона мыши). Вместе с тем следует отметить, что исход взаимодействия поверхностных мембран клетки-мишени с иммунными лимфоцитами определяется несколькими обстоятельствами, в частности, концентрацией и распределением антигена на поверхностной мембране клетки. Соотношения этих факторов могут быть различными у эмбриональных и опухолевых клеток. Следовательно, неспособность иммунных клеток селезенки, накапливающихся в латентном периоде вирусного канцерогенеза, вызывать разрушения эмбриональных фибробластов in vitro не отвергает возможности их цитотоксического действия на клетки опухоли in vivo. Кроме того, полученные данные дают возможность предполагать, что существует связь между способностью онковируса индуцировать канцерогенез и отменять толерантность к эмбриональным антигенам.

К настоящему времени накопилось достаточно фактов, позволяющих рассматривать иммунологическую толерантность в качестве активного феномена, опосредуемого определенной популяцией *T*- и *B*-клеток (Benjamin, 1975; Cantor e. a., 1976). С этой позиции утрату толерантности к нормальным антигенам, отмеченную в системе мышей линии СВА + аденовирус SA7 (C8), можно объяснить накоплением определенных (в частности, эмбриональных) антигенов в результате преимущественной пролиферации клеток, продуцирующих в большом количестве данный антиген, и (или) прямым действием вируса на популяцию клеток-супрессоров, в физиологических условиях блокирующих размножение соответствующего клона иммунокомпетентных клеток.

Следует ожидать, что одним из проявлений снятия супрессорной функции может быть усиление пролиферативной активности определенной популяции лимфоидных клеток. Для расшифровки механизма возникающей иммунной реакции А. И. Агеенко и В. С. Ерхов (1976) предложили вводить лимфоидные клетки животных, находящихся на разных этапах канцерогенеза, новорожденным сингенным мышам. Понятно, что наличие стимулированных клеток в трансплантате проявится в усилении пролиферативной активности клеток селезенки и в конечном итоге в увеличении селезеночного индекса (отношение массы селезенки к массе данного животного).

Действительно, перенос новорожденным сингенным реципиентам клеток селезенки от мышей, находящихся на 25-м дне латентного периода канцерогенеза, индуцированного аденовирусом SA7 (C8), приводит к значительному изменению массы лимфоидных органов реципиентов. Кроме того, у этих животных увеличивается селезеночный индекс (5,64 вместо 3,72 в контроле,

$P<0,05$). При введении спленоцитов от нормальных 25-дневных животных этот показатель не изменяется ($3,7\pm0,3$; $3,72\pm0,4$).

Вероятно, наблюдаемое различие в эффектах переноса спленоцитов от разных групп животных связано с различной пролиферативной потенцией перенесенных клеток. Так, к 25-му дню латентного периода канцерогенеза в селезенках мышей линии СВА появляется популяция лимфоидных клеток с повышенной пролиферативной активностью. Это подтверждается и тем фактом, что у животных в этом периоде также наблюдается повышенный селезеночный индекс. По-видимому, усиленные пролиферативные потенции данных клеток сохраняются при переносе нормальным сингенным реципиентам.

Одним из общих результатов взаимодействия онковируса и клетки является стимуляция синтеза клеточной ДНК и митотической активности, и, возможно, именно этим обусловлен феномен увеличения селезеночного индекса. В то же время, учитывая, что к 25-му дню латентного периода канцерогенеза в селезенках мышей линии СВА появляются клетки, специфически адсорбирующиеся на монослое сингенных эмбриональных фибробластов, изменение массы лимфоидных органов можно объяснить иммунологическими механизмами. В пользу такого предположения свидетельствуют некоторые черты наблюдаемого феномена, сближающего его с реакцией «трансплантат против хозяина». Кроме того, увеличение селезеночного индекса сопровождается прогрессивным снижением тимусного, причем сумма этих двух показателей является постоянной величиной. Создается впечатление, что в системе мыши линии СВА + аденовирус SA7 (C8) происходит «перераспределение» активностей тимуса и селезенки.

Итак, полученные данные свидетельствуют о том, что уже в ранние сроки онкогенеза в ауто- и сингенной системах формируется иммунная реакция, вызванная, очевидно, прямым действием онковируса на иммунокомпетентную систему.

Вероятно, мишенью действия онковируса, «запускающего» аутоиммунную реакцию, является популяция клеток-супрессоров, осуществляющих иммунологический гомеостазис. Предполагают, что созревание основной популяции таких клеток происходит в тимусе. Стимуляция *Т*-супрессоров обусловливает развитие толерантности, а угнетение — аутоиммунные расстройства. Наиболее вероятная причина нарушения иммунодепрессивной функции *Т*-клеток — это, по-видимому, нарушение самого процесса их дифференциации в тимусе из-за повреждения его тканей онковирусом, в результате которого и происходит прогрессивное снижение тимусного индекса. Нельзя исключить также, что депрессивный эффект клеток-супрессоров может сниматься вследствие изменения количественных соотношений клеток-хелперов и клеток-супрессоров, специфических в отношении антигенов, индуцированных онковирусом. На вероятность существования такого механизма указывают эксперименты Cantor e. a. (1976).

За последние годы появились работы, в которых убедительно обоснована роль вирусов в индукции аутоиммунных заболеваний. Представлены результаты по изменению тимуса и аутоагрессивного поведения тимоцитов мышей C_3H и BALB/c-носителей новообразований, индуцированных вирусом лейкоза Молони (Proffitt, 1979). Выявлены также аутоагрессивные тимоциты у мышей высоколейкозной линии AKR и их реактивность против клеток стормы тимуса, которые, как известно, секретируют гормонтимозин, обусловливающий дифференцировку *Т*-лимфоцитов. Во всех этих работах подчеркивается гетерогенность клеток спонтанных лимфом у мышей AKR и лимфом, индуцированных вирусом лейкоза Молони, и их аутоагрессивное поведение.

Таким образом, существенным моментом онкогенеза вообще и вирусного в частности, по-видимому, является отмена толерантности к эмбриональным антигенам, индуцированным онковирусом. Возникновение такой аутоиммунной реакции, вероятно, во-первых, проявляется в ее активном участии в формировании антигенного профиля ткани, претерпевающей неопластическую трансформацию, а во-вторых, представляет собой фактор, лимитирующий специфический противоопухолевый иммунитет по типу конкуренции антигенов. В этом аспекте особенно важно выявление механизмов, опосредующих аутоиммунные реакции при вирусном онкогенезе. Одним из возможных подходов для решения этого вопроса является исследование иммуностимуляции роста опухоли.

Иммуностимуляция роста неопластически трансформированных клеток

Постоянное присутствие иммунных лимфоцитов и гуморальных антител к поверхностным антигенам трансформированных клеток побуждает исследовать их роль в процессах становления и прогрессии опухолей в эксперименте и клинике. Сначала было обнаружено, что Fab-фрагменты IgG-антител могут усиливать рост опухолевых клеток, и этот феномен, так же как и цитотоксическое действие, ассоциирован с концентрацией антигенных детерминант на поверхности трансформированных клеток. При высокой плотности таких рецепторов IgG вызывают цитолиз опухолевых клеток, а при низкой — эффект усиления. Впоследствии оказалось, что механизм иммунологического усиления гуморальными антителами имеет общебиологическое значение и обусловливает защиту собственных, но антигенно измененных клеток от разрушительного действия иммунокомпетентной системы. Анализ механизмов иммунностимуляции при канцерогенезе и роли в этом процессе сывороточных факторов можно найти в монографиях А. И. Агеенко (1974), Ю. А. Уманского (1974, 1975), Р. Е. Кавецкого (1977).

В данном разделе предложена концепция иммуностимуляции роста опухолей, не имеющая ничего общего с иммунологическим усилением, обнаруженным Kallis (1958), к аллотрансплантату опухоли, которое обусловливается гуморальными антителами.

Prehn (1973, 1976) установил, что при так называемом «слабом иммунитете», то есть при низком соотношении иммунного лимфоцита к опухолевой клетке, иммунные лимфоциты стимулируют рост опухоли, индуцированной химическими канцерогенами. Причем этот феномен имеет место как в сингенной, так и аллогенной системах. В то же время, как уже отмечалось, на определенной стадии опухолевой прогрессии и при иммунизации в сингенной системе накапливаются цитотоксические факторы противоопухолевого иммунитета, проявляющие свое действие при высоком соотношении иммунного лимфоцита к опухолевой клетке (50 : 1, 100 : 1). Таким образом, уже только это обстоятельство свидетельствует о том, что специфическая противоопухолевая реакция не всегда целесообразна для целостного организма.

Разделяя взгляд Prehn на механизмы иммуностимуляции и учитывая факт постоянного накопления противоопухолевых гуморальных антител и иммунных лимфоцитов, вполне логично предположить, что иммунологическое усиление развития опухоли наблюдается не только при незначительной антигенной трансформации, как это считает Prehn, но и при резко выраженном сдвиге в антигенном спектре ткани-мишени, то есть оно происходит и при функционировании системы иммунологического надзора. Вероятно, иногда, а именно в тех случаях, когда возникает онкогенез, в период становления опухоли специфическая противоопухолевая реакция может способствовать прогрессии трансформированных клеток и выполнять роль пускового механизма. Иными словами, онкогенез, по-видимому, происходит тогда, когда создается ситуация (назовем ее «раковой»), обеспечивающая селективное преимущество клеток, претерпевающих неопластическую трансформацию под действием этиологического фактора, в частности опухолеродного вируса.

Известно, что взаимодействие опухоль-организм по многим параметрам (характер опухолевой прогрессии, усиление темпов роста и др.) напоминает систему с положительными обратными связями, которые частично имеют иммунологическую природу. Поэтому особый интерес представляет наблюдение за процессом накопления лимфоидных клеток, способных усиливать рост опухоли, в сингенной и аутосистемах на разных этапах вирусного онкогенеза. При этом важно установить, сохраняются ли клеточные факторы указанного действия на поздних стадиях развития опухоли.

А. И. Агеенко и В. С. Ерхов (1917) в трансплантационном тесте испытывали клетки из селезенки мышей линии СВА-носителей первичных опухолей, индуцированных вирусом SA7 (C8), введенные в смеси с сингенными клетками сарком SA7(C8)

сублетально облученным мышам линии СВА в 12-недельном возрасте. Оказалось, что нефракционированные клетки селезенки на 20-й день после появления опухоли способны резко (статистически достоверно) сокращать продолжительность латентного периода канцерогенеза (с 23,4 дня в контроле до 15,2 дня в опыте). Нормальные спленоциты в соотношении 1 : 1 таким действием не обладали.

Таким образом, к 20-му дню развития первичной опухоли в селезенке опухоленосителей содержатся клетки, способные в соотношении 1 : 100 к опухолевым in vitro вызывать лизис клеток и в соотношении 1 : 1 усиливать рост опухоли при трансплантации сингенным мышам. Возникает вопрос, чем же обусловлены наблюдаемые различия в системах in vivo и in vitro. Противоречивость полученных результатов ставит под сомнение адекватность указанных систем. Отмечена слабая корреляция между результатом теста Winn и данными цитотоксического теста (по высвобождению ^{51}Cr). Тем не менее, как правило, высокий цитотоксический индекс во втором тесте коррелирует с результатами теста Winn.

В исследованной тест-системе in vitro цитотоксический индекс равен 0,9, то есть практически все опухолевые клетки подвергаются лизису аутологичными спленоцитами. Следовательно, различие результатов в тестах с системами in vivo и in vitro, наблюдаемое в работе А. И. Агеенко и В. С. Ерхова (1977), обусловлено, по-видимому, количественным соотношением опухолевой клетки к иммунным лимфоцитам, что согласуется с данным Prehn (1973). На системе опухолей, индуцированных метилхолантреном, Prehn получил разный эффект от трансплантации клеток сарком, который зависел от величины указанного соотношения: при более высоком значении (1 : 100) рост опухоли подавлялся, а при более низком — ускорялся. Аналогичные результаты в системе in vitro были получены Norbury (1977). При соотношении 10 : 1 иммунных клеток селезенки сингенных мышей $C_{57}BL/6$ к опухолевым рост клеток фибросаркомы, индуцированной метилхолантреном, усиливался. Замедление роста наблюдалось только при соотношении 1000 : 1. Тимоциты задерживали развитие опухолевых клеток при 100 : 1. Лимфоидные клетки от нормальных животных не обладали стимулирующим действием при низких и не были ингибиторами при любых других соотношениях. К 20-му дню роста опухолей in vivo исчезали и стимулирующий и ингибирующий эффекты.

А. И. Агеенко и В. С. Ерхов показали, что нормальные сингенные лимфоциты в соотношении 10 : 1 к опухолевым клеткам усиливают развитие сарком, трансплантируемых сублетально облученным животным. Вероятно, эти данные не противоречат выводу о роли «слабой» иммунной реакции в стимуляции опухолевого роста, так как достаточно длительный латентный период, наблюдаемый в системе мыши линии СВА — вирус SA7(C8), позволяет предположить, что перенесенные лимфоидные клетки при-

обретают специфическую иммунореактивность. С другой стороны, известно, что для успешной трансплантации опухоли облученным животным необходимо введение нормальных лимфоцитов (Prehn, 1973).

В следующей серии экспериментов было выявлено, что перенос различных количеств сингенных спленоцитов облученным животным приводит к двойному эффекту: при соотношении клетки опухоли к лимфоцитам, равном 1 : 10 и 1 : 20, рост опухоли усиливается, а при более высоком —1 : 30— ингибируется.

Одной из наиболее важных сторон трактовки полученных результатов представляется вопрос о природе наблюдаемого феномена. Разумеется, то обстоятельство, что перенос иммунокомпетентных клеток селезенки модифицирует эффект трансплантации сингенных клеток опухоли, не является прямым доказательством в пользу иммунологической природы этого феномена, хотя и не исключает его. Об иммунологической природе модификации опухолевого роста в системе сингенные мыши линии СВА+сингенные клетки сарком SA7 (C8) свидетельствует аналогия с полученными результатами (Prehn, 1973, 1976), а также тот факт, что противоопухолевая резистентность в этой системе обусловлена иммунологическими механизмами. Очевидно, данный эффект вызван непосредственным взаимодействием перенесенных лимфоидных и опухолевых клеток, так как реципиенты были облучены сублетально. Возможно, что перенос таким животным дифференцированных клеток селезенки включает нормальный гомеостатический механизм в супрессии активности стволовых клеток. Однако такое объяснение едва ли справедливо, поскольку перенесение большого числа клеток селезенки дает обратный эффект — ингибицию роста опухоли.

Вместе с тем следует отметить, что в указанной системе у облученных реципиентов проявляется действие нормальных лимфоцитов. Эффектом иммуностимуляции у необлученных сингенных животных обладали только иммунные лимфоциты (Prehn, 1973, 1976). У таких мышей обнаружены также *Т*-супрессоры, возникающие в процессе роста сингенных сарком in vivo и способствующие росту сарком путем блокирования реализации индуцированного опухолью иммунитета (Fujimoto e. a., 1976). Следовательно, вполне вероятно, что тотальное облучение не только вызывает выключение иммунокомпетентных клеток, но и приводит к повреждению ряда клеточных и гуморальных факторов, обеспечивающих в норме иммунологический гомеостазис. Возможно, утрата или снижение активности одного из этих факторов способствует специфической перестройке нормальных клеток селезенки при перенесении их облученным реципиентам, что выражается, в частности, в изменении роста трансплантируемых сингенных клеток опухоли. Как отмечено выше, действие, стимулирующее развитие опухоли, проявляется в одинаковой степени при соотношении опухолевых клеток к лимфоцитам, равном как 1 : 10, так и

1 : 20. По-видимому, наблюдаемый феномен имеет ряд универсальных черт, поскольку подобные результаты получены и на других системах (Giovarelli, 1976). Стимулирующее действие на рост трансплантированных клеток карциномы легкого у мышей $C_{57}BL/6$ оказывали нормальные тимоциты (Small, 1977). Предполагают, что этим свойством обладали незрелые субпопуляции *Т*-клеток. Обнаружена также активация роста индуцированной радиацией лимфомы незрелыми тимоцитами, связывающимися с агглютинином земляного ореха. Усиливающие клетки были чувствительны к облучению (Gabizon, Traimin, 1980). Можно считать, что представленные данные весьма интересны в плане достоверного установления иммунологической природы описанного феномена.

Для оценки участия лимфоцитов, коммитированных к эмбриональным антигенам в наблюдаемой модификации роста опухоли, А. И. Агеенко и В. С. Ерхов (1979) использовали раздельную адсорбцию нормальных лимфоцитов на монослое сингенных эмбриональных фибробластов (12—13-й и 18—19-й дни беременности). Оказалось, что предварительная адсорбция на монослое фибробластов эмбриона 12—13-го дня беременности устраняла способность лимфоцитов усиливать рост опухоли при соотношении опухолевой клетки к лимфоциту 1 : 10, в то время как на монослое поздних сроков она к такому результату не приводила. Более того, в ранние периоды беременности усиливалось ингибирующее действие неадсорбированных лимфоцитов. Адсорбция лимфоцитов на монослое фибробластов эмбрионов поздних сроков беременности к такому результату не приводила.

Следовательно, можно считать, что наблюдаемый феномен (усиление лимфоцитами опухолевого роста и его отсутствие после адсорбции на эмбриональных фибробластах) связан с эмбриональными стадиоспецифическими опухолевыми антигенами. Вместе с тем справедливо утверждение, что стимуляция роста опухоли сингенными нормальными лимфоцитами — явление иммунологического характера.

Таким образом, в отличие от Prehn (1971, 1973, 1976) авторы постулируют положение, согласно которому при канцерогенезе на поверхности трансформированных клеток экспрессируются по меньшей мере две группы антигенов, опосредующих качественно различный исход иммунологического взаимодействия опухоли и лимфоцита — иммуноцитолиз или иммуностимуляцию. Иммуностимуляция опухолевого роста в описанной системе осуществляется лимфоцитами, коммитированными к эмбриоспецифическим опухолеассоциированным антигенам (антигены-«стимуляторы»), содержащимся в клетках эмбриона ранних сроков беременности (Агеенко, Ерхов, 1979). Следует заметить, что представленные результаты не дают основания утверждать, что антигены, вызывающие иммуностимуляцию и торможение роста опухолей, различны, однако авторы и не опровергают этого предположения.

Механизм иммуностимуляции опухолевого роста остается неясным. Вместе с тем предполагается, что иммуностимуляция представляет собой результат непосредственного иммунологического взаимодействия лимфоцита с поверхностным стадиоспецифическим эмбриональным антигеном трансформированной клетки. В результате этого взаимодействия обеспечивается такая концентрация лимфокинов, которая приводит к усилению пролиферативной активности клеток, содержащих этот антиген. При этом нельзя исключить появление у опухоленосителя лимфоцитов, иммунных к разным антигенным специфичностям, представленным на поверхности трансформированных клеток. Такая точка зрения может оказаться справедливой (как это и следует из описанных опытов) только лишь при допущении, что относительная величина «мишени» для иммуностимуляции (антигены-«стимуляторы») значительно больше, чем для иммуноцитолиза. Способностью вызывать иммуностимуляцию роста сарком SA7 (C8) обладают *Т*-клетки: обработка гидрокортизоном (6 мг на 100 г массы) доноров клеток селезенки за 3 дня до их переноса сублетально облученным сингенным мышам в смеси с клетками опухоли не «отменяла» их усиливающего эффекта.

Fernandez-Cruz e. a. (1980) с помощью фракционирования удалось выделить субпопуляцию W3/25$^+$-*Т*-лимфоцитов, вызывающих быструю регрессию опухоли, и W3/25$^-$-*Т*-лимфоцитов, осуществляющих стимуляцию ее роста. Недавно были представлены данные, согласно которым неактивированные макрофаги также обладали способностью обеспечивать развитие сингенных опухолей (Gabizon e. a., 1980). Следовательно, иммуностимуляция может обусловливаться различными клетками иммунокомпетентной системы.

Иммунодепрессия, иммунологический надзор и канцерогенез

Иммуностимуляция роста трансформированных клеток, специфичная к определенным опухолеассоциированным антигенам, появляющимся на плазматических мембранах, очевидно, является пусковым механизмом канцерогенеза. Естественно, вероятность онкогенеза значительно повышается, если он возникает на фоне дефектности противоопухолевой защиты, обусловливающейся различными механизмами, среди которых существенная роль принадлежит извращению нормального функционирования иммунокомпетентной системы (иммунодепрессия, своеобразная дефектность лимфоцитов, приводящая к нарушению взаимосвязи между различными компонентами иммунной реакции, вследствие чего создается характерный дисбаланс, и др.). Следовательно, иммунодепрессия к широкому и узкому спектрам антигенов (особенно к TSTA, TSSA, gp70, gp85tsE и p30 онкорнавирусов), по-видимому, играет определенную роль не только в качестве фактора, способ-

ствующего прогрессии злокачественных новообразований, но и в процессе становления опухолевого узла. Известно, что иммунодепрессия является общей закономерностью неопластического процесса и обусловливается прямым действием различных канцерогенных агентов (онковирусы, химические и физические факторы) на иммунокомпетентную систему (Агеенко, 1974, 1975; Ceglowski, 1976; Cerny e. a., 1976; Грунтенко, 1977; Кавецкий, 1977). Это свойство, вероятно, универсально для всех канцерогенов независимо от их природы и выражается в снижении специфической противоопухолевой защиты.

Исход неопластического процесса, как установлено на многих тест-системах, обусловливается как кинетикой накопления специфического опухолевого трансплантационного антигена, так и динамикой продукции цитотоксических и блокирующих факторов, а также иммунодепрессивным воздействием канцерогенного агента. При этом особую, «пусковую», а затем определяющую характер канцерогенеза роль, по-видимому, играют вирусиндуцированные антигены клеточной поверхности, создающие селективные преимущества для быстрого размножения какой-либо трансформированной популяции клеток по типу иммуностимуляции.

В настоящее время есть все основания рассматривать онковирус не только как трансформирующий агент, но и как модулятор специфического иммунного ответа на трансплантационный антиген и антигены-«стимуляторы». Следовательно, нарушение адекватности иммунной реакции является одной из функций онкогенного вируса, которую он осуществляет путем индукции антигенов-«стимуляторов», а также с помощью ранней стимуляции выработки блокирующих антител и иммунодепрессивного эффекта. Можно предполагать, что онкогенез in vivo реализуется только в условиях сочетания трансформирующего действия онковируса с его способностью подавлять иммунный ответ на трансплантационный антиген и стимулировать онкогенез по типу иммунологического усиления. Если онковирус обладает только трансформирующей способностью, то, вероятно, иммунодепрессию может вызвать любой другой вирус, ассоциированный с ним, то есть выполнить функцию коканцерогена.

Установлена корреляция между генотипом животного и его чувствительностью (или резистентностью) к трансформирующему и иммунодепрессивному действию онковируса. Иными словами, генетические факторы не только обусловливают восприимчивость к онкогенезу, но и устанавливают эффективность иммунного ответа на неопластические клетки, несущие на своей поверхности определенные трансплантационные антигены и антигены-«стимуляторы» (Агеенко, Ерхов, 1975; Ерхов, Агеенко, 1975). Показано, что вирус SA7(C8) значительно подавляет способность спленоцитов мышей линии СВА вызывать реакцию «трансплантат против хозяина» (селезеночный индекс $3{,}3\pm0{,}1$; $2{,}8\pm0{,}1$; $P<0{,}05$) у животных этой линии и не подавляет данной способности у

спленоцитов мышей линии $C_{57}BL$, нечувствительных к онкогенезу, индуцированному вирусом SA7(C8).

Очевидно, существует тесная связь между генотипом животных и их способностью подвергаться иммунодепрессии под действием фактора, индуцирующего канцерогенез. Вероятно, генетическая детерминированность онкогенеза характеризуется, с одной стороны, генотипом ткани, а с другой — способностью канцерогенного агента повреждать регулирующие системы, в частности функцию иммунитета.

Можно предположить, что подавление иммунного ответа онковирусом у мышей линии СВА связано с нестабильностью механизма, обеспечивающего иммунологический гомеостазис. При этом следовало бы ожидать повышения тотального опухолеобразования у мышей линии СВА по сравнению с животными линии $C_{57}BL$. Действительно, линия СВА является высокораковой, линия $C_{57}BL$ — низкораковой (исключение составляют лейкозы).

Оригинальный подход к осмысливанию природы естественного канцерогенеза опухолей молочных желез (с позиций зависимости между генотипом животного и морфофункциональным характером лимфоидной системы мышей различных линий) использовал Е. В. Грунтенко (1977). Он получил данные, указывающие на то, что генетический компонент клеток рака молочных желез выражается спецификой функционирования тимусзависимой лимфоидной системы.

Индукция иммунологической некомпетентности экспериментальным путем у подопытных животных и подавление иммунитета у человека различными иммунодепрессантами приводят к более частому возникновению спонтанных новообразований и резкому сокращению их латентного периода. Это многократно подтверждалось на моделях вирусного канцерогенеза (ДНК-содержащих опухолеродных вирусов и онкорнавирусов) у разных видов тимэктомированных птиц и животных (куры, мыши, крысы, хомяки и др.), а также животных, подвергавшихся воздействию химических канцерогенов, рентгеновского излучения, антиметаболитов и антилимфоцитарной сыворотки. Аналогичные результаты получены и в опытах на мышах с индуцированной реакцией «трансплантат против хозяина». При этой реакции стабильно отмечались более высокий процент и значительно более раннее появление спонтанных и перевиваемых злокачественных лимфом и лейкозов с одновременной активацией вирусов лейкоза *С*-типа (Агеенко, 1974, 1975; Говалло, 1977; Грунтенко, 1977; Кавецкий, 1977).

Большой клинический материал статистически достоверно свидетельствует о частом возникновении различных злокачественных новообразований у людей в условиях как врожденной (гипо- и агаммаглобулинемия, аплазия вилочковой железы у больных с синдромом Вискотта-Олдрича и др.), так и искусственно вызванной (например, введение больших доз иммунодепрессантов) им-

мунологической дефектности. У этих больных выявлена неполноценность гуморального и клеточного иммунитетов, обусловливаемая дефектом стволовых клеток, *Т*- и *В*-лимфоцитов, комбинированными дефектами *Т*- и *В*-клеток. Поскольку *Т*-клетки-супрессоры и киллеры выполняют основные функции в гомеостатическом механизме, то при различных дефектах *Т*-клеток и связанных с ними нарушениях функций клеточного иммунитета (иногда с комбинированной неполноценностью *Т*- и *В*-клеток) наблюдается наибольшая склонность к возникновению злокачественных новообразований. Известно, что частота опухолей у лиц с наследственными дефицитами иммунитета в 10 000 раз выше, чем в общей популяции людей соответствующего возраста (Takemoto, 1976; Говалло, 1977). Лимфомы и ретикулоклеточные саркомы у таких больных составляют до 80%. Вместе с тем у многих пациентов с врожденным нарушением иммунной системы встречаются множественные опухоли различной локализации и гистологической структуры.

Аналогичная ситуация наблюдается и при искусственной (лекарственной) иммунодепрессии, применяемой в клинической практике при трансплантации разных органов. В этих случаях также чаще возникают лимфоидно-ретикулярные новообразования (частота появления лимфом увеличивается в 35 раз, а ретикулоклеточных сарком — в 350 раз по сравнению с нормой). Различные типы рака кожи и губы появляются в 4 раза, карциномы шейки матки и другие опухоли внутренних органов — в 2,5 раза чаще, чем у здоровых людей. Установлено, что риск возникновения новой опухоли у мужчин в 1,8 раза выше, чем у женщин, при пересадке почки от трупов — в 1,5 раза выше, чем при пересадке органа от доноров (Sloan e. a., 1977). Как правило, новообразования мезенхимального происхождения развиваются значительно раньше (до 22 мес после начала иммунодепрессивной терапии) эпителиальных, которые появляются со средним латентным периодом 30 мес. Предполагают, что, помимо иммунодепрессии, способствующей прогрессированию бластоматозного процесса, сам трансплантат является сильным антигенным стимулятором и пока он сохраняется индуцирует постоянную лимфоидно-ретикулярную активацию. Последняя в сочетании с иммунодепрессантами, также воздействующими на метаболизм лимфоидной ткани, может приводить к активации онкорнавирусов *С*-типа, неконтролируемой пролиферации определенных видов лимфоидных клеток и развитию лимфом по типу предпочтительной стимуляции роста того или иного клона клеток. Стабильное подавление супрессорной и киллерной функций *Т*-лимфоцитов на фоне возможной активации вирусных частиц *С*-типа, по-видимому, способствует резкой интенсификации пролиферации соединительнотканных элементов как в самом трансплантате, так и в прилежащих тканях.

Закономерное первоначальное образование (по отношению к эпителиальным опухолям) лимфом и ретикулоклеточных сарком,

по-видимому, может свидетельствовать об отсутствии раннего дефекта в иммунном надзоре, а следовательно, и об отсутствии «раковой» ситуации, которая, вероятно, возникает несколько позже. Кроме того, возможна гомеостатическая иммунная реакция, контролирующая пролиферацию клеток с измененным спектром нормальных антигенов, как особая форма иммунного надзора за состоянием цитодифференцировки (Фель, 1977). Понятно, что эта форма иммунологического контроля также может иметь определенное значение в онкогенезе.

Таким образом, важная роль иммунологического надзора и иммунодепрессии в онкогенезе, по-видимому, в настоящее время ни у кого не вызывает сомнений. Естественно, необходимо весьма осторожно относиться к различным видам иммунодепрессивной терапии, и препараты должны назначаться лишь по строгим показаниям. Вместе с тем следует отметить, что существуют факты, противоречащие концепции иммунного надзора. Прежде всего при неонатальной тимэктомии частота возникновения у мышей спонтанных новообразований одинакова (не отмечается стимуляции) или даже, наоборот, меньше по сравнению с таковой у интактных животных (например, в случае опухолей молочных желез у мышей, индуцированных MTV). У старых животных линии NZB процент приживления привитых сингенных опухолей ниже, чем у молодых, то есть отсутствуют экспериментальные доказательства полного подавления у этих мышей специфичесих защитных механизмов, что относится и к другим линиям мышей. У мышей nude с генетически обусловленной аплазией тимуса, неспособных отторгать аллотрансплантаты, не повышена частота развития спонтанных неоплазм нелимфоидного происхождения или индуцированных химическими канцерогенами (Rodriguez, 1976). Длительное подавление иммунореактивности у мышей без дополнительных канцерогенных воздействий также не приводит к статистически достоверному увеличению частоты появления спонтанных новообразований. Получены данные о торможении роста многих сингенных новообразований мышей в организме летально и сублетально облученных животных, что противоречит концепции иммунного надзора (Свет-Молдавский, 1975). У иммунологически незрелых новорожденных реципиентов сингенные опухоли, особенно возникшие без применения канцерогенных воздействий, появлялись гораздо позже и росли медленнее, чем у взрослых животных. Г. Я. Свет-Молдавский (1975) предполагает, что в организме эмбрионов и новорожденных в отличие от взрослых особей имеются мощные гуморальные и клеточные факторы, регулирующие рост и дифференцировку эмбриональных клеток. Нельзя исключить, что поэтому трансплантаты опухолей, взятые от взрослых животных, у новорожденных, по-видимому, претерпевают некоторую «демалигнизацию».

Врожденные иммунодефицитные состояния сопровождаются главным образом увеличением процента лимфом и злокачествен-

ной пролиферацией в гемопоэтической системе и лишь незначительным повышением частоты опухолей нелимфоидной природы (Takemoto, 1976).

Наконец, вероятно, не всегда при канцерогенезе приемлемо центральное положение иммунологического надзора — эволюционное формирование системы иммунитета для поддержания антигенного постоянства тканей организма. Прежде всего это относится к природному канцерогенезу, индуцированному в естественных условиях некоторыми вертикально передающимися онкорнавирусами, которые, как известно, паразитируя у определенных видов животных, эволюционируют совместно с организмом. Исключительное многообразие совместной эволюции может приводить к тому, что, во-первых, эти вирусы не будут чужеродными для организма, появляясь в его клетках на ранних стадиях развития, а во-вторых, у них могут возникать свойства (индуцировать синтез определенных антигенов на клеточной поверхности), обеспечивающие иммуностимуляцию роста инфицированных ими клеток природных хозяев. Е. В. Грунтенко (1977) обобщил данные, позволяющие предполагать, что при естественном заражении организма MTV иммунный ответ последнего или не развивается, или, наоборот, способствует пролиферации инфицированных клеток. Это предположение, как справедливо считает автор, дает возможность объяснить тормозящее действие иммунодепрессии на онкогенез, индуцированный некоторыми онкорнавирусами в природных системах. Нельзя исключить, что способность вертикально передающихся онкорнавирусов вызывать иммуностимуляцию трансформированных ими клеток возникла в процессе эволюции в противодействие иммунному надзору.

Итак, возможно, что неэффективность иммунологического надзора при прогрессирующем канцерогенезе или в описанных выше случаях в первую очередь обусловливается механизмами иммуностимуляции. При этом важно подчеркнуть, что такая ситуация может возникать на фоне специфического иммунного ответа. Иначе говоря, иммунный надзор может обеспечивать элиминацию трансформированных клеток до тех пор, пока на их поверхности не появляются антигены, вызывающие стимуляцию их роста.

Иммунологическая регуляция клеточной пролиферации

Основная функция иммунокомпетентной системы взрослого организма, как уже отмечалось выше, состоит в поддержании постоянства внутренней среды и стабильности ее антигенной структуры (Burnet, 1971). В силу этого иммунный ответ на нормальные, неизмененные аутологичные антигены обычно расценивают как патологические аутоиммунные процессы. Вместе с тем за последние годы в литературе накопилось достаточно фактов, свидетельствующих о том, что лимфоциты могут влиять на дифферен-

цировку собственных соматических клеток, то есть, иными словами, они обладают какой-то морфогенетической потенцией и могут реализовать свой эффект (Svet-Moldavsky e. a., 1964; Warnatz e. a., Головистиков с соавт., 1970; Prehn, Lappe, 1971; Бабаева, 1972). Подробно вопросы иммунологической регуляции дифференцировки соматических клеток обсуждаются в работе В. Г. Нестеренко (1980). Причем этот тип аутологичной реакции (реакции на аутологичные идиотипы) в виде исключения рассматривается как физиологический процесс идиотип-антиидиотипических взаимодействий. Предполагается также, что среди лимфоцитов, взаимодействующих с аутологичными дифференцировочными антигенами, могут существовать разные клеточные субпопуляции: клетки-супрессоры, клетки-хелперы, клетки-регуляторы и т. д.

В настоящее время появились данные, позволяющие постулировать существующую физиологическую регулирующую роль лимфоидной ткани клеточной пролиферации, то есть непосредственное участие лимфоцитов (возможно также, разных клеточных субпопуляций) в регуляции роста тканей. В основе этого «тонкого» иммунологического механизма, очевидно, в отличие от литического воздействия лимфоцитов на клетки-мишени, лежит аутологичная реакция лимфоцитов на нормальные антигены (антигены «пролиферации» или антигены-«стимуляторы»), локализующиеся на поверхности клеток-мишеней. Вероятно, существует механизм обратной связи между органом и лимфоидной тканью. Нельзя исключить при этом наличие специфических клонов лимфоидных клеток, которые, вырабатывая определенные вещества, могут стимулировать клеточное деление того или иного органа-мишени или, наоборот, угнетать пролиферативные процессы. Например, Prehn (1973) показал, что удаление у мышей органа (печень, надпочечники) или его части при соответствующих контролях (симуляция операции) вызывает активацию клеток селезенки, и эти клетки могут статистически достоверно стимулировать синтез ДНК в соответствующем органе интактных или иммунодепрессированных животных, то есть эта способность спленоцитов переносится адаптивно. С другой стороны, у мышей линии СВА выявлена популяция Т-лимфоцитов (отличная от других Т-клеток-супрессоров), угнетающая синтез ДНК клеток лимфатических узлов. В угнетении синтеза ДНК лимфоциты, взятые из лимфатических узлов, более эффективны, чем *Т*-клетки селезенки.

Существенно отметить, что, по-видимому, иммунологический контроль клеточной пролиферации представляет собой физиологический процесс, как и при лимфоидной регуляции дифференцировки соматических клеток. При канцерогенезе этот процесс может нарушаться, вследствие чего на поверхности неопластически трансформированных клеток могут экспрессироваться значительно большие количества антигенов, являющихся мишенью для постоянной иммуностимуляции.

Показано, что действие супрессоров, возникающих в процессе роста сингенных опухолей, опосредуется гуморальными медиаторами, которые находятся в сыворотке мышей-опухоленосителей и могут тормозить пролиферацию не только лимфоидных, но и опухолевых клеток (Thomas e. a., 1975; Fernbach e. a., 1976).

В связи с вышеизложенным принципиально важно уточнить роль антигенной перестройки в процессах противоопухолевой резистентности. До сих пор неясно, обеспечиваются ли селективные преимущества для неопластически измененных клеток наличием на их плазматических мембранах антигенов, отражающих по существу механизм неопластической трансформации, или же они являются всего лишь вторичными, то есть «побочными» продуктами онкогенеза.

Глава V

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И КРИТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

Лекарственная терапия злокачественных новообразований вошла в клиническую практику наряду с такими давними методами воздействия на бластоматозный процесс, как хирургическое лечение и лучевая терапия.

Наиболее известными представителями цитостатических средств являются хлорэтиламины, например, сарколизин, циклофосфамид (ЦФ), этиленимины (Тио-ТЭФ) и некоторые другие. Группа антиметаболитов включает антагонисты фолиевой кислоты (аметоптерин), пиримидина (5-фторурацил), пурина (6-меркаптопурин), цитозин, арабинозид, ингибиторы сульфгидрильных групп (оксифенарзин гидрохлорид и йод-ацетат). Среди антибиотиков наибольшее распространение получили актиномицин *Д*, нитромицин *С*, дауномицин, рубидомицин, оливомицин и др. Из веществ природного происхождения следует назвать винбластин (винкристин), колхицин, подофиллин и другие.

Результатом развития лекарственной терапии злокачественных опухолей в последние годы явилась возможность успешного лечения некоторых видов злокачественных новообразований, например, лимфомы Беркитта, хорионэпителиомы Вильмса, семиномы яичка и др. (Zubrod, 1972; De Vita e. a., 1975; 1976; Johnson, Goldin, 1975; Переводчикова, 1976; Блохин, 1977; Хомченовский, 1980). Так, Burchenal (1970) описал истории болезней 180 детей, больных острым лимфолейкозом, которые остались живы и через 5 лет после лечения (прежде лишь немногим детям удавалось сохранить жизнь более, чем на год). Лечение некоторых опухолей химиотерапией, которая приводит к гибели значительного числа опухолевых клеток, позволяет добиться существенного продления жизни больных. К таким опухолям относятся рак яичников и молочной железы, тела матки, лимфо- и ретикулосаркома, лимфогранулематоз, миеломная болезнь, нейробластома у детей (Zubrod, 1975; De Vita, 1975, 1976, 1977; Переводчикова, 1976).

В последнее время особое внимание уделяется методу полихимиотерапии, при котором используются комбинации противоопухолевых препаратов различного механизма действия. Этот вид

лечения завоевал такую популярность, что в современной клинике применение одного противоопухолевого препарата в качестве единственного лекарственного средства является скорее исключением, чем правилом. Это связано с тем, что использование одного цитостатика приводит к относительно быстрой лекарственной резистентности, что может даже ухудшить течение опухолевого процесса. Наличие большого числа противоопухолевых лекарственных средств разных химических групп с неодинаковым механизмом действия позволяет при развитии лекарственной резистентности менять препараты, избирая наиболее эффективные.

Блестящие результаты, полученные Frei (1965) при использовании метода полихимиотерапии острого лимфобластного лейкоза у детей (средняя продолжительность жизни увеличилась с 3,5 до 36 мес, причем 15% лечившихся живут свыше 6 лет, нередко без симптомов заболевания), послужили толчком к изучению возможностей применения комбинаций противоопухолевых препаратов при солидных опухолях.

Предпосылками к созданию метода полихимиотерапии злокачественных опухолей послужили работы школы Skipper (1969), посвященные вопросам кинетики клеточных популяций, а также учитывающие биохимические, фармакологические, токсикологические и иммунологические закономерности.

Так, большинство цитостатических препаратов не действует на клетки, находящиеся в состоянии покоя (G_0), хотя имеются уже некоторые соединения, которые с этой точки зрения представляют исключения (например, нитрозомочевины). Резистентность находящихся в состоянии покоя клеток к цитостатическим препаратам является наибольшим препятствием успешного лечения солидных опухолей. Именно поэтому реальным кажется тот факт, что удаление определенного количества опухолевых клеток побуждает находящиеся в состоянии покоя к делению и этим делает их чувствительными к химиотерапии (De Vita, 1971). Некоторые антиметаболиты влияют в основном на клетки в фазе *S*, другие в фазах *G, S,* винка-алкалоиды — в фазе *M*, в то время как циклофосфан, по последним данным, активен в течение всего жизненного цикла клетки. Важное значение имеет синхронизация опухоли, цель которой заключается в приостановлении деления клеток в одной фазе, после чего на определенный промежуток времени значительное их количество синхронно вступает в следующие фазы. В это время опухоль становится максимально чувствительной к воздействию других противоопухолевых агентов. Ярким примером синхронизации является комбинация винбластина и блеомицина при опухолях яичка, а также винкристина и эндоксана при ретикуло-лимфосаркоме (Klein, 1974).

Метод полихимиотерапии опухолей успешно применяется и при лечении некоторых форм рака.

Биологические принципы этого метода можно вкратце охарактеризовать следующим образом.

1. Путем комбинаций химиопрепаратов, обладающих различной индивидуальной эффективностью, достигается усиление противоопухолевого действия без пропорционального возрастания токсичности, что дает возможность увеличения дозы каждого химиопрепарата при той же глубине отдельных побочных реакций. Это ведет, с одной стороны, к последовательной или одновременной биохимической блокаде синтеза ДНК, РНК, протеинов, а с другой — к непосредственному повреждению их структуры. Уменьшение токсичности достигнуто, например, при комбинациях метатрексата и лейковорина, арабинозидцитозина и 6-тиогуанина.

2. Используется оптимизация доз и режимов введения комбинируемых химиопрепаратов.

3. Осуществляется воздействие на кинетические параметры клеточного цикла (синхронизация одним химиопрепаратом клеток в фазе, чувствительной к другому) цитостатиками, влияющими на его различные фазы или вводящими в него клетку.

4. Применяются комбинации химиопрепаратов, способствующие увеличению в опухоли концентрации других препаратов.

С учетом этих принципов и составлялись многие программы химиотерапии острых лейкозов и солидных опухолей. Программы химиотерапии лейкозов представлены в работах В. М. Бергольца, Н. С. Кисляк, В. С. Еремеева (1978); Е. И. Хомченовского (1980); Goldin (1980); Parker e. a. (1980). Мы же остановимся на вопросах лечения солидных опухолей, связь которых с иммунокомпетентной системой организма в процессе лекарственной терапии рассмотрена в последующих главах.

В 1961 г. Li сообщил о лечении устойчивых к сарколизину опухолей яичка комбинацией трех препаратов, относящихся к различным классам противоопухолевых веществ (актиномицин *Д*, хлорамбуцил, метатрексат). Автору удалось получить объективный эффект у 40% больных. Однако регрессия метастазов на длительный срок наблюдалась крайне редко.

В дальнейшем В. И. Астрахан и Ф. А. Монул (1967) разработали новые схемы сочетанной терапии опухолей яичка, позволяющие получить более высокий процент эффективного лечения. Авторы назначали комбинацию ЦФ, метатрексата, хризомаллина и оливомицина, в результате чего из 74 больных с IV стадией процесса (при наличии отдаленных метастазов) у 13,5% продолжительность жизни достигала двух лет, а у остальных, находящихся под наблюдением до 8 лет, признаков рецидива не отмечалось.

Интенсивно изучаются разные схемы полихимиотерапии рака желудка. Наибольший эффект получен при сочетании 5-фторурацила с адриамицином, митомицином *С* и нитрозометилмочевиной (у 21—55% больных), при этом средняя длительность жизни леченных больных распространенным раком достигала 20—33 недель, тогда как у нелеченных — 16 недель (Higgins, 1979).

До последнего времени диссеминированная меланома кожи

не поддавалась ни одному из известных противоопухолевых препаратов. В то же время метод полихимиотерапии с использованием винка-алкалоидов, нитрозометилмочевины и актиномицина *Д* позволил добиться объективного улучшения у 42% больных, причем у 8% отмечено полное исчезновение опухоли, и в течение 1,5—3 лет рецидивов не было. Плоско- и крупноклеточный рак легкого, а также аденокарцинома легкого еще менее чувствительны к химиотерапевтическим воздействиям (объективно регистрируемый эффект удается получить у 10% больных). Комбинация же нитрозометилмочевины и ЦФ оказалась эффективной у 27% больных плоскоклеточным раком легкого, в то время как каждый из указанных препаратов в отдельности практически не действует на эту форму рака (Переводчикова, 1976).

Преимущество полихимиотерапии перед монохимиотерапией отмечено также и в детской онкологии. Так, лечение нейробластомы ЦФ, винкристином и диметил-триазено-имидазол-карбоксамидом было успешным у 19 из 26 больных (73%), в то время как только ЦФ или винкристин был эффективен у 30—40% больных.

Лечение рака яичников также привело к значительным результатам при комбинации метатрексата, 5-фторурацила, ЦФ, гексаметиленмеламина (Young, 1976). При таком сочетании цитостатиков было получено объективное улучшение у 79% больных. Greenspan (1969) достиг положительного результата в 63% случаев путем комбинации метатрексата с Тио-ТЭФом, Lloyd (1976) — в 61% при использовании ЦФ с адриамицином.

Лечение рака молочной железы сочетанием противоопухолевых препаратов с различным механизмом действия также перспективно. Cooper (1969) добился ремиссии в 90% случаев путем введения метатрексата, 5-фторурацила, ЦФ, винкристина и преднизолона; Jones (1975) — в 78% случаев комбинацией адриамицина и ЦФ. Gottlieb (1974), вводя 5-фторурацил, адриамицин и ЦФ, получил ремиссию у 50—70% больных.

Особое место занимает химиотерапевтическое лечение остеогенных сарком, которые принадлежат к группе опухолей, наиболее резистентных к терапии. Методом полихимиотерапии, в частности, комбинацией, предложенной Gottlieb (1974), Wilbur (1974), Rosen (1975), удалось улучшить прогноз заболевания. Используя сочетания метатрексата, ЦФ, адриамицина и винкристина, полная ремиссия была получена в 10 из 17 случаев. Введение максимальной дозы метатрексата привело к дальнейшему улучшению результатов.

Определенный успех достигнут и в лечении сарком мягких тканей. Так, комбинация ЦФ, метатрексата, 6-меркаптопурина и преднизолона позволила добиться клинического эффекта у 21 из 44 больных (Клименков, 1971).

Таким образом, современные достижения в клинической химиотерапии злокачественных опухолей основываются на данных экспериментальной терапии новообразований, которая за послед-

ние 40 лет составила самостоятельную отрасль науки. Мы остановились на клинических данных полихимиотерапии солидных опухолей, чтобы показать насколько существенны полученные результаты при различных комбинациях цитостатических средств. Однако даже при использовании метода полихимиотерапии смертность от злокачественных новообразований продолжает оставаться высокой (Астрахан, 1962; Crile, 1970; Переводчикова, 1976; Блохин, 1977; и др.).

Приходится констатировать, что в бóльшей части случаев, несмотря на лечение, терапевтический эффект оказывается временным. Отсутствие данных о состоянии иммунологической реактивности организма, влиянии антибластомных средств на эти реакции, а также чувствительности опухоли к воздействию противоопухолевых агентов в зависимости от физиологического состояния опухолевых клеток может служить одной из причин недостаточно выраженного противоопухолевого действия.

Глава VI

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ И ЖИВОТНЫХ-НОСИТЕЛЕЙ ОПУХОЛЕЙ

Клинические и экспериментальные исследования состояния иммунологической реактивности больных с опухолями показали, что у многих из них снижается интенсивность иммунного ответа. Southam (1965, 1968) установлено, что в бóльшем проценте случаев приживляются аутотрансплантаты опухолей, содержащие от 10^5 до 10^7 клеток (контроль — неопухолевые больные с нормальной иммунологической реактивностью). Если у здоровых людей имплантаты раковых тканей быстро рассасываются при наличии ясно выраженной и продолжительной реакции, то у больных раком наблюдается пролиферация пересаженных опухолевых клеток, причем у некоторых из них рост образовавшихся узлов продолжается до смерти (42 и 57 дней). В то же время у таких больных не выявлено общего понижения иммунологической реактивности, так как при иммунизации их организм вырабатывает антитела к инфекционным вирусам. Прививка трем раковым больным культуры нормальных фибробластов человека не удалась. Следовательно, механизмы трансплантационного иммунитета у них сохранены, однако раковая ткань привилась у всех трех. Эти опыты, как предполагают авторы, свидетельствуют о снижении у больных раком не трансплантационного, а противоопухолевого иммунитета.

Ослабление реактивности (гиперчувствительности замедленного типа) на введение туберкулина и других бактериальных антигенов, а также химических аллергенов (например, динитрофлюоробензола) часто наблюдается при болезни Ходжкина, лимфомах и других формах опухолевых заболеваний (Aisenberg, 1962, 1964, 1966; Hughes e. a., 1965; Krant e. a., 1968; Schwarzenberg e. a., 1966; Solovey e. a., 1965; Schneider e. a., 1970; Southam, 1970).

Вместе с тем следует отметить, что, несмотря на некоторое снижение иммунологической реактивности у больных раком, их противоопухолевые потенции все-таки достаточно выражены. Doubraw e. a. (1960) показали, что введение онкологическим больным (преимущественно в терминальной стадии заболевания)

формалинизированных экстрактов из аутологичных опухолей приводит к характерной кожной реакции аллергического типа, напоминающей туберкулиновую кожную пробу. Аналогичные результаты были получены Wilson e. a. (1963). Больным с неоплазмой подкожно или внутрибрюшинно вводили гомогенат, приготовленный из аутологичной опухоли с адъювантом Фройнда. В месте введения опухолевого антигена наблюдалась кожная реакция, напоминавшая феномен Артюса, которая сохранялась 4—7 дней, а затем исчезала. По данным Grace (1964), внутрикожная инъекция больным с карциномой молочной железы, лимфогранулематозом и лимфосаркомой экстрактов из их собственной опухоли вызвала отчетливую кожную аллергическую реакцию. Применение тем же больным экстрактов из аутологичных нормальных тканей подобной реакции не индуцировало. Southam (1967) вводил лейкозным больным, находящимся в состоянии ремиссии, бесклеточный экстракт из их собственных лейкозных клеток. У всех больных в ответ развилась кожная реакция, определяемая автором как проявление специфической иммунной реакции больных на лейкозный антиген. В. В. Городилова с соавт. (1965, 1968, 1969, 1975, 1978) проводят комплексную работу по изучению аллергической кожной реакции у больных раком на введение белковых и полисахаридных фракций из различных опухолей человека — рака легкого, желудка, молочной железы и меланомы. Исследования велись на разных стадиях опухолевого процесса. В I—III стадиях аллергические кожные реакции на введение соответствующих опухолевых антигенов были положительными и протекали по типу гиперчувствительности замедленного типа. В IV стадии заболевания (в случае распространенного опухолевого процесса) аллергические реакции на введение антигенов, как правило, отсутствовали.

При изучении иммунологической реактивности мышей с меланомой Гардинг-Пасси И. Е. Ковалев с соавт. (1971) обнаружили, что развитие неопластического процесса не изменяет количество антителопродуцирующих клеток в селезенке и титр циркулирующих антител (гемолизинов и гемагглютининов) после иммунизации эритроцитами барана. Трансплантационный иммунитет у мышей с опухолью не нарушен. Более того, организм-опухоленоситель способен отторгнуть небольшой фрагмент опухоли, находящейся в стадии роста. Gershon e. a. (1967) определили это явление как сопутствующий иммунитет. Подтверждением могут служить сотни случаев спонтанной регрессии злокачественных опухолей у человека с уточненным клиническим и гистологическим диагнозами (Everson, 1964).

Многие авторы описывают корреляцию между гиперчувствительностью замедленного типа к опухолевым антигенам, изготовленным из собственных опухолей больных, и клиническим течением опухолевого процесса (Городилова с соавт., 1965, 1968, 1975, 1978; Fass e. a., 1970; Gutterman e. a., 1973; и др.). Однако

эти данные должны восприниматься весьма осторожно, так как *Т*-клеточный иммунитет не всегда однозначен.

В некоторых работах предпринимались попытки выявить корреляцию между прогрессивным развитием опухоли и наличием блокирующих факторов (см. главу III), однако это не всегда удавалось. Блокирующая активность была обнаружена в сыворотках животных-носителей опухолей (Heppner, 1969; Ankerst, 1971; Baldwin, 1973), а также в периоды ремиссии у больных, пораженных меланомой (Hellström e. a., 1973), в то время как в стадии роста новообразований у больных блокирующие факторы не всегда обнаруживались (Hellström e. a., 1971; Byrne e. a., 1973). Кроме того, эти исследования привели к выявлению нового феномена, который был назван «деблокировкой»: неблокирующие сыворотки животных или больных без опухоли оказались способными нейтрализовать блокирующую активность сывороток-носителей опухоли. Деблокирующая активность сначала была показана с сыворотками мышей, у которых вызванные MSV саркомы спонтанно регрессировали (Hellström, Hellström, 1970), а также в сыворотке крыс после хирургического удаления трансплантатов сарком, вызванных полиомой (Bansal, Sjögren, 1971). Hellström e. a. (1971) в сыворотке больных-носителей меланом в состоянии ремиссии наблюдали исчезновение блокирующей активности и одновременное появление способности уничтожать ее в стадии роста новообразования.

Инъекции деблокирующих сывороток немедленно после изотрансплантации сарком, вызванных вирусом полиомы, приводили к полной регрессии опухоли. В сыворотках этих животных не появлялось никакой блокирующей активности. Был обнаружен сильный иммунитет Т-клеточного типа, а также присутствие цитотоксических антител.

Исследования состояния *Т*-клеточного иммунитета у больных с различными формами злокачественных заболеваний показали, что с прогрессированием опухолевого процесса происходит снижение активности клеточного иммунитета (Mathe, Tubiana, 1973). При болезни Ходжкина наблюдается отсутствие кожной гиперчувствительности (Aisenberg, 1962, 1966). Авторы отмечают, что уровень иммуноглобулинов сохраняется даже в процессе прогрессирования опухоли, в то время как кожные реакции ослабляются и, наоборот, усиливаются в случае регрессии опухоли.

Исследование *Т*-клеточного иммунитета in vitro у больных злокачественными новообразованиями показало, что способность лимфоцитов к стимуляции на ФГА снижена (Herch, Oppenheim, 1965). Это связано, как предполагают, с глубоким повреждением *Т*-лимфоцитов при болезни Ходжкина. Аналогичные нарушения были обнаружены у больных с солидными опухолями, особенно в запущенных стадиях (Gatti e. a., 1970; Al-Saffar e. a., 1972). В то же время не существует корреляции между кожной реакцией замедленной гиперчувствительности ко вторичным антигенам и

преобразованием лимфоцитарных клеток у онкологических больных in vitro под влиянием митогенов или антигенов, даже таких, которые действуют главным образом на *Т*-клетки (например, ФГА).

Более того, даже при интенсивной химиоиммунотерапии не удается обнаружить характерной корреляции между показателями состояния *Т*-клеточного иммунитета и течением опухолевого процесса. В этом отношении интересны исследования Looney e. a. (1980), последовательно изучавших состояние *Т*-клеточного иммунитета у больных остеогенной саркомой до оперативного лечения и после него, а также при химиоиммунотерапии. Причем после операции в течение 8 мес больные получали курс высоких доз метатрексата и цитроворума, а некоторые дополнительно — БЦЖ. В результате проведенного лечения в 50% случаев отмечались рецидивы, и ни один из использованных современных методов иммунологического контроля (7 тестов) не коррелировал с клиническим течением. У больных с рецидивами, принимавших метатрексат и БЦЖ, снижение *Т*-клеточного иммунитета не отмечалось. Хотя в случаях введения только метатрексата (в течение первых 6 дней) значительно подавлялась реакция бласттрансформации лимфоцитов на ФГА. Вместе с тем после 8 мес лечения этим препаратом *Т*-клеточный иммунитет не снижался.

Опираясь на экспериментальные исследования Orbach, Castes (1978), можно предположить, что отсутствие корреляции между иммунологическими тестами и клиническим течением болезни (большой процент рецидивов) связано с иммуностимулирующим эффектом метатрексата. Не исключено, что в процессе химиотерапии опухолевые клетки погибают с появлением в организме опухоленосителя блокирующего фактора, действие которого усиливается иммуностимулирующим эффектом указанного препарата. Эти данные убедительно свидетельствуют о том, что к интерпретации иммунологических тестов в процессе прогрессивного роста опухоли нужно подходить очень осторожно.

Отсутствие корреляции между клиническим состоянием больного и иммунологическим ответом на митогены зависит, по всей вероятности, от того, что лимфоциты, будучи уже стимулированы опухолевым антигеном, находятся в состоянии активного иммунного ответа и не отвечают на другой мощный раздражитель — ФГА. Таким образом, пониженная способность лимфоцитов отвечать трансформацией на введение ФГА скорее является показателем их активной иммунной реакции, чем иммунологической недостаточности.

Другим объяснением отсутствия корреляции между кожной реакцией и степенью распространенности опухолевого процесса могут быть сывороточные иммуноподавляющие факторы. В этом отношении демонстративна работа Stewart (1977). Оказалось, что у больных с бронхиальными карциномами с исчезновением сывороточных факторов, способных ингибировать стимуляцию лимфо-

цитов туберкулином in vitro, отрицательные реакции на туберкулин становятся положительными.

Итак, приведенные в этой главе данные, несомненно, свидетельствуют о том, что в появлении и развитии опухолевого процесса участвуют, по-видимому, многочисленные механизмы, осуществляющие гомеостаз. Предполагают, что на первом этапе появления малигнизированных клеток происходит снижение естественной резистентности, которая может играть определенную роль в защите организма от спонтанных моноклональных опухолей (Hengst e. a., 1980). На втором этапе развития бластоматозного процесса при значительном увеличении количества опухолевых клеток организм опухоленосителя отвечает на TSTA-антигены достаточно активно, включая *Т*- и *В*-системы иммунитета. Вместе с тем нельзя забывать о втором компоненте иммунного ответа, который обусловливает усиление роста неопластически трансформированных клеток за счет появления *Т*-супрессоров, блокирующих факторов, снижения активности *Т*-киллеров и *Т*-хелперов и т. д. Необходимо также учитывать возможность экспрессии на плазматических мембранах антигенов-стимуляторов, обеспечивающих иммуностимуляцию роста опухоли (см. гл. III и IV).

В заключение следует отметить, что организм-опухоленоситель при солидных новообразованиях обладает, по-видимому, достаточно выраженной иммунологической реактивностью, которая при прогрессивном росте опухоли направлена чаще в сторону защиты трансформированных клеток, а не их элиминации.

Глава VII

ВЛИЯНИЕ АНТИБЛАСТОМНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ИММУНОГЕНЕЗ В НОРМЕ И ПРИ ОПУХОЛЕВОМ РОСТЕ

Трансплантационный иммунитет и гиперчувствительность замедленного типа

В настоящее время ведущая роль в осуществлении трансплантационного иммунитета и реакции гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ) принадлежит иммунным лимфоцитам. О правильности подобного утверждения свидетельствуют успешные результаты опытов по адаптивному переносу трансплантационного иммунитета и РГЗТ с их помощью.

Антибластомные лекарственные средства оказывают подавляющее действие на трансплантационный иммунитет и РГЗТ. При этом алкилирующие агенты и аналоги пурина действуют сильнее, чем антагонисты фолиевой кислоты. В. И. Попов и М. М. Нездатный (1963, 1964) изучали влияние сарколизина, допана, тиофосфамида, новоэмбихина, хлорамбуцила и дегранола на продолжительность жизни аллотрансплантатов кожи кроликов. Препараты вводили со дня трансплантации до превращения аллотрансплантата в струп. Инъекция различных доз сарколизина (0,5 мг/кг, 1 мг/кг либо 2,5 мг/кг один раз в неделю) не отсрочила отторжения трансплантатов, однако последняя доза обусловила гибель 2 из 3 кроликов. Аналогичные результаты достигнуты при применении допана (1 мг/кг, 5 мг/кг либо 15,5 мг/кг один раз каждые 4 дня) и тиофосфамида (0,5 мг/кг, 1 мг/кг либо 2,5 мг/кг ежедневно), хотя самые высокие из этих доз приводили к гибели большинства животных. Новоэмбихин и хлорамбуцил не подавляли трансплантационных реакций. Увеличение продолжительности жизни аллотрансплантата вдвое по сравнению с контролем было получено при введении дегранола в дозе 25 мг/кг, однако 1 из 5 кроликов погиб. Наибольший иммунодепрессивный эффект достигнут при инъекции дегранола в дозе 10 мг/кг каждые 3 дня, при этом продолжительность жизни трансплантатов возросла втрое по сравнению с контролем, но из 8 кроликов 3 погибли, то есть эта доза оказалась токсичной.

В экспериментальных исследованиях Berenbaum, Brown (1963) было показано, что иммунокомпетентные клетки неодинаково реагируют на ингибирующие воздействия, примененные в разных стадиях иммуногенеза. Так, облучение и милеран подавляют

иммунологические реакции до введения антигена, эндоксан — через 1—3 дня после его введения (тогда как предварительная инъекция почти не оказывает никакого влияния). Однократная максимально переносимая доза эндоксана (200 мг/кг подкожно) обусловливает наибольшую продолжительность жизни аллотрансплантатов кожи мышей при инъекции препарата через 1—4 дня после пересадки кожи. Применение эндоксана до трансплантации или на 6-й день после нее не оказывает существенного влияния на трансплантационную реакцию реципиента.

Glyn e. a. (1963) сообщили, что предварительное введение мелфалана в дозе 5 мг/кг в течение 5 дней привело к достоверному увеличению продолжительности жизни аллотрансплантатов кожи и опухоли в опытах на мышах. Позднее эти данные были подтверждены Brown, Berenbaum (1964) в экспериментах на тех же животных с применением однократной максимально переносимой дозы мелфалана (15 мг/кг). Было показано, что милеран и мелфалан, подобно общему облучению, сильнее всего угнетают иммунные реакции при их инъекции до поступления антигена, тогда как эндоксан — только при его введении после антигена.

Sevinson, Necheles (1956) изучили влияние эмбихина на продолжительность жизни аллотрансплантатов кожи в опытах на крысах. Препарат вводили внутривенно на 4, 9, 14-е сутки после операции, затем делали 5 инъекций через каждые 6 дней. После 44 дней введение эмбихина было прекращено. Животные наблюдались в течение 115 дней. К этому времени некоторые трансплантаты оставались жизнеспособными, тогда как контрольные лоскуты отторгались в среднем за 8 дней.

Трансплантационный иммунитет может быть значительно подавлен введением 6-меркаптопурина (Schwartz, Dameshek, 1959; Robinson, Christian, 1960; и др.).

Цитостатические вещества, обладающие способностью ингибировать реакцию на аллотрансплантат, могут также предупреждать развитие РГЗТ, как это было показано в опытах с ЦФ, 6-меркаптопурином и аметоптерином. Maguire и Maibach (1961), вводя морским свинкам овальбумин на фоне лечения ЦФ, наблюдали отсутствие развития РГЗТ в обычные сроки. Интересные результаты были получены Friedman, Buckler e. a. (1961), исследовавшими действие аметоптерина на последовательное развитие у морских свинок гиперчувствительности замедленного и немедленного типов и образование циркулирующих антител после иммунизации дифтерийным анатоксином или овальбумином в адъюванте Фройнда. С помощью длительного введения аметоптерина в средних дозах удалось предупредить развитие гиперчувствительности немедленного типа и синтез антител, но не РГЗТ.

Следовательно, существуют значительные отличия между биохимическими процессами, приводящими к формированию разных типов гиперчувствительности, так как их чувствительность к ингибитору неодинакова. Авторы указывают, что облучение свинок

200 Р оказывает аналогичное действие, предотвращая образование только циркулирующих антител, но при этом развивается лейкопения. Аметоптерин в указанной дозе не вызывает лейкопению и приводит к относительному лимфоцитозу. 6-меркаптопурин в очень высоких дозах также задерживает развитие гиперчувствительности замедленного типа к туберкулину (Houer e. a., 1962).

Суммируя вышеизложенное, можно сделать заключение о том, что все цитостатические противораковые препараты способны в той или иной степени подавлять трансплантационный иммунитет и РГЗТ.

Гуморальный иммунный ответ

В результате большого количества опытов, проведенных с различными дозами антигена и ингибиторов, а также различной периодичностью их введения, был установлен ряд общих закономерностей влияния цитостатических веществ на иммуногенез. Они могут обусловить задержку иммунного ответа, снижение уровня образования антител, наконец, полное подавление иммунного ответа, а в некоторых случаях оказывать обратный эффект, усиливая антителообразование.

В известных пределах эффективность ингибиторов возрастает пропорционально дозе. В опытах Schwartz, Eisner и Dameshek (1959) начало синтеза антител к альбумину у кроликов удавалось отсрочить на 1, 5 и 7 дней при использовании 6-меркаптопурина в дозах соответственно 1, 2 и 3 мг/кг. Введение препарата в дозе 6 мг/кг приводило к полному подавлению иммуногенеза. Аналогичные данные относительно зависимости эффекта ингибитора от дозы получили Caoney, Bradley (1952), Malmgren e. a. (1952) и др. Большую роль играет также продолжительность введений: кратковременное (даже очень высокой дозы 6-меркаптопурина) — слабо влияет на образование антител (Nathan e. a., 1961).

Противораковые препараты эффективно тормозят иммуногенез при их введении в различные сроки относительно инокуляции антигена. Алкилирующие вещества, по-видимому, высокоэффективны при многократной инъекции до поступления антигена и несколько менее действенны — после его появления. Это было показано, в частности, в работах, посвященных действию амбихина на образование антител различных видов (Green, 1957; Cassi e. a., 1966).

Аналогичные данные были получены при изучении влияния сарколизина на формирование гемолизинов у мышей. При введении до поступления антигена антиметаболиты малоэффективны. Это установили Schwartz, Stack и Dameshek (1958), исследовавшие действие 6-меркаптопурина на образование антител к альбумину. В первые 2—3 дня, то есть в индуктивной фазе, при

инъекции после появления антигена антиметаболиты наиболее эффективны, в то время как после воздействия антител в сыворотке их эффективность значительно уменьшается (Nathan e. a., 1961).

Использование цитостатических веществ позволило наблюдать интересные изменения иммунологической реактивности. Одно из них — избирательная толерантность взрослых животных к определенному антигену. Впервые это явление описали в 1959 г. Schwartz и Dameshek на модели иммунизации кроликов альбумином человека, меченным I^{131}. Показателями иммунной реакции были появление в сыворотке преципитинов, а также ускорение выделения меченого антигена, наступавшее в контрольной группе на 7-й день иммунизации. У кроликов, получивших большие дозы 6-меркаптопурина, антитела не появлялись. При повторном введении тем же животным альбумина через месяц образование антител не наблюдалось; при инъекции бычьего глобулина отмечался нормальный иммунный ответ.

Изучая механизм действия 6-меркаптопурина на иммуногенез, Rabbins (1965) обнаружил, что действие этого препарата на синтез различных антител неодинаково: у кроликов, получавших 15 дней 6-меркаптопурин в дозе 18 мг/кг в сутки, на протяжении 40—60 дней иммунные IgG-глобулины отсутствовали, в то время как антитела, принадлежащие к фракции IgM, были в таком же количестве, как и в контроле.

Sahiar e. a. (1965) исследовали влияние введения 6-меркаптопурина (10 мг/кг) в течение 7 дней на различные компоненты иммунного ответа и при этом выявили следующие особенности в антителообразовании: 1) удлинение индуктивной фазы; 2) уменьшение общего титра антител; 3) угнетение синтеза IgG-антител; 4) нормальный синтез IgM-антител. На основании полученных результатов авторы пришли к заключению, что 6-меркаптопурин нарушает синтез антител, имеющих константу седиментации IgG, в то время как образование антител с константой седиментации IgM не изменяется.

Santos e. a. (1966) иммунизировали белых крыс путем внутривенной инъекции эритроцитов барана и через 2 суток в течение 5 дней вводили внутрибрюшинно по 20 мг/кг ЦФ или 0,75мг/кг метатрексата. Оказалось, что при такой постановке опыта выработка антител IgG по сравнению с контролем отсутствовала. Период образования антител IgM в опытах с ЦФ был непродолжительным, в то время как с метатрексатом — более длительным, чем в контроле. При введении испытуемых соединений на протяжении 5 дней, начиная с 5-го дня после иммунизации, выработка IgM-антител продолжалась более длительное время по сравнению с контролем, а IgG-антител — полностью прекращалась. Подобное действие различных химиопрепаратов было показано в работах Л. А. Певницкого с соавт. (1970).

Ингибирование первичного иммунного ответа наблюдалось и при лечении больных с различными злокачественными новообразованиями. Herch e. a. (1965) вводили им противоопухолевые вещества, а затем подкожно 0,1 мл антигена бактериального происхождения. Обнаружено, что внутривенная инъекция метатрексата в различных комбинациях полностью угнетает антителообразование в 50—71% случаев; преднизолона, 6-меркаптопурина и винкристина — в 60% случаев. При этом степень подавления формирования антител не соответствует токсичности препарата. Химиотерапия не влияет на титры изоантител или на ранее возникшую гиперчувствительность. Mitchell e. a. (1970) вводили 11 больным с метастатической аденокарциномой желудка, легкого, толстой кишки и мочевого пузыря внутривенно в течение 11 дней 5-фторурацил в дозе 10 мг/кг. В день назначения препарата больных иммунизировали Vi-антигеном Ersherichia coli и столбнячным анатоксином. Кроме того, ставили кожную реакцию гиперчувствительности к 2,4-динитрохлорбензолу, микроорганизмам (Candida, возбудитель свинки) и туберкулину. Изучали действие 5-фторурацила на выработку гуморальных антител и развитие РГЗТ (в качестве контроля исследовали 8 больных раком и 8 здоровых лиц, получавших препарат). У 10 человек после введения 5-фторурацила практически не вырабатывались антитела к антигену; у 4 из 9— отмечено полное угнетение выработки антител в ответ на вторичную иммунизацию столбнячным анатоксином. У большинства получающих препарат человек разрешающая доза 2,4-динитрохлорбензола не вызывала кожной реакции. Таким образом, 5-фторурацил при этой схеме лечения ингибировал гуморальные и клеточные реакции иммунитета. Аналогичные результаты получены на здоровых добровольцах, которым вводили азотиоприт в течение 12 недель по 100 мг в день (Maibach, Epstein, 1965). На 7-й неделе им начинали вводить внутримышечно по 1 мл убитой чумной вакцины, а на 11-й — еще по 0,2 мл. Спустя 6 недель осуществляли контактную сенсибилизацию с помощью 2,4-динитрохлорбензола и паранитрозодиметиламина. В результате проведенных исследований выявили, что первичная реакция образования антител снижена незначительно. В то же время при повторной вакцинации добровольцев, принимавших химиопрепарат, вторичная реакция образования антител не возникала. Введение азотиоприта не влияло на контактную чувствительность, а также на способность индуцировать РГЗТ.

В последнее время появилось большое количество работ, в которых приводятся данные, полученные в результате изучения влияния антибластомных средств на уровень сывороточных иммуноглобулинов у больных раком, саркомами, острым лейкозом и лимфогранулематозом. В начале лечения иммуноглобулины были в норме почти у всех больных, а в процессе химиотерапии (в случаях ухудшения состояния и прогрессирования опухоли) у многих снизились как уровень иммуноглобулинов, так и число лей-

коцитов (ниже 1 500 мм³). Причем при использовании только одного химиотерапевтического агента этого не происходило, в то время как при полихимиотерапии уровень иммуноглобулинов падал особенно резко (Nigro e. a., 1970). Авторы считают, что действие химиотерапии на опухоль должно поддерживаться эффективной иммунобиологической реакцией организма. Если же эта реакция угнетается, то на рост опухоли воздействовать не удается.

В другой работе приводятся данные по изучению иммуноглобулинов у больных острой лейкемией в процессе интенсивной химиотерапии (Kelvey e. a., 1965). Согласно результатам этого исследования, при назначении метатрексата, 6-меркаптопурина или винкристина в различных комбинациях уровень IgG-глобулина снижается, в то время как IgM не изменяется. Seppala e. a. (1970) испытывали влияние ЦФ на содержание сывороточных иммуноглобулинов у больных с опухолями половых органов. Авторы отмечают неоднозначность полученных результатов. В одних случаях концентрация IgM, IgA и IgG уменьшалась, в других — наоборот, увеличивалась или оставалась без изменения. Аналогичны данные Dostalova e. a. (1970), которые пришли к выводу, что со стабилизацией опухолевого процесса титр иммуноглобулинов не меняется, однако содержание IgG повышается. В ряде случаев с благоприятным клиническим течением отмечены увеличение или устойчивость концентрации.

При выраженном прогрессировании болезни уровень IgG и IgM резко снижается. Обычно при лучевой и цитостатической терапии наблюдается некоторое уменьшение содержания IgG, но в 2 случаях лечения прорезидом отмечено его увеличение, а также улучшение состояния больных. При лечении 9 больных методом гормональной терапии (аговирин, стенолон) повышалась концентрация IgM. Иммунизация вакциной оказала стимулирующее влияние на выработку IgM у 9 из 20 человек (с клиническим улучшением — у 5), а у 9 — уровень IgM не изменился. Вакциной служила убитая формалином культура клеток эмбриона человека, к которой в процессе роста добавляли сыворотку опухолевых больных в предположении, что она может изменить антигенную структуру клеток.

Интересны результаты изучения влияния ЦФ на продукцию иммунных глобулинов in vitro лимфоидной тканью, полученной во время отторжения опухолевого трансплантата (Mildred, 1970). При трансплантации опухолевых клеток саркомы мышам линии $C_{57}BL/6$ вводили по 300 мг/кг ЦФ. На 4, 5, 7, 10. 12-е сутки после трансплантации у реципиентов удаляли регионарные лимфатические узлы, которые культивировали in vitro в течение 24—48 ч. Культуральную жидкость изучали при помощи микроиммуноэлектрофореза. Было показано, что ЦФ продлевает время выживания опухолевого трансплантата, а синтез IgM- и IgG-иммуноглобулинов начинается значительно позднее. IgG-иммуноглобулины не

определялись вплоть до 12-х суток после трансплантации опухолевых клеток.

Таким образом, все приведенные в этом разделе данные свидетельствуют о том, что противоопухолевые вещества в той или иной степени угнетают антителообразование, предупреждают развитие РГЗТ и реакции на аллотрансплантацию, то есть существенно изменяют иммунологическую реактивность организма.

Первые экспериментальные и клинические работы по изучению влияния противоопухолевых лекарственных веществ на синтез иммуноглобулинов у больных злокачественными новообразованиями показали, что антибластомные средства способны изменять баланс сывороточных антител как в сторону их уменьшения, так и в сторону увеличения. Этот факт сам по себе очень важен, так как от него в каждом конкретном случае зависит течение опухолевого заболевания: в одних случаях наблюдается стабилизация и регрессия, в других — усиление неопластического процесса.

Экспериментальные исследования Ray e. a. (1980) подтвердили эти выводы. Используя метод экстракорпоральной иммуноадсорбции IgG-антител у больной миеломой, они наблюдали снижение уровня IgG в крови втрое по сравнению с исходным. При этом отмечалось общее улучшение клинического состояния. Кроме того, появилась чувствительность опухоли к химиопрепаратам.

Иммуностимулирующий эффект цитостатиков

Иммунодепрессия — хорошо известный побочный эффект, вызванный действием цитостатиков и глюкокортикоидов, используемых в терапии рака. Тем не менее при определенных условиях некоторые цитостатики, например, ЦФ, или кортикостероиды, становятся стимуляторами иммуногенеза (Turk e. a., 1972; Kerckhaert, 1974; Lagrange e. a., 1974; Van Disk e. a., 1976). В серии работ было показано, что иммунодепрессанты не угнетают, а наоборот, усиливают продукцию антител у животных. И. Е. Ковалев с соавт. (1968) обнаружили, что сыворотка крови кроликов, получавших 6-меркаптопурин, обладает иммуностимулирующими свойствами, а в опытах на мышах после введения препарата наблюдалась гипертрофия иммунокомпетентных органов — тимуса и селезенки. Авторы полагают, что в самом действии цитостатических агентов заложен рано или поздно проявляющийся цитостимулирующий эффект. В исследовании Н. И. Белянчиковой (1969) было отмечено, что инъекция 5-фторурацила за 7 дней до иммунизации значительно, но кратковременно ускоряла продукцию антител, причем наиболее сильно повышался титр IgM-антител. При предварительном введении 5-фторурацила в другие сроки синтез антител усиливался резко, но более длительно. Одновременное применение препарата и антигена вело к повышению титра иммуноглобулинов за счет ускоренного образования IgM-

антител. Действие 5-фторурацила на синтез IgM- и IgG-антител зависело от времени введения его и антигена. На 5—7-й день после инъекции 5-фторурацила было также обнаружено интенсивное размножение бластов и плазматических клеток в лимфатических узлах. Аналогичный эффект стимуляции синтеза иммуноглобулинов IgG- и IgM-фракций, вызванный введением цитостатиков, описан в работе А. А. Буркина (1970).

Как уже отмечалось выше, у животных-опухоленосителей появляются *Т*- и *В*-супрессоры, усиливающие рост опухоли и процесс метастазирования (Fujimato e. a., 1976; Treves e. a., 1977). Особенно показательны исследования Gorczynsky (1974) и Kulbern e. a. (1974). Они отметили в лимфоидных тканях мышей-опухоленосителей возникновение *В*-супрессоров, угнетающих клеточные (опосредованные *Т*-клетками) иммунные реакции. Оказалось, что в клетках селезенки в ответ на стимуляцию ФГА в культуре in vitro синтез ДНК или белка не ускоряется. Однако при фильтрации этих клеток через колонки с кроличьими антителами против Ig мыши ответ на ФГА восстанавливается. Фракционирование скоростным осаждением позволяет выделить обладающие характеристиками *В*-лимфоцитов супрессирующие клетки, которые, будучи добавлены в культуру нормальных спленоцитов, подавляют ответ на ФГА. Следовательно, в процессе роста опухоли происходит постоянное изменение баланса и кооперации субпопуляций *Т*- и *В*-лимфоцитов.

Особый интерес представляют исследования Katz e. a. (1974) и Kerckhaer e. a. (1974), которые обнаружили, что ЦФ способствует элиминации супрессорных лимфоцитов, в то время как кортикостероиды увеличивают количество циркулирующих моноцитов. В данном случае можно предположить избирательность в отношении определенного клона лимфоидных клеток, активированного TSTA-антигеном: ЦФ угнетает популяцию лимфоидных клеток, вовлеченную в иммунологическую реакцию к TSTA-антигену, не затрагивая иммунологической реактивности организма-опухоленосителя в целом.

Иммуностимулирующий эффект (при определенной дозе и времени введения антигена) был зарегистрирован также по отношению к 6-тиогуанину, относящемуся к аналогам пуриновых оснований нуклеиновых кислот (Dijk e. a., 1978).

Большое практическое значение имеет работа Orbach-Arbouse e. a. (1978), изучивших влияние метатрексата на иммунный ответ организма. Следует отметить, что молекулярный механизм действия соединений этого ряда в биохимическом аспекте исследован достаточно хорошо, в то время как их влияние на клеточном уровне пока еще мало изучено. Авторы определяли реактивность клеток селезенки на ФГА у мышей, обработанных метатрексатом (в дозе 0,5 мг на массу мыши) или БЦЖ (в дозе 3 мг на массу мыши), инокулированными внутривенно за 14 дней до постановки опыта, а также комбинацией БЦЖ и метатрексата.

Проведенные эксперименты показали, что реактивность БЦЖ леченых мышей ниже, чем в контроле. В то же время реактивность клеток селезенки, взятых у мышей через 5 дней после инокуляции метатрексата или соединения БЦЖ и метатрексата, гораздо выше. Аналогичные данные были получены на другой модели при иммунизации мышей эритроцитами барана, однако в данном случае количественная характеристика реакций была ниже. Стимулирующий эффект метатрексата авторы объясняют его повреждающим действием на супрессорные клетки.

Таким образом, результаты исследований, проведенных на неопухолевых животных, дают возможность подойти более осмысленно к выбору схем иммунохимиотерапии злокачественных новообразований. Более того, доказано, что практически каждое иммунодепрессивное средство обладает иммуностимулирующим эффектом, который проявится в определенный промежуток времени. Введение цитостатических средств в организм опухоленосителя вызывает последовательную цепь молекулярных и клеточных изменений, в основу которых положен принцип конкурентного взаимодействия стимулирующих и супрессирующих факторов, а также принцип обратной связи. Учитывая подавляющее действие ЦФ на супрессирующие клетки *Т*-системы, можно полагать, что это приводит к стимуляции *Т*-киллеров или *Т*-хелперов.

Противоопухолевая резистентность

В настоящее время стало очевидным, что исход неопластического процесса зависит не только от прямого воздействия химиопрепаратов или лучевой энергии на опухолевую клетку, но и от их влияния на иммунокомпетентную систему организма. Подавление иммунологической реактивности организма может способствовать быстрой генерализации процесса за счет оставшихся жизнеспособными после проведенного лечения опухолевых клеток. Вот почему вопрос о влиянии антибластомных лекарственных средств на специфический противоопухолевый иммунитет и неспецифическую иммунологическую реактивность приобретает все большую актуальность. На VIII Международном противораковом конгрессе этой проблеме было уделено значительное внимание. Особый интерес представляет сообщение Konda e. a. (1963. 1964) об ускорении роста первичных опухолей и метастазов у больных раком в поздней стадии заболевания, леченных Тио-ТЭФом, актиномицином *Д* или ЦФ. Профилактическое применение (до перевивки опухоли) нитромина, 8-азогуанина и митомицина *С* также стимулировало рост саркомы Иосида и метастазов. В опытах Schmähl (1963) введение эндоксана и тренимона до перевивки опухоли усиливало метастазирование подкожно растущей опухоли (саркомы Иосида).

Все эти факты несомненно свидетельствуют о том, что инъек-

ция противоопухолевых препаратов до перевивки новообразований способствует ускорению неопластического процесса. Однако интерпретировать результаты опытов очень трудно, так как они велись на неинбредных и с длительно пассируемыми опухолями животных. Поэтому в данном случае можно утверждать, что под влиянием антибластомных средств происходит подавление лишь трансплантационного, а не специфического противоопухолевого иммунитета.

В работе Reiner, Southam (1966) было показано, что предварительная инокуляция ЦФ резко повышает процент успешных перевивок клеток саркомы 1-й генерации, индуцированной метилхолантреном в сингенной системе. Rosenau, Moon (1967) также отметили, что облучение всего организма дозой 200—300 Р, проведенное за 24 ч до трансплантации мышам индуцированной метилхолантреном опухоли, приводит к резкому ускорению роста опухолей. Несмотря на то, что эти работы выполнены в сингенной системе, по их результатам также нельзя судить о влиянии антибластомных средств на специфический противоопухолевый иммунитет. Это связано с тем, что опухолевые клетки инокулируются в неиммунный по отношению к данной опухоли организм, предварительно обработанный химиопрепаратами или лучевой энергией.

Ю. Н. Мольков (1965) исследовал действие сарколизина, аурантина, хризомаллина и оливомицина на противоопухолевый иммунитет у крыс, которых иммунизировали путем прививки под кожу хвоста карциномы Герена, карциносаркомы Уокера 256 или саркомы М-1. Было показано, что антибластомные препараты при их введении в терапевтических дозах не оказали существенного влияния на сформированный противоопухолевый иммунитет, а также не нарушали индукцию противоопухолевой резистентности. Л. Ф. Шарликова и Т. Л. Жданов (1959), изучая иммунитет у крыс после рассасывания саркомы 45 под влиянием сарколизина и допана, пришли к выводу, что в данном случае возможна реинокуляция опухоли, то есть иммунитет не возникает. А. Б. Сыркин с соавт. (1969, 1971) на той же саркоме 45, определяя действие сарколизина, асалина, асалея и алкирома, применяемых в различных дозах и режимах, показали, что при однократных введениях препарата (меньше максимально переносимых) можно получить резистентность ко вторичной инокуляции саркомы. Безуспешность повторной перевивки авторы связывают с активацией противоопухолевого иммунитета препаратами, инокулируемыми в оптимальных дозах. Результаты всех этих работ противоречивы, и следует особо подчеркнуть, что в них изучался, по существу, не опухолевый, а трансплантационный иммунитет.

Mihich (1967, 1969) обнаружил, что клетки линейно-специфической лейкемии L-1210, инокулированные сингенным мышам ДВА/2, обладают слабой иммуногенностью. Нелеченные мыши с L-1210 погибают через 6—8 дней после перевивки. Комбинирован-

ное применение диметилсульфоната (30 мг/кг в день) и арабинозил-цитозина (6 раз по 110 мг/кг в день) увеличивает продолжительность жизни до 50 дней. В этот период мыши резистентны к реимплантации лейкемических клеток, которая передается им методом пассивной иммунизации с переносом клеток селезенки, лимфатических узлов или сыворотки леченных мышей. Опыты на разных сублиниях животных показали, что кожные трансплантаты у леченных мышей ДВА/2 отторгаются быстрее, чем у контрольных. Если мышей ДВА/2 облучают тотально перед перевивкой L-1210 в дозе 300 рад, то препараты оказывают слабое действие и продолжительность жизни уменьшается вдвое. Автор считает, что при быстрорастущих перевиваемых опухолях (даже если они изогенны) нельзя исключить возможность иммунного ответа, который может определять конечный результат лечения, воздействуя на опухоль синергично с химиотерапией. В следующей серии экспериментов Mihich (1969) показал, что синергизм действия 6-меркаптопурина и иммунитета проявляется и в том случае, когда препарат оказывает иммунодепрессивный эффект. По мнению Bonmassar (1969), предварительная вакцинация убитыми опухолевыми клетками повышает эффективность химиотерапии. Он исследовал мышей Swiss, иммунизированных клетками карциномы Эрлиха, которые разрушены методом замораживания и оттаивания. Через 24 ч после инокуляции клеток автор вводил 200 мг/кг 8-азогуанина. При такой постановке опыта количество излеченных мышей достигло 80%. Лечение опухолевых животных 8-азогуанином было неэффективным. Иммунизация без препарата также не привела к излечению экспериментальных животных. Glyn e. a. (1969), используя сочетание ЦФ и клеток селезенки, иммунных к лимфоме Молони, в ряде случаев получили положительные результаты. Введение одного ЦФ увеличило продолжительность жизни мышей на 63%. Инъекция только иммунных клеток селезенки оказалась неэффективной. Неспецифическое воздействие Corynebacterium parvum, инокулированного через 2 дня после ЦФ, дало стойкую регрессию (до 70%) химически индуцированных опухолей мышей. Введение только стимулятора иммуногенеза или ЦФ вызвало лишь временное торможение их роста (Currie, Bagshive, 1970).

В. М. Бергольц с соавт. (1971) для лечения вирусного лейкоза Раушера и перевиваемого лейкоза гемоцитобластоза штамма Пуймана использовали разные комбинации ЦФ в дозе 250 мг/кг и адъюванта Фройнда (АФ) в дозе 0,1 мл, вводимых внутривенно. Было обнаружено, что однократное применение ЦФ лишь ненамного увеличило среднюю продолжительность жизни мышей BALB/c, инфицированных вирусом Раушера (на 157% в сравнении с контролем), в то время как различные соединения ЦФ и АФ способствовали значительному продлению их жизни (на 366—472%). При этом 60% мышей прожило до 4 мес, тогда как максимальный срок жизни в контроле не превышал 1 мес. Еще более

убедительные результаты были получены при лечении лейкоза Пуймана (Сухин с соавт., 1971). Используя то же сочетание ЦФ и АФ, авторы увеличили среднюю продолжительность жизни мышей до 80,2—90,9%, причем 30—42% подопытных животных прожили не менее 6 мес.

Заслуживает внимания попытка сочетанного воздействия химио- и иммунотерапии на лейкозный процесс у человека. Mathe e. a. (1967) подвергли неспецифической и специфической вакцинации больных острым лимфоидным лейкозом, находившихся в состоянии ремиссии и леченных химиопрепаратами. В первом случае реципиентам в качестве стимулятора вводили БЦЖ, во втором — лейкозные клетки, полученные от доноров в остром периоде заболевания и подвергнутые инактивации с помощью формалина или облучения. В том и другом случае отмечалась ремиссия, длившаяся 10—24 мес. Инъекция только химиопрепаратов вызывала ремиссию, не превышавшую 2—3 мес.

Исходя из предположения о ведущей роли лимфоцитов в иммунитете, некоторые исследователи предприняли попытку изучения влияния цитостатических лекарственных средств на клеточные факторы противоопухолевой резистентности. Было показано, что митомицин С или актиномицин Д в культуре тканей снимают противоопухолевую активность иммунных перитонеальных клеток, способствуя тем самым опухолевому росту (Hashimoto e. a., 1966). В то же время 6-меркаптопурин не воздействует на иммунные клетки даже в высоких концентрациях. Авторы объясняют этот факт резким уменьшением содержания ДНК и РНК в иммунных клетках, обработанных митомицином *С* и актиномицином *Д*, что снижает функциональную активность иммуноцитов. Эти данные согласуются с результатами, полученными Bloom e. a. (1964), которые пришли к выводу, что обработка иммунных лимфоцитов высокими концентрациями 6-меркаптопурина делает невозможным адаптивный перенос РГЗТ. Такой же способностью обладает актиномицин *Д* (Ihr, 1963; Weiler, 1964; Svehap, 1964). Ослабляющее действие преднизолона и больших доз облучения на цитотоксический эффект иммунных лимфоцитов было продемонстрировано в системе in vitro в работах Б. Д. Брондз, Л. М. Борисовой (1966); Rosenau, Moon (1966), а З. Г. Кадагидзе (1969) обнаружила подавление цитотоксичности неиммунных лимфоцитов, активированных метатрексатом.

В дальнейшей серии работ было показано, что неиммунные лимфоциты, обработанные метатрексатом, начинают разрушать опухолевые клетки-мишени (Свет-Молдавский, Кадагидзе, 1969; Кадагидзе, 1969). Для проверки этих результатов авторы попытались воспроизвести полученные данные in vivo. С этой целью лимфоциты, активированные метатрексатом в дозе 0,01 мкг/мл, смешивали с опухолевыми клетками и после инкубации в течение 45 мин при 37°*С* вводили животным. При такой постановке опыта лимфоциты оказывали статистически значимый противо-

опухолевый эффект. При этом подавление роста опухоли было более сильным, чем при прямом действии метатрексата, инокулированного вместе с опухолевыми клетками.

Таким образом, на основании вышеприведенных работ можно предполагать существование двух основных способов влияния антибластомных лекарственных средств на противоопухолевый иммунитет:

1. Синергизм или антагонизм действия лекарственных средств и факторов иммунологической защиты организма.

2. Способность препаратов снимать или снижать противоопухолевый или трансплантационный иммунитет.

В заключение важно отметить, что изучение влияния антибластомных лекарственных средств на иммуногенез перешло в новую фазу, когда исследование должно проводиться на уровне анализа субпопуляций *Т*- и *В*-лимфоцитов. Следует подчеркнуть, что почти все цитостатики препятствуют формированию иммунного ответа, то есть действуют во время индуктивной фазы. Если их вводить в продуктивной фазе, когда уже завершен процесс образования иммунного ответа, то эффективность иммунодепрессантов близка к нулю. Более того, зрелые антителообразующие клетки, как установлено, обладают уникальной резистентностью ко многим химическим и физическим воздействиям, например, к ионизирующему облучению (Манько, 1967).

На основании вышеизложенного можно допустить, что эффект цитостатиков развивается в основном на уровне распознавания антигенов и формирования иммунного ответа. Вместе с тем опыт показывает, что цитостатики, как правило, применяют в продуктивной фазе иммуногенеза, то есть тогда, когда в организме-опухоленосителе чаще всего доминируют *Т*- и *В*-супрессоры. С этим, возможно, и связан минимальный эффект многих противораковых средств. В том случае, если цитостатик способен подавить *Т*- и *В*-супрессоры, возможно положительное действие канцеролитических препаратов. Первостепенной задачей экспериментальной и клинической онкологии является поиск активных лекарственных средств, способных регулировать иммунологические реакции, нарушенные в процессе канцерогенеза.

Глава VIII

ТЕРАПИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ И ИММУННЫЙ ОТВЕТ ОРГАНИЗМА

В настоящее время химиотерапия злокачественных опухолей стала одним из признанных методов, имеющих свои теоретические основы и весомые практические достижения. Воздействие химиотерапии опухолей на *Т*- и *В*-клеточные системы иммунитета может способствовать как быстрой генерализации процесса за счет оставшихся жизнеспособными после проведенного лечения клеток, так и их регрессии.

Влияние различных доз антибластомных лекарственных средств на противоопухолевый эффект

До сих пор не достигнуто единого мнения о выборе оптимальных доз введения лекарственных препаратов. Это связано, возможно, с тем, что при анализе сравнительной эффективности различных методов лечения опухолей не учитывалось, как правило, иммуномоделирующее действие химиопрепаратов.

Большинство экспериментов по исследованию иммунодепрессивного влияния цитостатиков поставлено на безопухолевых животных, что лишает возможности ответить на вопрос: усиливается или ослабляется специфический противоопухолевый иммунитет под действием химиопрепаратов? В ряде работ действие химиопрепаратов изучалось при введении их до перевивки опухоли. Такая постановка экспериментов исключает возможность оценки воздействия антибластомных средств на состояние специфического противоопухолевого иммунитета.

Несмотря на большое количество экспериментальных и клинических исследований по химиотерапии злокачественных новообразований до сих пор отсутствует единое мнение о целесообразности применения высоких или низких доз цитостатиков. Существуют две диаметрально противоположные точки зрения относительно использования доз антибластомных средств. Одни авторы (Druckrey e. a., 1963; Гарин с соавт., 1965; Sears e. a., 1980) полагают, что лечение необходимо проводить ударными дозами анти-

бластомных средств при одновременном увеличении интервалов времени между введениями. При этом они исходили из экспериментальных наблюдений о том, что известное увеличение дозы препарата способно подчас значительно улучшить лечебный эффект.

Другие исследователи (Cudmore e. a., 1964; Mathe, 1969, 1970; Сыркин с соавт., 1969, 1970; Whitecar e. a., 1972; Гордиенко, Бергольц, 1973, 1977; Friend e. a., 1974; Working Party, 1974; Burge e. a., 1975; Зарецкий, Егоров, 1975; Looney e. a., 1980) рекомендуют применять средние и низкие дозы цитостатиков, которые, возможно, в меньшей степени подавляют иммунные реакции организма и в то же время достаточно эффективно тормозят опухолевый рост.

Проблема химиотерапии злокачественных опухолей неразрывно связана с проблемой подавления иммунитета. Многие антибластомные лекарственные средства обладают выраженным иммунодепрессивным действием, вызывая резкое угнетение лимфоидной ткани, что приводит к снижению синтеза гуморальных антител и *Т*-лимфоцитов. В то же время обнаружено, что не все стадии иммуногенеза одинаково чувствительны к влиянию химиотерапевтических веществ. В последние годы появляется все большее количество работ, которые свидетельствуют о том, что противоопухолевые лекарственные препараты при определенных дозах, режимах и длительности введения могут не только быть средствами терапии неопластического процесса, но и индуцировать развитие злокачественных опухолей. Можно полагать, что возникновение опухолей у лиц, получавших иммунодепрессивное лечение, связано с подавлением естественной резистентности, являющейся одним из факторов противоопухолевой защиты организма (см. главу III и IV). Проблема влияния различных доз, ритма и длительности введения противоопухолевых средств на организм-опухоленоситель представляет особую важность, так как от указанных факторов во многом зависит эффективность проводимого лечения.

Исследования показали, что малые дозы цитостатических препаратов способны не только не подавлять, но и усиливать иммунный ответ экспериментальных животных на тот или иной антигенный раздражитель (Schwartz, 1967). Установлено также, что метатрексат, актиномицин *Д* и митомицин *С* индуцируют летальное действие неиммунных лимфоцитов в отношении опухолевых клеток (Свет-Молдавский, Кадагидзе, 1968). Все эти и многие другие факты (см. главу VI) свидетельствуют о том, что небольшие дозы цитостатиков могут оказывать иммуностимулирующее действие на организм-опухоленоситель.

Ниже представлены некоторые результаты наших исследований (Гордиенко, Бергольц, 1973, 1974), касающиеся изучения влияния различных доз ЦФ на клеточный и гуморальный имму-

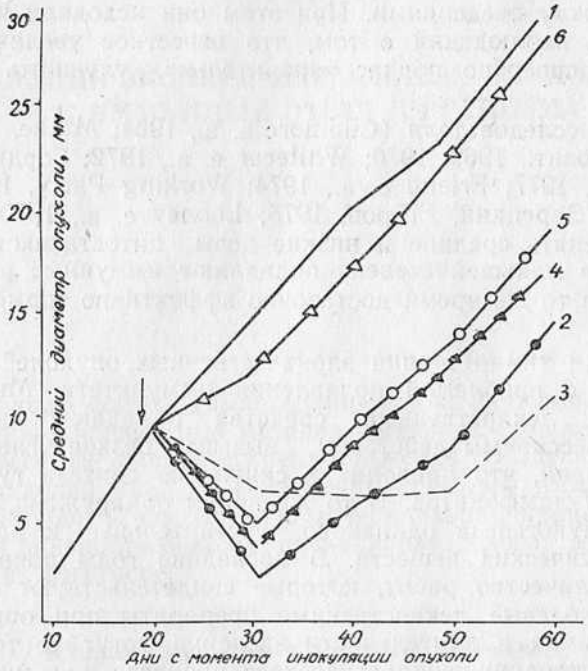


Рис. 1. Влияние однократного введения различных доз ЦФ на рост сингенной опухоли:
1 — контроль; *2* — 250 мг/кг; *3* — 100; *4* — 200; *5* — 150; *6* — 50 мг/кг

нитет у мышей с саркомой, индуцированной метилхолантреном, а также противоопухолевой активности этого препарата.

Мышам $C_{57}BL/6$ массой 18—20 г под кожу спины в дозе 1×10^5 были перевиты клетки саркомы, индуцированной метилхолантреном (1—3-й генерации). В первой серии опытов изучался противоопухолевый эффект ЦФ при его однократном введении внутривенно в различных дозах: 50, 100, 150, 200 и 250 мг/кг (при среднем диаметре опухоли 6—8 мм). Результаты экспериментов, представленные на рис. 1 и в табл. 4, показывают, что ЦФ вызывает выраженное торможение опухолевого роста при инъекции в дозах от 100 до 250 мг/кг, тогда как в дозе 50 мг/кг он приводит лишь к незначительному ингибированию развития опухоли. Через 12 дней после введения препарата наибольшее торможение опухолевого роста отмечено в группе мышей, получивших его в дозе 250 мг/кг. Значительное подавление происходило и при инокуляции 100 мг/кг ЦФ. Однако в дальнейшем рост опухолей при введении этой дозы замедлялся.

В результате опытов было установлено, что средняя продолжительность жизни мышей контрольной группы достигала 60 ± 5

Таблица 4. **Противоопухолевое действие ЦФ при его однократном введении в различных дозах мышам с саркомой, индуцированной метилхолантреном**

№ группы	Дозы ЦФ, мг/кг	Количество животных		Средняя масса опухоли, мг	Торможение роста опухоли на 12-е сутки после введения препарата, %	Продолжительность жизни животных, дни	Достоверность P
		всего	погибло				
I	Контроль	15	—	1200±166,8	—	60±5	—
II	50	15	—	739±35	26	67±6	Недостоверно
III	100	18	—	420±39,4	65	110±11,2	P<0,001
IV	150	18	—	330±41,2	73,3	82±8	P<0,001
V	200	18	—	290±29,4	75,8	90±7	P<0,001
VI	250	18	2	265±22,6	77,9	105±9	P<0,001

дней, животных, леченных ЦФ в дозе 50 мг/кг,—67±6, однако разница между этими группами была недостоверной (P>0,05). При более высоких дозах продолжительность жизни удалось увеличить до 200%, причем особенно эффективным было лечение препаратом в дозах 100 и 250 мг/кг.

Таким образом, проведенные исследования показали, что применение ЦФ в дозе 100 мг/кг оказывает такой же терапевтический эффект, как и в дозе 250 мг/кг.

Далее было изучено состояние трансплантационного иммунитета у мышей $C_{57}BL/6$ с перевитой саркомой 2-го пассажа. Животных распределили на 3 группы (по 12 в каждой) и проводили трансплантацию двух кожных лоскутов: от аллогенных (мыши C_3H) и сингенных (мыши $C_{57}BL/6$) доноров. I группа мышей была контрольной. II группе трансплантировали на спину кожный лоскут через 12 дней после инокуляции клеток саркомы, а III — через 20 дней.

В ходе экспериментов выявлено, что продолжительность жизни кожного лоскута у животных с опухолями различной величины не отличалась от контрольных цифр. Отторжение аллотрансплантатов во всех группах наступало на 8—10-е сутки после пересадки.

В третьей серии опытов было изучено влияние ЦФ при однократном введении в дозах 50, 100, 150, 200, 250 мг/кг на сроки отторжения кожного трансплантата у мышей с опухолью. Препарат вводился на следующий день после трансплантации кожного лоскута. Из табл. 5 видно, что ЦФ в дозах 50 и 100 мг/кг не увеличивает продолжительность жизни аллотрансплантата, в то время как дозы в 150, 200, 250 мг/кг снижают трансплантационный иммунитет и продлевают жизнь кожного лоскута соответственно до 13,8; 16,9 и 22 дней.

Таким образом, данные табл. 4 и 5 показывают, что ЦФ в дозе 100 мг/кг не угнетает трансплантационный иммунитет и в то же время эффективно тормозит опухолевый рост. Следовательно, можно допустить, что эта доза способствует более длительно-

Таблица 5. Влияние различных доз ЦФ на продолжительность жизни аллотрансплантата

№ группы	Дозы ЦФ, мг/кг	Количество животных		Продолжительность жизни кожного трансплантата, дни	Достоверность P
		всего	погибло		
I	Контроль	8	—	9,1±0,2	—
II	50	10	—	9,2±0,2	недостоверно
III	100	11	—	9,2±0,2	недостоверно
IV	150	13	—	13,8±0,6	$P<0,01$
V	200	12	—	16.9±0,8	$P<0,01$
VI	250	16	1	12±1,0	$P<0,001$

му торможению роста саркомы, индуцированной метилхолантреном, за счет опосредованного действия через иммунологическую систему организма. Чтобы проверить это предположение, были поставлены эксперименты с целью определения роли клеточных и гуморальных антител в регрессии опухолевого роста, вызван-

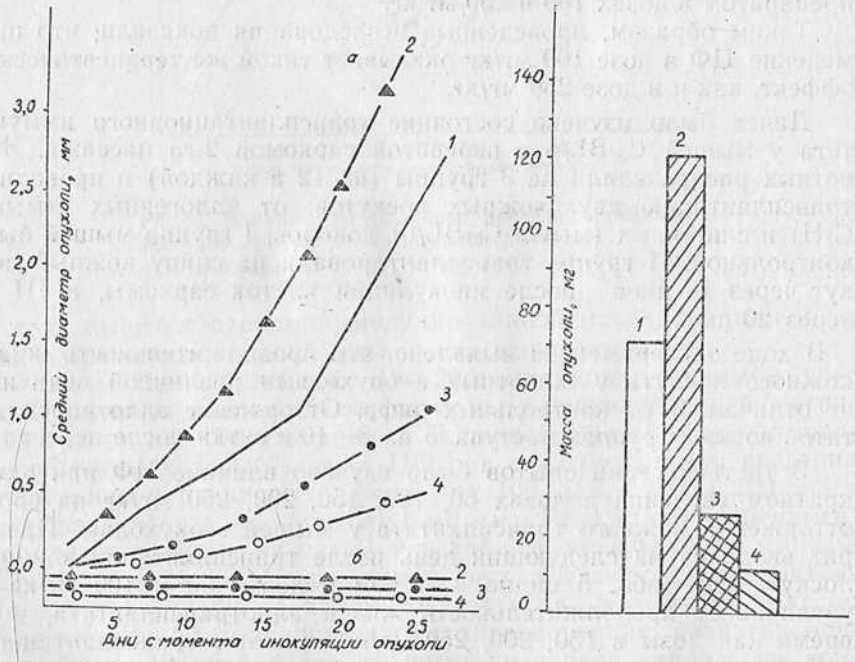


Рис. 2. Влияние гуморальных и клеточных антител опухоленосителя на рост МХ-саркомы при воздействии ЦФ в дозах 100 и 250 мг/кг (сыворотка и лимфоциты взяты на 4-е сутки после введения препарата):

а — сыворотка, *б* — лимфоциты; *1* — контроль; *2* — опухолевые клетки+ +сыворотка мышей-опухоленосителей; *3* — опухолевые клетки+сыворотка мышей-опухоленосителей, леченных ЦФ в дозе 100 мг/кг; *4* — то же, в дозе 250 мг/кг

Таблица 6. Влияние сыворотки мышей-опухоленосителей, леченных ЦФ, на рост саркомы*, индуцированной метилхолантреном (сыворотка взята через 4 дня после введения препарата)

№ группы	Инокулированный материал	Средняя масса опухоли, мг	Усиление (+) или ингибиция (−) опухолевого роста, %	Достоверность P
I	Опухолевые клетки	64,6±2,4		
II	Сыворотка интактных мышей+клетки МХ-саркомы	66,4±3,4	+2,79	P<0,05
III	Сыворотка опухоленосителя+клетки МХ-саркомы	113,4±2,68	+75,6	P<0,001
IV	Сыворотка опухоленосителя, леченного ЦФ в дозе 400 мг/кг+клетки МХ-саркомы	66,0±2,73	+2,17	P<0,05
V	Сыворотка опухоленосителя, леченного ЦФ в дозе 250 мг/кг+клетки МХ-саркомы	7,1±0,8	−90	P<0,001
VI	Сыворотка опухоленосителя, леченного ЦФ в дозе 100 мг/кг+клетки МХ-саркомы	24,3±2	−62,4	P<0,001
VII	Сыворотка интактных мышей, обработанных ЦФ в дозе 100 мг/кг+клетки МХ-саркомы	71,6±2	+10,8	0,2>P<0,1
VIII	Сыворотка интактных мышей, обработанных ЦФ в дозе 250 мг/кг+клетки МХ-саркомы	71,3±2	+10,5	0,2>P<0,1

* Под кожу спины введены опухолевые клетки в дозе 1×10^5 с 0,1 мл испытуемой сыворотки (то же в табл. 7—9).

ной инъекцией различных доз ЦФ. Исследование активности сыворотки и лимфоцитов велось через 4, 12, 24 и 45 суток после введения препарата.

Изучение цитотоксичности сыворотки in vivo при использовании ЦФ в дозах 100 и 250 мг/кг показало, что на 4-й день после введения препарата сыворотка мышей-опухоленосителей оказывала цитотоксическое действие на опухолевый рост, что выражалось в уменьшении массы опухоли на 10-й день после инокуляции клеток саркомы, предварительно инкубированных с испытуемой сывороткой, а также в замедлении темпа ее роста (рис. 2, табл. 6). С увеличением дозы препарата до 250 мг/кг цитотоксичность сыворотки увеличивалась. Интересно отметить, что сыворотка мышей, получивших летальную дозу (400 мг/кг), не оказывала влияния на развитие опухоли (средняя масса опухоли в контрольной группе не отличается от экспериментальной). Между тем сыворотка мышей-опухоленосителей, не обработанных препаратом, оказывала стимулирующее действие.

Через 12 дней после введения ЦФ во всех группах мышей сыворотка сохраняла цитотоксические свойства (табл. 7).

Через 24 и 45 суток после инокуляции цитостатика был обнаружен парадоксальный факт: сыворотка опухолевых животных,

Таблица 7. **Влияние сыворотки мышей-опухоленосителей, леченных ЦФ в дозах 100 и 250 мг/кг, на рост саркомы, индуцированной метилхолантреном (сыворотка взята через 12 дней после введения препарата)**

№ группы	Инокулированный материал	Средняя масса опухоли, мг	Усиление (+) или ингибиция (—) опухолевого роста, %	Достоверность P
I	Сыворотка интактных мышей+клетки МХ-саркомы	74±2,45	—	—
II	Сыворотка опухоленосителя+клетки МХ-саркомы	122,5±4,12	+65	P<0,001
III	Сыворотка опухоленосителя, леченного ЦФ в дозе 250 мг/кг+клетки МХ-саркомы	21,6±1,07	—72	P<0,001
IV	Сыворотка опухоленосителя, леченного ЦФ в дозе 100 мг/кг+клетки МХ-саркомы	33,3±1,27	—55	P<0,001

получивших препарат в дозе 250 мг/кг, теряет цитотоксическую активность и приобретает стимулирующее действие на опухолевый рост (табл. 8, 9), которое в этой группе мышей более выражено, чем у животных, леченных указанным препаратом в дозе 100 мг/кг.

В опытах по изучению влияния ЦФ на цитотоксический эффект (ЦЭ) иммунных лимфоцитов в сингенной системе были использованы те же мыши, от которых брали сыворотку. Лимфоциты получали из регионарных лимфоузлов на 4, 12, 24 и 45-е сутки после однократного введения цитостатика в дозах 100 и 250 мг/кг, трижды отмывали в среде 199, смешивали с клетками МХ-саркомы в соотношении 200:1, после чего смесь вводили под-

Таблица 8. **Влияние сыворотки мышей-опухоленосителей, леченных ЦФ в дозах 100 и 250 мг/кг, на рост саркомы, индуцированной метилхолантреном (сыворотка взята через 24 дня после введения препарата)**

№ группы	Инокулированный материал	Средняя масса опухоли, мг	Усиление (+) или ингибиция (—) опухолевого роста, %	Достоверность P
I	Сыворотка интактных мышей+клетки МХ-саркомы	72,4±2,93		
II	Сыворотка опухоленосителя, леченного ЦФ в дозе 250 мг/кг+клетки МХ-саркомы	114,5±2,45	+58	P<0,001
III	Сыворотка опухоленосителя, леченного ЦФ в дозе 100 мг/кг+клетки МХ-саркомы	104,2±3,07	+44	P<0,001
IV	Сыворотка опухоленосителя+клетки МХ-саркомы	126,4±4,0	+75	P<0,001

Таблица 9. Влияние сыворотки мышей-опухоленосителей, леченных ЦФ в дозах 100 и 250 мг/кг, на рост саркомы, индуцированной метилхолантреном (сыворотка взята через 45 суток после инокуляции препарата)

№ группы	Инокулированный материал	Средняя масса опухоли, мг	Усиление (+) или ингибиция (−) опухолевого роста, %	Достоверность P
I	Сыворотка интактных мышей+клетки МХ- саркомы	73,2±2,26		
II	Сыворотка опухоленосителя+клетки МХ-саркомы	112±3,3	+53	P<0,001
III	Сыворотка опухоленосителя, леченного ЦФ в дозе 100 мг/кг+клетки МХ-саркомы	129±4,03	+76	P<0,001
IV	Сыворотка опухоленосителя, леченного ЦФ в дозе 250 мг/кг+клетки МХ-саркомы	166±4,0	+128	P<0,001

кожно интактным изологичным мышам. Результаты опытов представлены на рис. 3 и в табл. 10, из которых видно, что ЦФ в дозах 100 и 250 мг/кг, так же как и лимфоциты интактных мышей, не получавших препарат, не изменяли скорости опухолевого роста. Лимфоциты мышей-опухоленосителей, полученные на 4-е сутки

Таблица 10. Цитотоксический эффект лимфоцитов интактных мышей и опухоленосителей, не обработанных и обработанных ЦФ

№ группы	Инокулированный материал	Средняя масса опухоли, мг	Цитотоксический индекс	Достоверность P
I	Контроль (клетки МХ-саркомы*)	80,4±5,8		
II	Клетки МХ-саркомы+лимфоциты интактных мышей	73,5±4,0	0,1	недостоверно P<0,05
III	Клетки МХ-саркомы+лимфоциты интактных мышей, инокулированных ЦФ в дозе 100 мг/кг	76,8±4,6		недостоверно P<0,05
IV	Клетки МХ-саркомы+лимфоциты интактных мышей, инокулированных ЦФ в дозе 250 мг/кг	83±6,1		недостоверно P<0,05
V	Клетки МХ-саркомы+лимфоциты опухоленосителя, леченного ЦФ в дозе 100 мг/кг	—0—	1,0	P<0,001
VI	Клетки МХ-саркомы + лимфоциты опухоленосителя, леченного ЦФ в дозе 250 мг/кг	—0—	1,0	P<0,001
VII	Клетки МХ-саркомы + лимфоциты опухоленосителя, леченного ЦФ в дозе 400 мг/кг	32±3,6	0,6	P<0,001
VIII	Клетки МХ-саркомы + лимфоциты опухоленосителя	—0—	1,0	P<0,001

* Под кожу спины введены опухолевые клетки в дозе 1×10^5 в смеси с лимфоцитами в дозе 2×10^7.

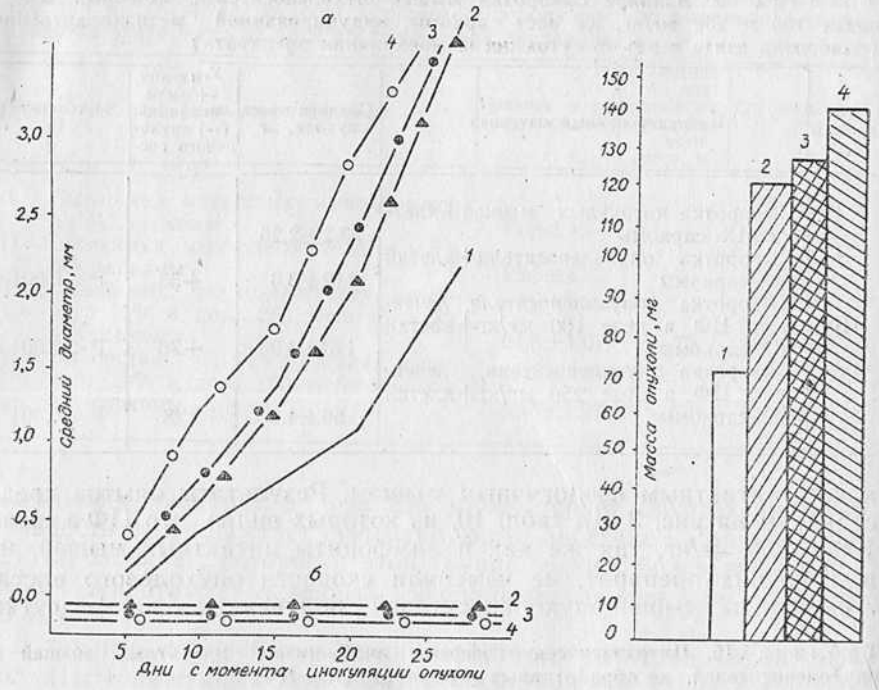


Рис. 3. Влияние гуморальных и клеточных антител опухоленосителя на рост МХ-саркомы при воздействии ЦФ в дозах 100 и 250 мг/кг (сыворотка и лимфоциты взяты на 45-е сутки после введения препарата):

а — сыворотка, *б* — лимфоциты; *1* — контроль; *2* — опухолевые клетки+сыворотка мышей-опухоленосителей; *3* — опухолевые клетки+сыворотка мышей-опухоленосителей, леченных ЦФ в дозе 100 мг/кг; *4* — то же, в дозе 250 мг/кг

после введения ЦФ в вышеперечисленных дозах, а также лимфоциты опухоленосителей, которым не применяли его, оказывают выраженный ЦЭ на клетки саркомы. Аналогичный эффект был зарегистрирован при исследовании цитотоксичности иммунных лимфоцитов мышей с МХ-саркомой на 12, 24 и 45-е сутки после введения ЦФ в дозах 100 и 250 мг/кг.

Снижение ЦЭ лимфоцитов было отмечено только в группе мышей, которым инъецировали летальную дозу препарата (400 мг/кг).

Нами было проведено исследование состояния специфической противоопухолевой резистентности у опухолевых мышей, леченных ЦФ в различных дозах. С этой целью через 4 дня после введения препарата мышам вводили минимальную прививочную дозу клеток саркомы (1×10^5). Из табл. 11 видно, что в контрольной группе животных с опухолью, не получивших ЦФ, резистентность отсутствует: прививаемость опухоли при ее реинокуляции достигает 100%. В группах мышей-опухоленосителей, леченных

Таблица 11. Прививаемость реинокулированной саркомы*, индуцированной метилхолантреном, на мышах $C_{57}BL/6$ через 4 дня после однократного введения различных доз ЦФ

№ группы	Дозы ЦФ, мг/кг	Результаты реинокуляции опухоли. Отношение количества мышей с опухолью к общему количеству мышей в группе	
		опыт	контроль
I	Контроль (мыши с опухолью, без лечения)	7/7	3/3
II	100 (мыши с опухолью)	1/9	4/4
III	250 (мыши с опухолью)	2/13	4/4
IV	100 (мыши без опухоли, контроль)	10/10	4/4
V	250 (мыши без опухоли, контроль)	10/10	4/4

* Под кожу спины введены опухолевые клетки в дозе 1×10^5.

ЦФ в дозе 100 и 250 мг/кг, вторичная инокуляция опухоли в большинстве случаев не удалась, в то время как у мышей без опухоли, обработанных этим препаратом в указанных дозах, инокуляция клеток саркомы способствовала развитию неопластического процесса. Эти данные свидетельствуют о том, что ЦФ усиливает специфическую противоопухолевую резистентность.

Таким образом, результаты проведенной работы на модели полной генетической однородности опухоли и реципиента показали, что ЦФ при однократном введении в дозе, в 2,5 раза меньшей максимально переносимой, вызывает выраженное торможение роста саркомы, индуцированной метилхолантреном. Следует отметить, что с увеличением дозы цитостатика от 100 до 250 мг/кг продолжительность жизни мышей с опухолями не возрастает.

Данные, полученные в результате изучения цитотоксичности иммунных лимфоцитов мышей с МХ-саркомой, леченных ЦФ в дозе 100 и 250 мг/кг, свидетельствуют о том, что клеточные факторы противоопухолевого иммунитета сохраняют активность в условиях влияния максимально переносимых доз цитостатика, в то время как сыворотка изменяет свои свойства, что выражается в последовательной потере стимулирующих рост опухоли потенций, приобретении цитотоксической активности, а затем вновь в появлении стимулирующего действия.

Этот факт указывает на то, что ЦФ способствует постоянному изменению баланса *Т*- и *В*-клеточных систем иммунитета в организме мышей-опухоленосителей, при котором на первом этапе возможен синергизм действия цитостатика и факторов иммунной защиты, а впоследствии — их антагонизм.

Опыты по изучению влияния ЦФ на трансплантационный иммунитет показали, что в дозе 100 мг/кг он не оказывает иммунодепрессивного действия, а обладает выраженным противоопухолевым эффектом, тогда как его применение в дозе 250 мг/кг приводит к значительному подавлению трансплантационного иммунитета.

Очевидно, следует подбирать такие дозы цитостатика, которые, не обладая иммунодепрессивным действием на трансплантационный иммунитет, оказывали бы выраженный противоопухолевый эффект.

Учитывая вышеизложенное, была предпринята новая серия экспериментов, направленных на выяснение механизма противоопухолевого действия ЦФ, то есть оказывает ли он прямое воздействие на неопластические клетки или же опосредованное через иммунную систему организма. С этой целью С. П. Гордиенко, Г. М. Сухин и В. Е. Бергольц (1973) использовали другой штамм опухоли, который оказался чрезвычайно чувствительным к данному препарату. Опыты проводили на мышах-самцах линии СВА массой 16—18 г. Полиморфноклеточная саркома, индуцированная обезьяньим аденовирусом SA7 (C8), была предоставлена нам В. С. Ерховым (лаборатория вирусологии МНИОИ им. П. А. Герцена). В экспериментах использовали первые ее генерации. Уровень гуморальных антител определяли по бляшкообразующей активности клеток селезенки в реакции Ерне. Тест-антигенами служили бараньи эритроциты. Цитотоксичность иммунных лимфоцитов и гуморальных антител в отношении клеток сингенной опухоли выявляли методом Winn (1961). Противоопухолевую резистентность тестировали путем реинокуляции минимальной (1×10^5) прививочной дозы опухолевых клеток через 4 суток после введения ЦФ в дозе 200 мг/кг.

Все вышеперечисленные методы исследований были использованы на трех группах мышей: I — без опухоли (контроль); II — с опухолью; III — с опухолью, леченные ЦФ в дозе 200 мг/кг однократно.

В проведенных нами экспериментах было установлено, что однократное введение ЦФ в дозе 200 мг/кг мышам с саркомой SA7 (C8) способствует полной ее регрессии, в то время как нелеченные мыши в 100% случаев погибают от прогрессивного роста опухоли. Следовало выяснить, связана ли регрессия с непосредственным действием ЦФ на опухоль или же этот эффект обусловлен активизацией противоопухолевого иммунитета. С этой целью через 48 ч после введения ЦФ саркома была оперативно удалена в стерильных условиях и перенесена мышам без опухоли, получившим препарат в те же сроки, что и мыши с опухолью. Результаты опытов оказались парадоксальными: наличие ЦФ, но отсутствие противоопухолевого иммунитета, который формировал-

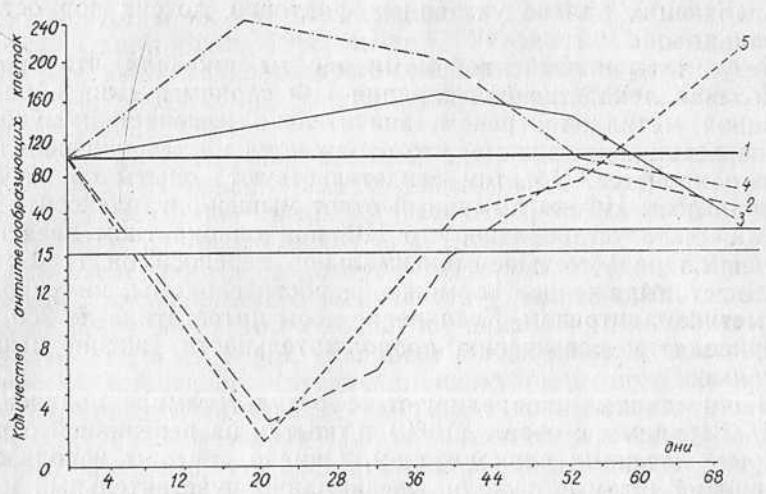


Рис. 4. Количество антителообразующих клеток во всей селезенке и в 1×10^6 ее клетках, %:

1 — контроль (СВ); *2* — в 1×10^6 клеток (опухоль+ЦФ); *3* — в 1×10^6 клеток (опухоль); *4* — во всей селезенке (опухоль); *5* — во всей селезенке (опухоль + ЦФ)

ся в ходе развития опухоли, привели к прогрессивному ее росту и гибели всех экспериментальных животных. Следовательно, можно предположить, что регрессия саркомы SA7 (C8) зависит не только от действия самого цитостатика на опухолевую клетку, но и от его влияния на регулирующие механизмы противоопухолевого иммунитета. Следующий этап работы был посвящен выяснению этого вопроса.

Определение уровня гуморальных антител в реакции Ерне показало (рис. 4), что однократное введение ЦФ мышам-опухоленосителям в дозе 200 мг/кг приводит к значительному снижению числа гемолизинпродуцирующих клеток в пересчете на всю селезенку, а также в пересчете на ее 10^6 клеток. Исследованием этих же показателей у мышей-опухоленосителей было установлено значительное увеличение гемолизинпродуцирующих клеток на ранних этапах роста опухоли, а уменьшение их числа — перед гибелью животных. Аналогичные данные были получены позднее Р. М. Хаитовым с соавт. (1976).

Изучение сыворотки и лимфоцитов подопытных мышей в цитотоксическом тесте показало ту же закономерность, которая была выявлена в тест-системе на мышах с МХ-саркомой.

Цель нашей работы — дифференцированный анализ иммунного ответа организма опухолевых животных при антибластомной химиотерапии. Важной практической задачей является выяснение синергизма или антагонизма химиотерапевтического воздействия и иммунной реакции хозяина. Между тем изучение условий,

определяющих баланс указанных факторов, до сих пор остается актуальным.

Результаты проведенной нами работы показали, что противоопухолевая лекарственная терапия ЦФ саркомы мышей, индуцированной метилхолантреном, значительно изменяет иммунологические реакции организма, что отражается на течении неопластического процесса. Об этом свидетельствуют опыты по изучению влияния дозы ЦФ на иммунный ответ мышей-опухоленосителей.

Так, было установлено, что ЦФ при однократном введении в дозе в 2,5 раза меньше максимально переносимой (100 мг/кг) оказывает выраженное торможение роста саркомы, индуцированной метилхолантреном. Увеличение дозы цитостатика до 250 мг/кг не приводит к повышению продолжительности жизни мышей с опухолью.

Наши данные коррелируют с результатами, полученными А. Б. Сыркиным с соавт. (1969) в опытах на перевивной саркоме 45 крыс, леченных сарколизином. Однако авторы использовали перевивной штамм опухоли, чрезвычайно чувствительный к сарколизину, поэтому, возможно, полная излечимость крыс достигала 100% случаев. В наших экспериментах был исследован штамм саркомы, индуцированной метилхолантреном, у мышей $C_{57}BL/6$. Применение ЦФ в дозах 100 и 250 мг/кг не приводило к полной регрессии опухоли, однако процент торможения ее роста был достаточно выраженным.

Чрезвычайно важным является то, что ЦФ в дозе 100 мг/кг не оказывает депрессивного действия на трансплантационный иммунитет, в то время как препарат в дозе 250 мг/кг приводит к значительному его подавлению. Эта особенность ЦФ ранее была описана Mathe e. a. (1968). Авторы показали, что ЦФ в дозе 134,5 мг/кг не оказывает депрессивного действия на трансплантационный иммунитет мышей. В то же время однократная инъекция препарата в дозе 403,4 мг/кг достоверно удлиняла продолжительность жизни аллотрансплантата. Этими же авторами было показано, что между силой терапевтического эффекта и иммунодепрессивным действием нет параллелизма.

С. П. Гордиенко и В. М. Бергольц (1973) показали, что ЦФ в дозе 250 мг/кг значительно снижал трансплантационный иммунитет, в то время как его влияние на специфический противоопухолевый иммунитет (судя по цитотоксичности иммунных лимфоцитов) не было обнаружено. Можно полагать, что ЦФ не снижает цитотоксичность иммунных лимфоцитов в связи с тем, что его влияние на продуктивную фазу иммунного ответа минимально (Sterlz, 1960), а организм-опухоленоситель находился именно в этой фазе иммуногенеза.

В опытах с кожной трансплантацией ЦФ вводился через 2 дня после пересадки кожного лоскута, то есть в индуктивную фазу иммунного ответа, когда начинается активный синтез антител, сопровождающийся бурной пролиферацией антителообра-

зующих клеток и их предшественников (Dutton, Mishell, 1967; Srenberg, Cunningham, 1968; и др.). Указанный период весьма уязвим для иммунодепрессивного действия ЦФ, поражая в бóльшей степени бласты, чем зрелые лимфоциты (Miller, Cole, 1967; Aisenberg, Davies, 1968).

Согласно литературным данным, антибластомные лекарственные средства, оказывая иммунодепрессивное действие, могут приводить к усилению неопластического процесса (Franz e. a., 1963; Reiner e. a., 1965; Petrany e. a., 1969; и др.).

Наши эксперименты, в которых изучалось состояние специфического противоопухолевого иммунитета у мышей с МХ-саркомой, леченных ЦФ в дозах 100 и 250 мг/кг, показали, что ЦФ не только не угнетает, а наоборот, усиливает специфическую противоопухолевую резистентность (вторичная инокуляция опухолевых клеток в большинстве случаев не удалась, в то время как у мышей с опухолью, не получивших ЦФ, резистентность отсутствовала).

Можно полагать, что отсутствие корреляции наших данных с литературными связано с различными экспериментальными условиями. Так, указанные выше авторы инокулировали опухолевые клетки в неиммунный по отношению к опухоли организм, предварительно обработанный химиопрепаратами или лучевой энергией. В наших же опытах ЦФ вводился в организм-опухоленоситель, иммунный к изологичной опухоли.

Изучение влияния ЦФ на свойства сыворотки мышей с опухолями показало, что однократное введение препарата в дозе 100 и 250 мг/кг способствует тому, что сыворотка мышей с саркомой, индуцированной метилхолантреном, теряет способность стимулировать опухолевый рост и приобретает свойство цитотоксичности, которое исчезает через 24 суток после инокуляции препарата.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что в механизме регрессии и стимуляции неопластического процесса значительную роль играют иммунные реакции организма.

Исходя из факта, что гуморальные антитела блокируют антигенные детерминанты опухолевых клеток и не дают возможности иммунным лимфоцитам подавить клетку-мишень, можно представить себе следующий механизм смены регрессии на стимуляцию неопластического процесса под влиянием ЦФ: препарат, являясь иммунодепрессантом, приводит к угнетению синтеза IgM- и IgG-фракций антител, которые могут участвовать в обеих фазах опухолевого роста (Bubenik e. a., 1965; Bloom e. a., 1970; и др.). Эта депрессия, возможно, способствует освобождению детерминант опухолевых клеток от сывороточных антител, а иммунные лимфоциты, имея прямой доступ к клеткам-мишеням, вызывают их разрушение. Усиление же неопластического процесса проявляется в период восстановления гуморальных иммунологических реакций организма.

Подтверждением этой гипотезы служат исследования П. В. Сергеева с соавт. (1970), которые показали, что ЦФ в дозе 100 мг/кг

оказывает депрессивное действие на продукцию IgM- и IgG-иммуноглобулинов. Очевидно, противоопухолевый эффект этой дозы в наших экспериментах связан с указанной особенностью препарата, а отсутствие депрессивного влияния на трансплантационный иммунитет обусловлено различной степенью чувствительности клеточного и гуморального иммунитета к воздействию цитостатических агентов (Брондз, 1966; Santos, 1967; и др.).

Уместно вспомнить, что после введения ЦФ сыворотка опухолевых животных до 12-го дня обладала цитотоксическим свойством (без введения препарата она оказывала стимулирующий эффект). Этот факт, возможно, зависит от изменения баланса цитотоксических (IgM) и стимулирующих (IgG) фракций иммуноглобулинов в сторону относительного повышения содержания IgM-фракции. Если данное предположение правильно, то не исключено, что регрессия опухоли обусловлена синергичным действием клеточных и гуморальных факторов иммунитета совместно с цитостатиком.

Кроме того, установлено, что IgG регулирует пролиферацию *B*-лимфоцитов и *T*-киллеров, не влияя на цитолитическую способность последних. При этом он выступает как агент, устанавливающий соотношение между гуморальными и клеточными антителами. Из этого следует, что IgG может участвовать в механизме саморегуляции иммунной системы в качестве «реле». Блокада или активация IgG-иммуноглобулинов способна вызывать ослабление или усиление иммунного ответа, направить его по *T*- или *B*-клеточному пути. Учитывая, что иммунодепрессанты чрезвычайно активны по отношению к IgG-иммуноглобулинам, можно полагать, что регрессия или стимуляция опухолевого роста под действием противоопухолевых средств во многом зависит от их влияния на IgG-иммуноглобулины.

Подтверждением нашей гипотезы могут быть более поздние исследования Lagrange e. a. (1974), Mackaness e. a. (1974), которые отмечают не иммунодепрессивный, а иммуностимулирующий эффект химиотерапии. ЦФ, по их мнению, потенцирует иммунитет клеточного типа, позволяя *T*-лимфоцитам избежать блокирующего действия гуморальных антител. Именно этот факт был зафиксирован нами при исследовании клеточных и гуморальных факторов иммунитета в процессе химиотерапии ЦФ.

Интерес представляют данные, свидетельствующие о том, что некоторые цитостатики могут влиять на гуморальный иммунитет гораздо в бóльшей степени, чем на иммунитет клеточного типа. Это отмечалось при введении метатрексата с последующей через час инокуляцией 5-фторурацила (Di Lorenco e. a., 1974). Представленные результаты могут быть использованы при подборе различных вариантов цитостатиков с целью рациональной терапии солидных опухолей.

ЦФ, так же как и комбинация 5-фторурацила и метатрексата, обладает свойством уменьшать в определенных дозах выработку гуморальных антител, не влияя на иммунные лимфоциты (Turk,

Poulter, 1972; Turk e. a., 1972). Когда же усиливается опухолевый рост после введения ЦФ: в период депрессии или восстановления иммунного статуса опухоленосителя? Прежде чем ответить на этот вопрос, приведем результаты исследований Looney e. a. (1980), подтверждающие наши данные. Авторы изучали скорость развития солидной гепатомы 3924А, привитой инбредным крысам под влиянием ЦФ в тех же дозах (50, 100, 200 и 250 мг/кг), которые были использованы в наших опытах. В ходе проведенных экспериментов оказалось, что процесс торможения роста опухоли отличается лишь до 18-го дня с момента перевивки ее клеток, после чего у мышей, леченных препаратом в дозе 150 мг/кг, вновь начинается рецидив, протекающий с большей скоростью, чем у контрольных животных. Полученный феномен авторы объясняют ускорением синтеза ДНК, предшествующего увеличению пролиферации клеток опухоли.

Итак, на основании собственных результатов и литературных данных можно предположить, что введение ЦФ в организм-опухоленоситель изменяет поверхностные маркеры опухолевых клеток, а это приводит к усилению *Т*-клеточного иммунитета (Wender, 1980). Кроме того, ЦФ избирательно подавляет *Т*-супрессоры, угнетая *Т*-киллеры и *Т*-хелперы (Asherson, 1978). Следует учесть, что в этот же период, то есть до 12-го дня после введения препарата мышам с саркомой, индуцированной метилхолантреном, сыворотка приобретает цитотоксическое действие, теряя стимулирующий эффект. Всё вышеизложенное свидетельствует о том, что ЦФ — чрезвычайно активное средство, которое на первом этапе способно активировать иммунологические реакции за счет подавления факторов, стимулирующих рост опухоли. Однако это временное явление. В результате гибели опухолевых клеток и, возможно, лимфоидных элементов восстанавливается активность блокирующих факторов и *Т*-супрессов. В это же время начинается рецидив заболевания.

Таким образом, можно полагать, что рецидив заболевания начинается не в период иммунодепрессии, вызванной применением ЦФ, а в период восстановления иммунологической реактивности.

Ритм введения антибластомных лекарственных средств и их противоопухолевый эффект

В работах ряда авторов (Астрахан, 1962; Humphreus, Karrer, 1970; Mathe, 1970; Васильева, 1971; и др.) было установлено, что от изменения ритма инокуляции цитостатиков во многом зависит течение опухолевого процесса. В то же время в доступной литературе мы не могли найти данных, касающихся влияния ритмов введения ЦФ на иммунный ответ организма-опухоленосителя. Тем не менее эксперименты, поставленные на животных без опухолей, свидетельствуют о том, что антибластомные средства, в том числе

и ЦФ, в зависимости от дозы и ритма введения могут значительно изменять иммунологическую реактивность организма (Schwartz e. a., 1960; Nathan e. a., 1961; Santos, 1967; Going e. a., 1970; Сергеев с соавт., 1971; Буркин с соавт., 1971). Так, имеются данные о том, что ЦФ, метатрексат, 6-меркаптопурин и 5-фторурацил резко снижают число антителообразующих клеток и в первую очередь — продуцирующих IgG-иммуноглобулины, при этом количество IgM не изменяется (Blinkoff, 1964; Borel e. a., 1965; Santos, 1967). В то же время известно, что фракция IgG может участвовать в усилении опухолевого роста, а IgM — в его ингибиции.

С. П. Гордиенко, К. В. Боцманов и В. М. Бергольц (1971, 1974) предприняли попытку изучить влияние ритма введения ЦФ в дозе 100 мг/кг на противоопухолевый эффект и иммунный ответ мышей $C_{57}BL/6$ с саркомой, индуцированной метилхолантреном (1—2 генераций).

В первой серии опытов была изучена зависимость противоопухолевого эффекта ЦФ от частоты его инокуляции при одной и той же разовой дозе.

Животных распределяли на 5 групп:

I группа — контроль;

II группа — мыши, которым ЦФ вводился трехкратно 1 раз в 3 дня (суммарная доза 300 мг/кг);

III группе мышей ЦФ инъецировался пятикратно 1 раз в 10 дней (суммарная доза 500 мг/кг);

IV группе животных препарат применяли трехкратно 1 раз в 10 дней (суммарная доза 300 мг/кг);

V группе ЦФ инокулировался пятикратно 1 раз в 15 дней (суммарная доза 500 мг/кг).

Результаты этих экспериментов представлены в табл. 12, из которой видно, что в группе мышей, которым ЦФ вводили пятикратно с интервалом в 10 дней (суммарная доза 500 мг/кг), наступает полная регрессия опухоли в 100% случаев, в то время

Таблица 12. Влияние ритма введения ЦФ на выживаемость мышей с саркомой, индуцированной метилхолантреном

№ группы	Разовая доза ЦФ, мг/кг	Суммарная доза ЦФ, мг/кг	Число введений	Интервал между введениями, сутки	Терапевтический эффект		Гибель от токсического действия ЦФ, %	Достоверность P
					торможение опухолевого роста, %	рецидив, %		
I*	—	—	—	—	—	—	—	—
II	100	300	3	3	100	—	69,7	$P<0,01$
III	100	500	5	10	100	—	—	$P<0,001$
IV	100	300	3	10	66	34	—	$P<0,001$
V	100	500	5	15	60	40	—	$P<0,001$

* Контрольные животные погибли от прогрессивного опухолевого роста через 30±5 дней. Различия между IV и V группами недостоверны.

как при уменьшении дозы до 300 мг/кг полную регрессию удается вызвать у 66% экспериментальных животных, причем у 34% — возникают рецидивы.

В группе мышей, которым препарат инъецировали с интервалом в 3 дня (суммарная доза 300 мг/кг), регрессия опухоли отмечена у 100% выживших животных. Однако при этой схеме лечения зарегистрирован весьма высокий процент гибели мышей от токсического действия ЦФ (69,7). Иные результаты получены при инокуляции цитостатика с интервалом в 15 дней (суммарная доза 500 мг/кг): полная регрессия опухоли наблюдалась в 60% случаев. Рецидивы были у 40% животных.

Таким образом, результаты этих исследований, выполненных на модели полной генетической однородности опухоли и реципиента, показали, что меняя интервал между введениями одной и той же разовой дозы препарата, можно получить различный терапевтический эффект, вплоть до полного излечения. Оптимальным было введение ЦФ 1 раз в 10 дней пятикратно (суммарная доза 500 мг/кг).

Во второй серии опытов изучалось влияние на рост опухоли сыворотки и лимфоцитов, полученных у опухолевых животных в процессе лечения ЦФ, вводимым в различных ритмах. Опыты ставились следующим образом: к отмытой трипсинизированной клеточной суспензии добавляли испытуемую сыворотку или лимфоциты, смесь инкубировали в течение 1 часа при 37°С в термостате и затем инокулировали под кожу интактным изологичным мышам. Через 10 дней часть животных забивали и взвешивали опухоли во всех группах.

Результаты этих опытов, представленные в табл. 13, показали, что сыворотка мышей, которым ЦФ вводили 1 раз в 10 дней, оказывает выраженное цитотоксическое действие до тех пор, пока суммарная доза препарата не превышает 300 мг/кг, в то время

Таблица 13. Влияние сыворотки* мышей-опухоленосителей, леченных ЦФ с ритмом введения 1 раз в 10 дней (суммарная доза 500 мг/кг), на рост саркомы, индуцированной метилхолантреном**

№ группы	Сыворотка от мышей, мг/кг	Средняя масса опухоли, мг	Усиление (+) или ингибиция (—) опухолевого роста, %	Достоверность Р
I	Интактных	73,2±2,7		
	Получивших ЦФ			
II	1 раз (100)	23,3±2,1	—68	$P<0,001$
III	2 раза (200)	11,1±1,94	—84	$P<0,001$
IV	3 раза (300)	40,3±2,26	—45	$P<0,001$
V	4 раза (400)	76±3,08	+3,8	$P>0,5$
VI	5 раз (500)	77±4,37	+6,3	$0,5>P<0,2$

* Сыворотки брали у мышей на 4-й день после введения ЦФ.
** Под кожу спины введены клетки саркомы в дозе 1×10^5 с 0,1 мл испытуемой сыворотки.

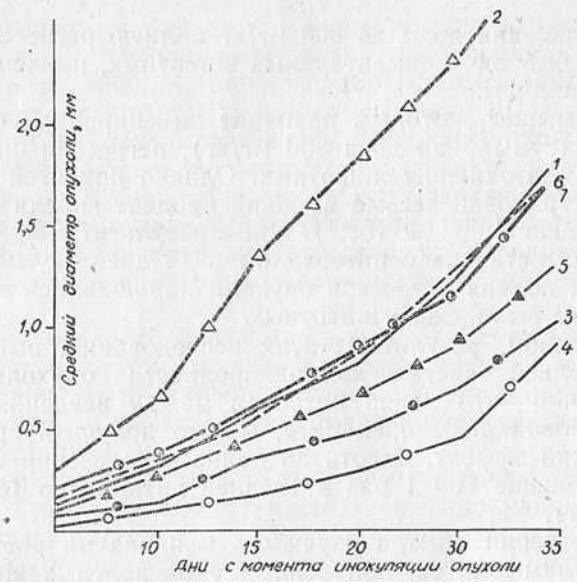


Рис. 5. Влияние ритма введения ЦФ на стимулирующие свойства сыворотки мышей с МХ-саркомой:

1 — клетки саркомы+сывэротка интактных мышей; *2* — клетки саркомы+сыворотка опухоленосителя; *3* — клетки саркомы+сыворотка опухоленосителя, леченного ЦФ в дозе 100 мг/кг; *4* — тэ же (ЦФ вводился 2 раза по 100 мг/кг); *5* — то же (3 раза по 100 мг/кг); *6* — то же (4 раза по 100 мг/кг); *7* — то же (5 раз по 100 мг/кг)

как при суммарных дозах 400 и 500 мг/кг она не влияет на рост опухоли. Сыворотка нелеченных мышей с опухолью вызывает значительную стимуляцию неопластического процесса (рис. 5). Аналогичный эффект наблюдался с сывороткой мышей, которым ЦФ вводился с интервалом в 15 дней.

Иные результаты получены в группе животных, которым препарат инъецировали 1 раз в 3 дня (суммарная доза 300 мг/кг). При такой постановке опыта сыворотка оказала цитотоксическое действие только при введении суммарной дозы ЦФ 100—200 мг/кг (табл. 14).

Изучение противоопухолевого влияния лимфоцитов мышей-опухоленосителей, леченных ЦФ, показало, что лимфоциты интактных животных не влияют на опухолевый рост, в то время как лимфоциты леченных мышей способствуют его ингибиции. Статистически достоверного различия между группами леченных мышей не получено: во всех случаях цитотоксический индекс был равен 1,0 (при условии введения 200 лимфоцитов на 1 опухолевую клетку).

В следующей серии опытов нами было изучено влияние ритма введения ЦФ на специфическую противоопухолевую резистент-

Таблица 14. Влияние сыворотки мышей-опухоленосителей, леченных ЦФ с ритмом введения 1 раз в 3 дня (суммарная доза 300 мг/кг)

№ группы	Сыворотка от мышей, мг/кг	Средняя масса опухоли, мг	Усиление (+) или ингибиция (—) опухолевого роста, %	Достоверность Р
I	Интактных	88,4±4,0		
	Получивших ЦФ			
II	1 раз (100)	22±1,1	—75	$P<0,001$
III	2 раза (200)	9,6±2,86	—95	$P<0,001$
IV	3 раза (300)	80,8±1,7	—8,7	$0,2>P>0,1$

ность. С этой целью через 35 суток после полного рассасывания опухолей всем группам мышей была инокулирована минимальная прививочная доза клеток (1×10^5) саркомы 2-го пассажа. Результаты экспериментов обобщены в табл. 15. Опыты показали, что вторичная инокуляция клеток саркомы мышам, леченным ЦФ с различным ритмом введения, была безуспешной.

Таким образом, оптимальной схемой лечения саркомы, индуцированной метилхолантреном, является пятикратное инъецирование препарата с интервалом в 10 дней (суммарная доза 500 мг/кг).

Исследование сыворотки, полученной от мышей, леченных ЦФ с различными ритмами введения, выявило, что препарат значительно изменяет ее свойства. Это выражается в потере стимулирующих рост опухоли потенций и приобретении цитотоксической активности, а после увеличения суммарной дозы ЦФ до 400 или 500 мг/кг сыворотка полностью утрачивает какое-либо действие на развитие опухоли. Подобный факт, очевидно, можно объяснить тем, что препарат в указанных дозах полностью подавляет гуморальный иммунный ответ. Сохранение цитотоксичности иммунных лимфоцитов и резистентности к реинокуляции саркомы, ин-

Таблица 15. Влияние ритма введения ЦФ на специфическую противоопухолевую резистентность*

№ группы	Разовая доза ЦФ, мг/кг	Суммарная доза ЦФ, мг/кг	Число введений	Интервал между введениями, сутки	Результаты реинокуляции опухоли. Отношение количества мышей с опухолью к общему количеству мышей в группе	
					опыт	контроль
I	100	300	3	3	1/6	3/3
II	100	500	5	10	1/18	4/4
III	100	300	3	10	0/13	3/3
IV	100	500	5	15	0/12	4/4

Мышам $C_{57}BL/6$ через 35 дней после регрессии саркомы, индуцированной метилхолантреном, вызванной инокуляцией ЦФ, введены под кожу спины опухолевые клетки в дозе 1×10^5 2-й генерации.

дуцированной метилхолантреном, свидетельствует о стойкости клеточных факторов противоопухолевого иммунитета к воздействию ЦФ.

Аналогичные результаты были получены Humphreus, Karrer (1970) при лечении ЦФ перевивной карциномы легких. Однако авторы не проводили иммунологических исследований.

Важно отметить, что интервал введения ЦФ в 10 дней позволяет увеличить суммарную дозу препарата до 500 мг/кг. Используя интервал в 3 дня, удается инокулировать суммарную дозу препарата лишь в 300 мг/кг. Причем наблюдается высокий процент гибели мышей от токсического действия цитостатика.

Это же отмечает В. А. Гришко (1964), который показал, что, хотя ЦФ имеет наилучшую степень обратимости токсического действия на кроветворение, а противоопухолевое действие его однократной дозы более продолжительно, чем у других препаратов, общетоксические свойства препарата обратимы очень медленно (на 12-й день).

Анализ эффективности ритма введения ЦФ и его суммарной дозы позволил выявить важное обстоятельство. При увеличении суммарной дозы препарата повышается процент излеченных животных. Думается, что это не только результат прямого действия ЦФ на опухолевую клетку, так как при исследовании влияния его однократных доз на ту же саркому, индуцированную метилхолантреном, не было обнаружено различия в противоопухолевом эффекте (в отношении продолжительности жизни экспериментальных животных) доз 100 мг/кг и 250 мг/кг. Видимо, имеет значение опосредованное влияние цитостатика (через иммунную систему хозяина) на опухоль.

Сохранение цитотоксичности иммунных лимфоцитов и резистентности к реинокуляции МХ-саркомы свидетельствует о стойкости клеточных факторов противоопухолевого иммунитета к воздействию ЦФ.

Эти данные коррелируют с результатами, полученными Б. Д. Брондзом (1966), который показал, что лимфоциты облученных мышей, иммунизированных саркомой МХ-1, сохраняют цитотоксические свойства при полном отсутствии в организме гуморальных антител к тем же антигенам. В этом отношении свойства противоопухолевого и трансплантационного иммунитетов идентичны. В частности, показано, что при повторной пересадке кожного лоскута цитостатические средства не увеличивают продолжительность жизни кожного трансплантата.

Представляется вполне вероятным, что в регрессии саркомы, индуцированной метилхолантреном, ЦФ и клеточные факторы иммунитета организма-опухоленосителя оказывают противоопухолевый эффект, действуя синергично.

Влияние хирургического лечения опухолей на иммунный ответ организма

Современная онкология характеризуется резким усилением интенсивности терапевтических воздействий. Когда-то единственный способ лечения опухоли — хирургический теперь комбинируется с лучевым, лекарственным или иммунотерапевтическим методами. Но все же хирургическое лечение злокачественных опухолей по-прежнему остается основным. При должном радикализме в ранних стадиях заболевания у значительного числа больных (70—80%) удается добиться стойкого выздоровления. В далеко зашедших стадиях развития злокачественных опухолей успехи хирургического лечения остаются, однако, более чем скромными.

Прилагается много усилий для поисков новых путей повышения хирургического радикализма, разработки способов, обеспечивающих максимальное сохранение и восстановление важнейших функций органов, создания новых действенных приемов уничтожения или резкого ослабления жизнеспособности остающихся необнаруженными после лечения опухолевых клеток.

Однако даже при сочетании современных методов лечения часто все же не удается предотвратить появления и развития рецидивов и метастазов опухолей. Поэтому одним из основных направлений в исследовании механизмов опухолевого процесса должно быть изучение факторов, влияющих на возникновение рецидивов и метастазов.

Способность к метастазированию — наиболеее характерный признак злокачественности, он имеет решающее клиническое значение. За 1961—1965 гг. среди умерших больных злокачественными опухолями (они составляют до 30% от общего числа умерших) отдаленные метастазы были обнаружены у 83% (Холдин, 1965). У больных, радикально оперированных по поводу рака кардиального отдела желудка, метастазы в лимфатические узлы выявляются в 46,2% случаев (Spath, 1964). Они возникают даже при плоскоклеточном раке кожи, если заболевание остается без лечения (38%) (Vilahava, 1964).

При наличии метастазов любое местное лечение опухолей безуспешно или же его эффективность невелика. Так, метастатическое поражение одних только регионарных лимфатических узлов в 1,7—2 раза снижает число излеченных больных раком прямой кишки (Холдин, 1962; Березкин, 1964). При наличии же отдаленных метастазов хирургическое удаление основного опухолевого узла считается нецелесообразным, и к операции прибегают только с паллиативной целью.

При оценке факторов, определяющих течение опухолевого процесса, следует учитывать не только наличие или отсутствие метастазов, но и состояние первичного опухолевого узла, реакцию его стромы и стромы метастазов, а также иммунологический статус организма-опухоленосителя.

В процессе роста опухоли отмечается известная этапность: первоначально она развивается локально, затем выходит за пределы органа и, наконец, наступает генерализация. Скорость и интенсивность развития опухоли, а также сроки появления метастазов не являются постоянными и неизменными. Многочисленные клинические и экспериментальные данные убеждают в существовании непрерывного взаимодействия между организмом и развивающейся в нем злокачественной опухолью. В разных организмах рост опухолей происходит с различной скоростью, даже если они клинически и гистологически сходны. Быстрый рост чередуется порой с периодами покоя, а иногда даже обратного процесса. Развитие опухоли можно охарактеризовать как итог неустойчивого равновесия между ней и организмом, которое, однако, в любой момент может быть нарушено, что определяется степенью антигенности самой опухоли и активностью противоопухолевых иммунологических реакций организма.

Факт стимуляции роста метастазов после удаления первичной опухоли известен давно. О нем знали Р. Вирхов и даже врачи древности, например, Гиппократ (Katz, 1951). Crile (1964) называет это «взрывной» способностью рака. Возникновение и развитие метастазов после операции подтверждено многими опытами, проведенными на животных (Соловьев, 1938; Lewis, Cole, 1958; Майский, Суворова, 1959; Ketcham e. a., 1961; и др.).

Основной моделью служила ампутация яичка у кроликов, конечности или хвоста у крыс (мышей) с привитой опухолью. Тщательное соблюдение принципов абластики и атравматичности операции не предупреждало ускорения роста метастазов. Удаление здоровой лапки, ложная операция, биопсия опухоли не оказывали такого стимулирующего влияния на метастазы, как ампутация лапки с опухолью (Schatten, Kramer, 1958; Green, 1960; Лазарев, 1962). Особенно значительная стимуляция метастазов отмечена при травме и частичной резекции опухоли (Wood e. a., 1954; Майский с соавт., 1959).

Ю. Н. Мольков (1953) показал, что хирургическая травма опухоли у мышей в 2—4 раза превышала митотический коэффициент опухолевой ткани и усиливала рост метастазов в регионарных лимфатических узлах. Эффект стимуляции сохранялся в течение 2 недель после вмешательства. По данным М. А. Воронцовой и И. В. Маркеловой (1954), процессы деструкции, сопутствующие травме опухоли, ускоряют деление клеток.

Существует мнение (Ketcham e. a., 1966), что эффект послеоперационной стимуляции метастазов в большей степени выражен при удалении у мышей перевиваемых опухолей, чем при экстирпации спонтанных и индуцированных. Иные результаты сообщает Ю. С. Кривошеин (1966). Опухоли печени крыс линии Вистар, индуцированные с помощью ДМБА, введенного внутримышечно в заднюю лапку, давали множественные метастазы, в случае же их перевивки здоровым реципиентам при 1-м пассаже

метастазирования не происходило, но при последующих — метастазы возникали, и их число по мере пассирования постепенно увеличивалось.

Отличия в реакции разных опухолевых штаммов на удаление первичного узла отмечены и по другим показателям. В одних случаях срок выживания оперированных и неоперированных животных был одинаков (Driessen e. a., 1965), а иногда в группе первых — даже меньше (Druckrey e. a., 1939; Green, Harvey, 1960), в других — летальный исход вследствие развития метастазов после удаления опухоли наступает позднее (Waksler e. a., 1966). Последнее особенно четко проявляется при удалении спонтанных и индуцированных опухолей (Ketcham e. a., 1966).

Обнаружено, что после удаления лапки с привитой опухолью 1241 у мышей увеличиваются как число, так и размеры легочных метастазов. Интересны опыты с прививкой хомячкам под кожу туловища лимфобластической лимфомы (Green, 1960). На 10-й день опухоль удалили, на 25-й — все оставшиеся в живых хомячки были забиты. В ходе экспериментов оказалось, что в контрольной группе животных, у которых опухоль не удаляли, метастазы были маленьких размеров и локализовались обычно в одном органе, а у хомячков, подвергшихся экстирпации, во всех внутренних органах, даже в костном мозге, обнаруживались крупные метастазы и, кроме того, образовались раковые выпоты в брюшной и грудной полостях.

С другой стороны, Ketcham e. a. (1961) и Wexler (1965), работавшие с опухолями мышей, наблюдали в аналогичном опыте увеличение размеров метастазов в легких, однако их было меньше, чем у неоперированных животных.

Ketcham e. a. (1966) установлено, что у мышей с удаленной опухолью между количеством метастазов в легких и их размером имеется прямая зависимость, а у мышей с интактной опухолью — обратная зависимость (чем больше объем отдельных метастазов, тем меньше их число). По-видимому, у оперированных мышей сразу после операции начинается одновременный рост всех метастазов. У неоперированных животных стартовый момент роста метастазов неодинаков: крупные метастазы, будучи более ранними по происхождению, тормозят развитие более поздних.

Наконец, выявляется различная «взрывная» способность опухоли в зависимости от сроков ее удаления. Большинство авторов (Karrer e. a., 1967) считают, что при бóльшем объеме удаленной опухоли, то есть при бóльшей длительности ее существования, опасность ускорения роста и увеличения числа метастазов возрастает. Наиболее убедительные данные получены Green (1960) в опытах на хомячках: при более позднем удалении опухоли — лимфобластической лимфомы — количество метастазов увеличивалось. Отсутствие метастазов у животных, оперированных на 4-–5-й день, свидетельствует о том, что опухолевые клетки лимфомы поступают в кровь не ранее 6—7-го дня опыта. Появившие-

ся у 30% оперированных хомячков рецидивы не изменяли частоты метастазирования по сравнению с животными без рецидива.

Однако А. А. Соловьев (1938), а позднее Н. А. Байда (1960) и многие другие убедительно показали в опытах на кроликах с привитой в яичко опухолью Брауна-Пирс, что ампутация яичка с опухолью сопровождается резкой стимуляцией метастазирования, когда она производится в первые 4 дня после прививки. Менее выраженный в этом отношении эффект получается при удалении яичка на 10—14-й день развития опухоли. Эти данные особенно озадачивают потому, что при гистологическом исследовании удаленная в ранние сроки (первые 2—4 дня) опухоль почти сплошь состоит из участков некроза.

Из этих материалов следует, что усиление метастазирования после удаления первичного узла определяется биологическими особенностями опухолевого штамма. Таким образом, дело не только в реакциях организма-опухоленосителя и поступлении в кровь большого количества опухолевых клеток в момент операции. Значение первичной опухоли и незначительная по сравнению с ее влиянием роль оперативного стресса в развитии метастазов определяются, например, в следующем опыте на хомячках с подкожным трансплантатом лимфобластической лимфомы, при удалении которой метастазы развивались в 62,7% случаев. Опухоль была привита хомячкам под кожу обеих аксиллярных областей. У всех хомячков отмечалась 100%-ная билатеральная приживаемость. Контрольным животным делали прививку на одной стороне туловища, хомячков с двойной опухолью либо не подвергали никаким воздействиям, либо на 10-й день удаляли у них одну из опухолей. На 30-й день все животные были забиты. В контроле метастазы наблюдали у 8,6% хомячков, у животных с двусторонней прививкой опухоли, не подвергшихся экстирпации одной из них, их вообще не было, а среди хомячков с удаленной опухолью метастазы имелись у 7,3%. Авторы этой работы Green и Harvey (1960) отмечают, что, по-видимому, большая масса опухоли оказывает более значительное ингибирующее влияние на развитие метастазов.

В заключение следует обратить внимание на то, что, согласно литературным данным, способность к метастазированию после удаления первичной перевиваемой опухоли зависит прежде всего от штамма опухоли, а также от условий ее роста. В еще бо́льшей степени это относится к спонтанным и индуцированным опухолям.

Аналогичная картина отмечается при анализе клинических наблюдений. О раннем появлении метастазов после оперативного удаления опухоли (рак молочной железы, хорионэпителиома матки, меланома, саркомы) сообщали Н. Н. Петров (1926), Г. А. Либерман (1934), А. Э. Мандельштам (1938), А. П. Шанин (1949), Schatten, Kremer (1958). Так же как и в эксперименте, грубая травма опухоли, ее нерадикальное удаление особенно сильно

стимулируют рост метастазов (Шанин, 1949; Мусина, 1964; Luppinger, 1964).

При нерадикальной экстирпации опухоли последующая рентгенотерапия не улучшает общих результатов лечения. Например, частота развития метастазов при нерадикальной тиреоидэктомии по поводу рака в 10 раз выше, чем у неоперированных больных (Luppinger, 1964).

В клинической практике также нередко обнаруживается зависимость стимуляции роста метастазов после удаления первичного очага от вида опухоли. Так, у человека особую склонность к метастазированию проявляют меланома, хорионэпителиома и др. Большую роль играет длительность существования опухоли к моменту операции. Это связано не только с состоянием иммунологических реакций больного, снижающихся по мере развития опухолевого процесса, но и с возникновением глубоких некрозов в «стареющей» опухоли.

Исходя из факта возможной стимуляции роста отдаленных метастазов после удаления первичной опухоли, можно заключить, что проведение «сверхрадикальных» операций не имеет особого смысла, тем более что они сопровождаются высокой послеоперационной летальностью или тяжелыми осложнениями. Именно эффектом послеоперационной стимуляции метастазирования можно объяснить тот факт, что за исключением некоторых локализаций (рак шейки матки и кожи) разница в показателях 5-летней выживаемости больных, оперированных в первые месяцы заболевания и леченных позднее, невелика. Это касается весьма распространенных форм, а именно рака желудка, яичника, молочной железы, а также остеогенной саркомы (Dunphy, 1953).

Следует указать, что оперированная экстирпация метастазов (в условиях уже удаленного первичного очага) также создает риск стимуляции других метастазов (Дымарский, 1965). Ту же мысль в отношении метастазов опухолей у животных высказывают Druckrey e. a. (1939) и Schatten (1958).

Очевидно, многие спонтанные опухоли, по крайней мере в первых стадиях, когда они не достигают больших размеров, не обладают «взрывной» способностью, и благодаря этому их оперативное лечение дает хорошие результаты, что отмечают многие клиницисты. В этом случае, если еще не развились отдаленные метастазы, полезны более радикальные операции. Такой концепции в отношении оперативного лечения рака молочной железы придерживается, например, Л. Ю. Дымарский (1966, 1980).

Одним из критериев, по которым можно в какой-то степени судить о «взрывной» способности рака определенной локализации, являются показатели 5-летней выживаемости больных, подвергшихся операции. Эти показатели отличаются известной стабильностью и зависят от локализации опухоли. Так, 5-летняя выживаемость при раке желудка составляет 32,7% (Clifton e. a., 1961),

толстого кишечника — 45 (Green, 1964), легких — 25,2 (Ball, 1961), молочной железы — 47,7% (Cliffton, 1961).

Однако связь между первичной опухолью и метастазами довольно сложная, так что послеоперационная стимуляция роста последних вовсе не является универсальным эффектом. В литературе неоднократно упоминались случаи рассасывания метастазов после оперативного удаления опухоли (Adlercreutz e. a., 1963; Fisher, 1965; Hannigan, 1966; и др.).

Чаще всего это происходит при хорионэпителиоме матки (Мандельштам, 1938; Miller e. a., 1962; Мусина, 1964) и гипернефроме (Graf, 1961), а также при опухолях яичников (Dunphy, 1953), желудка (Katz, 1951), костей (Jakoubkowa e. a., 1962).

Эти наблюдения носят в общем казуистический характер. Тем не менее подчеркивается, что изменения скорости роста самой опухоли и ее метастазов, например, прогрессирующее развитие одних метастазов и регрессия других, нередко расположенных по соседству, — довольно типичное свойство. Описаны случаи, когда паллиативная операция или частичная резекция опухоли, сделанная без всякой надежды на успех, приводила к длительной ремиссии или даже выздоровлению больного. По мнению Miller e. a. (1962), метастаз некоторое время находится под влиянием первичного очага, а затем его рост становится независимым. Если удалить первичную опухоль прежде, чем метастаз приобретает самостоятельность, последний подвергается обратному развитию.

В экспериментальных условиях, при которых основным объектом изучения являются перевиваемые, а не спонтанные опухоли, наблюдать регрессию метастазов после удаления первичной опухоли не удавалось. Имеются сведения, что удаление перевиваемой опухоли может способствовать уменьшению количества метастазов (Kinsey, 1961).

Заслуживают внимания данные Nakayama (1962). Мышам под кожу хвоста прививали асцитную гепатому МН 134. У одних животных на 4-й, у других — на 10-й день опыта хвосты ампутировали. На 14-й день все мыши, в том числе и контрольные, которым ампутация хвоста не производилась, были забиты. В контроле метастазы в лимфатические узлы брюшной полости обнаружены у 85,7% мышей; в группах с ампутацией хвоста на 4-й и 10-й дни — соответственно у 30 и 100% животных. Таким образом, «взрывная» способность опухоли зависит не только от ее вида. Вероятно, имеет значение соотношение между сроками операции и процессом диссеминации опухолевых клеток по организму. Если операция сделана, например, до диссеминации, «взрывная» способность опухоли не проявляется.

Представлены и другие данные, показывающие зависимость роста метастазов от состояния первичного очага и его размеров. Факты говорят о наличии определенной корреляции между величиной опухоли и развитием метастазов. Оказывается, опухоли,

достигающие очень больших размеров, мало метастазируют (Katz, 1951; Dunphy, 1953).

Внимание клиницистов больше обращено на обратную закономерность (экспериментаторы подобных сообщений не делали), выражающуюся в том, что маленькие по величине первичные опухоли обладают большой склонностью к метастазированию. Первичный диагноз нередко ставится по метастазам, и приходится прилагать много усилий, чтобы найти первичный очаг (Foulds, 1956).

Наглядным примером в этом отношении может служить злокачественная кожная меланома. При небольшой по величине удаленной опухоли у больных нередко наблюдается множество метастазов. Еще хуже обстоят дела у пациентов с остеогенной саркомой: они умирают от отдаленных метастазов, независимо от того, произведена ампутация или нет (Woodreff, 1976).

Предложенные различными авторами объяснения по поводу отношений между первичной опухолью и метастазами крайне противоречивы. Ряд авторов полагает, что при хирургическом удалении опухоли в кровь поступают белковые продукты распада опухолевой ткани и поврежденных тканей организма, которые и стимулируют рост метастазов (Майский с соавт., 1959). Но результаты многочисленных экспериментов, поставленных на животных в условиях минимальной травматичности операции (например, предварительная перевязка сосудов яичка или хвоста с подкожно инокулированной опухолью), свидетельствуют о том, что данный фактор не имеет решающего значения. Этому противоречат и опыты, подтвердившие, что ложная операция, например, разрез кожи над опухолью, удаление здоровой лапки и т. д., не стимулирует развития метастазов.

Значение другого фактора — поступления в кровь большого числа опухолевых клеток в момент операции — опровергается такими же доводами, поскольку эксперименты проводились в условиях строгой абластики. Кроме того, по мнению многих авторов (Грех, Яковлева, 1966; и др.), корреляция между циркуляцией опухолевых клеток в крови и возникновением метастазов весьма относительна.

Следует отметить, что такого рода объяснения, как попадание опухолевых клеток в кровь, большая продолжительность жизни оперированных животных, влияние стресса, наркоза, кровотечений во время операций (Wood e. a., 1954) не должны переоцениваться, поскольку, как было сказано, ложные операции не влияли на продолжительность жизни, подобно удалению самой опухоли (ампутация опухолевой или здоровой лапки, прививка двух опухолей с последующим удалением одной из них). Существует несколько концепций, объясняющих возможный механизм метастазирования опухолей после проведенного оперативного лечения. Все они представлены в обзоре И. Ф. Грех и В. Я. Шац (1969),

поэтому мы не будем их касаться, тем более, что ни с одной из них не можем согласиться.

Известно, что опухоль может различными способами влиять на свой рост в основном посредством антигенов клеточной поверхности, экскреции факторов, способных воздействовать на эффекторные иммунные механизмы. В этой связи напрашивается вопрос, почему при ранней экстирпации опухоли происходит более активный рост метастазов. Говорить в данном случае о конкуренции между опухолью и метастазами нельзя, ибо масса опухоли еще настолько мала, что не может конкурировать с диссеминированными клетками за какой-либо субстрат.

Можно, конечно, предположить в духе концепции Rehn (1940), что резистентность к опухолевому процессу или стимуляция метастазирования зависят от состояния организма-опухоленосителя, от того, в какой стадии — «предметастатической» или «метастатической» — сделана операция. Это объяснение кажется вполне резонным, но ему противоречат многочисленные клинические и экспериментальные наблюдения, свидетельствующие о том, что бурный рост метастазов начинается нередко именно после удаления злокачественной опухоли в ранней стадии развития (меланома и др.), когда иммунологическая реактивность организма-опухоленосителя достаточно сохранена.

Опухоли, как известно, выделяют разнообразные вещества, влияющие на рост и размножение как опухолевых, так и нормальных клеток (Montagua, Dobson, 1966). Так, в последние годы были получены данные, указывающие на то, что во многих опухолях вырабатываются простагландины, ответственные за подавление иммунной системы организма-опухоленосителя и приводящие к усилению роста опухоли (Берштейн, Дильман, 1974; Plescia, 1975; Lupulescu, 1978; Smith, 1978). North e. a. (1976) через 8 ч после инокуляции мышей различными штаммами опухолей обнаружили в крови фактор, очень быстро повреждающий способность животных сопротивляться заражению L. Monocytogenes и Y. enterocolitica. Предполагают, что этим фактором могут быть выделяющиеся в высокой концентрации простагландины, продуцируемые опухолью для защиты ее от опосредованного макрофагами противоопухолевого иммунитета. Свое действие в подавлении противоопухолевого иммунного ответа они осуществляют локально и системно (Easty, Easty, 1976). В частности, простагландины-1 и 2 после самой короткой инкубации ингибируют естественную и антителозависимую цитотоксичности лимфоцитов против опухолевых клеток-мишеней (Droller e. a., 1978).

Кроме того, опухоли могут выделять фактор, обладающий противовоспалительным действием. Так, Fauve e. a. (1974) установили, что тератокарцинома, меланома и мышиная опухоль Льюиса экскретируют фактор, который предотвращает инфильтрацию опухоли макрофагами.

С другой стороны, известно, что продукты метаболизма опухолевой ткани могут стимулировать гемопоэз у опухоленосителей — людей (Marquardt, 1967) и животных (Jurascova e. a., 1964), а также ускорять пролиферацию нормальных клеток (Patterson, 1962), например, обновление клеток кишечного эпителия у хомячков с перевиваемой фибросаркомой (Betts e. a., 1966). Установлено также (Melaughlin, 1962), что сыворотка крови больных раком усиливает регенерацию печеночной ткани, а также повышает количество митозов в культуре фибробластов. Известен факт стимуляции клеточной пролиферации продуктами гомологичных клеток, в том числе и опухолевых (Klein, 1959).

Мысль о том, что антиметастатический агент имеет иммунологическую природу, подтверждается еще рядом факторов и соображений. Многие вещества, например, некоторые противоопухолевые препараты (Kondo, 1961; Грех, 1963), кортизон (Майский с соавт., 1959; Reiner, 1968), вещества, блокирующие функцию ретикулоэндотелиальной системы (Кавецкий, 1962), и др. при их воздействии на опухоль могут усиливать метастазирование. У этих препаратов, имеющих различную фармакологическую характеристику, обнаруживается одно общее свойство: все они оказывают иммунодепрессивное действие.

В пользу иммунологической природы антиметастатического агента, выделяемого опухолью, свидетельствует также то, что любые средства, изменяющие иммунологические реакции организма, пораженного опухолевым процессом, оказывают сильное влияние на метастазирование, усиливая или ослабляя его. В качестве примера можно назвать воздействие органоспецифическими цитотоксическими сыворотками, лечение плазмой больных с регрессировавшей опухолью, иммунизацию антигенами, полученными из опухолевой ткани, вмешательства, изменяющие функциональное состояние органов иммунологической защиты организма — лимфатических узлов, вилочковой железы, селезенки.

В последнее время была подтверждена роль объема опухоли в состоянии иммунологической реактивности организма-опухоленосителя. При этом было обнаружено, что мыши-носители опухоли массой в 1 г (вызванной первоначально метилхолантреном и трансплантированной изологичным животным) дают нормальную реакцию на митогены, в то время как иммунная система мышей-носителей опухоли массой в 2,5 г — менее мощная (Levy e. a., 1974). Rowland e. a. (1971) обнаружили в процессе существования изогенной опухоли молочной железы первоначальное увеличение общего числа иммунокомпетентных клеток в лимфатических образованиях, например, в селезенке, через 15 дней после имплантации опухоли. В конечной стадии новообразования это число явно уменьшалось.

Тем не менее объем опухоли — не единственный определяющий фактор. Химические канцерогенные вещества (Stjernswörd, 1965) и онкогенные вирусы (Cedlowski, Friedman, 1968; Schneider, Dore,

1969) могут вызвать иммунодепрессию до обнаружения новообразования.

Таким образом, учитывая все вышеприведенные данные о значении иммунной системы организма-опухоленосителя в процессе метастазирования опухолей после проведенного хирургического лечения, С. П. Гордиенко и В. М. Бергольц (1977) изучили роль гуморальных антител и иммунных лимфоцитов в различные сроки после хирургического лечения мышей с саркомой, индуцированной метилхолантреном.

Противоопухолевую резистентность тестировали путем реинокуляции минимальной прививочной дозы (1×10^5) опухолевых клеток через 4, 8, 12, 16, 20, 25, 30, 35, 60, 90, 120 дней после удаления первичной опухоли (ампутировали левую лапку с опухолью).

Для получения сыворотки и лимфоцитов производили тотальное обескровливание мышей-опухоленосителей рассечением аксиллярного сосудистого сплетения. Лимфоциты получали из периферических лимфоузлов.

Цитотоксичность иммунных лимфоцитов в отношении клеток сингенной опухоли определяли методом, разработанным Winn (1961). Живые клетки саркомы (1×10^5) смешивали с иммунными (или нормальными) лимфоцитами (всегда изогенными) в соотношении 1 : 200. После инкубации при 37°C в течение 30 мин смесь вводили подкожно интактным изологичным мышам. Через 10 дней мышей забивали, опухоли взвешивали. Применение этого метода позволило регистрировать как ингибицию, так и стимуляцию опухолевого роста.

Результаты экспериментов по реинокуляции саркомы, индуцированной метилхолантреном, представлены в табл. 16, из которой видно, что минимальная прививочная доза (1×10^5) опухолевых клеток вызывает рост саркомы у мышей с 4-го по 30-й день после удаления первичной опухоли. Наибольшая резистентность к реинокуляции клеток возникает к 35-му дню. Однако через 60, 90 и 120 дней она исчезает.

Таким образом, результаты этих опытов подтвердили данные

Таблица 16. Прививаемость реинокулированной саркомы*, индуцированной метилхолантреном, на мышах $C_{57}BL/6$ в различные сроки после удаления первичной опухоли**

День реинокуляции опухоли	4-й	8-й	12-й	16-й	20-й	25-й	30-й	35-й	60-й	90-й	120-й
Прививаемость, %	100	100	100	90,5	82,5	65,4	32,5	8,5	80,3	90	100
Контроль (мыши без опухолей)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

* Под кожу спины мышам введено 1×10^5 опухолевых клеток.
** В каждой подопытной группе — 16—18 мышей.

Prehn и Main (1957) о возможности получения резистентности к метилхолантрениндуцированным саркомам.

Учитывая тот факт, что резистентность является иммунологически доказанным явлением, нами были предприняты попытки изучить состояние специфического клеточного и гуморального иммунитета у мышей на всех сроках после удаления первичной опухоли. Результаты полученных экспериментов представлены в табл. 17. Установлено, что иммунные лимфоциты до 60-го дня после удаления первичной опухоли сохраняют выраженную цитотоксичность (цитотоксичный индекс — от 1 до 0,82); в более поздние сроки, то есть через 90 и 120 дней, она резко падает (0,28—0,17).

Исследование сыворотки у этих же животных на всех этапах показало, что сыворотка оказывает выраженное стимулирующее действие на рост изологичной опухоли.

Итак, данные, выявленные в ходе опытов, показали, что иммунные лимфоциты и гуморальные антитела, полученные одновременно от одних и тех же мышей в различные сроки после удаления первичной опухоли, оказывают противоположный эффект на рост изологичной опухоли: лимфоциты подавляют, а гуморальные антитела стимулируют ее развитие. Причем следует отметить, что с увеличением времени после удаления опухоли стимулирующее действие сыворотки постепенно снижается и к 35-му дню исчезает, в то время как лимфоциты к этому сроку оказывают четкое цитотоксическое действие на рост клеток саркомы, которое, однако, уменьшается к 120-му дню.

Таким образом, изучение клеточных и гуморальных факторов в феномене резистентности показало, что конечный результат опухолевого процесса, по-видимому, в значительной степени зависит от того, какая форма иммунитета — гуморальная или клеточная — начнет быстрее ослабевать вследствие удаления первичной опухоли и прекращения иммунизации ею организма. При уменьшении, например, гуморального иммунитета и сохранении клеточного возможно стойкое излечение больного, в случае же его усиления есть вероятность рецидива заболевания.

Таблица 17. Влияние сыворотки* мышей-опухоленосителей, взятой в различные сроки после удаления первичной опухоли, на рост саркомы, индуцированной метилхолантреном**

День получения сыворотки	4-й	8-й	12-й	16-й	20-й	25-й	30-й	35-й	60-й	90-й	120-й
Усиление (+) или ингибиция (—) опухолевого роста, %	+75,6	+72,3	+68,1	+57,0	+36,2	+21,3	+13	+2,1	+2,2	−1,2	+2,2
									недостоверно		

* В качестве контроля использовалась сыворотка интактных мышей.
** Мышам $C_{57}BL/6$ под кожу спины введены опухолевые клетки в дозе 10^5 с 0,15 мл испытуемой сыворотки.

Полученные нами данные о значении гуморальных антител и особенно Т-клеток противоопухолевого иммунитета позволяют глубже подойти к пониманию изменения темпов роста, стимуляций или регрессии метастазов после оперативного удаления или облучения первичной опухоли, криотерапии и т. п. Все эти вмешательства следует расценивать как активные факторы, вызывающие сдвиги в иммунологически установившейся к моменту лечения системе опухоль-организм. Удаление опухоли прерывает поток иммунизирующих стимулов. Наличие разбросанных в тканях организма жизнеспособных опухолевых клеток и метастатических узелков, в зависимости от состояния иммунологической реактивности организма, соотношения и напряженности *Т*- и *В*-клеточных систем иммунитета, может вести к ускоренному росту или регрессии метастазов. Первое, по-видимому, свидетельствует о преобладании гуморального иммунитета над *Т*-клеточным, второе — об активном состоянии *Т*-клеточных иммунных факторов.

Далее, из сказанного следует, что от того, какая форма иммунитета будет раньше ослабевать, зависит прогноз метастазирования при удалении первичной опухоли, ее облучении и других воздействиях. Такие заключения кажутся вполне логичными и доступными клинико-экспериментальной проверке.

В связи с этим представляет интерес анализ проблемы метастазирования, проведенный Crile (1967), хотя его мнение не нашло значительного числа сторонников. Ранее считалось, что даже при небольших опухолях следует производить обширные операции с удалением первичной опухоли и регионарных лимфатических узлов. В настоящее время становится ясным, что удаление не пораженных опухолью лимфатических узлов понижает иммунологическую сопротивляемость организма по отношению к имплантации опухолевых клеток и росту отдаленных метастазов. Согласно наблюдениям Crile, при отсутствии в регионарных лимфатических узлах видимых метастазов прогноз простой мастэктомии лучше, чем после радикальной операции. Эти данные нуждаются, однако, в объективной проверке.

В опытах на животных Crile (1967) показал, что экстирпация регионарных лимфатических узлов в момент ампутации лапки с опухолью вела к ослаблению иммунитета; в результате становилась возможной реинокуляция опухолевой ткани. Защитную роль регионарных лимфатических барьеров надо иметь в виду: их удаление или разрушение (облучением) может являться причиной укорочения жизни больного.

Говоря о необходимости максимально беречь органы иммунологической защиты хозяина — регионарные лимфатические узлы, следует отметить, что ни у клиницистов, ни у экспериментаторов нет веских доказательств того, что метастазы в них имеют тенденцию метастазировать в другие органы.

Особое внимание заслуживают некоторые вопросы антигенной характеристики опухолевых клеток, имеющие важное значение

для анализа проблемы метастазирования. В частности, следует отметить факт более высокой иммунизирующей способности у индуцированных сильными канцерогенами опухолей по сравнению со спонтанными и перевиваемыми новообразованиями животных.

Остановимся еще на «блокирующем факторе», который может наблюдаться в механизме метастазирования после проведенного хирургического лечения. Как уже было указано выше (см. главу III), к «блокирующему фактору» относятся антиген-антитело, обладающий специфическим сродством к опухолевой клетке и к иммунному лимфоциту, а также растворимый опухолевой антиген, блокирующий иммунные лимфоциты. Природа указанного фактора во многом зависит от характера и особенностей роста опухоли.

Многие авторы отмечают корреляцию между блокирующим фактором и рецидивами опухолевого процесса (Hellström e. a., 1974; Hellström, Hellström, 1975). В то же время в сыворотке крови крыс с регрессирующими или удаленными опухолями, индуцированными вирусом, а также в сыворотке крови людей после хирургической экстирпации опухоли обнаружен «деблокирующий фактор», обладающий сродством к опухолевым клеткам и устраняющий блокирующий фактор (Bansel, Sjögren, 1972; Hellström, Hellström, 1974).

Вероятно, в случае удаления первичной опухоли концентрация блокирующего фактора, обладающего специфическим сродством к опухолевому антигену, резко возрастает на каждую малигнизированную клетку, оставшуюся после оперативного лечения. Не исключено, что это может быть первопричиной усиления метастазирования после хирургического лечения.

Пред- и послеоперационная химиотерапия ЦФ

Наши знания о тех изменениях, которые происходят в организме, подвергающемся столь активным воздействиям, все еще явно недостаточны. До сих пор остается спорным вопрос о целесообразности использования комбинированной (пред- или послеоперационной) терапии при некоторых формах и стадиях злокачественного роста.

Не всегда ясно, насколько отдаленные результаты лучевого, химического или комбинированного лечения ряда новообразований лучше (или хуже) одного хирургического вмешательства (В. М. Бергольц, 1970).

По данным Н. Т. Блохиной с соавт. (1974), послеоперационная профилактическая химиотерапия при раке желудка позволяет отсрочить возникновение рецидивов и метастазов в течение первых двух лет.

В исследованиях А. М. Гарина с соавт. (1973), Н. И. Карева с соавт. (1975) было показано, что применение ЦФ после ради-

кальной мастэктомии ухудшает результаты хирургического лечения у больных I и II стадией рака молочной железы.

В этой связи представляет интерес изучение влияния пред- и послеоперационной химиотерапии ЦФ в дозах 100 и 250 мг/кг на иммунный ответ организма-опухоленосителя (Гордиенко, Бергольц, 1972, 1973, 1977). В опытах были использованы следующие тесты: трансплантационный (пересадка кожного лоскута), цитотоксичность лимфоцитов и сывороток in vivo по методу Winn (1961), специфическая противоопухолевая резистентность.

Работа выполнена на мышах $C_{57}BL/6$ массой 18—20 г, которым под кожу бедра было привито 1×10^6 живых опухолевых клеток саркомы, индуцированной метилхолантреном, первых трех генераций.

Проведено 6 серий опытов. По способам лечения подопытных мышей делили на следующие группы:

I — операция;
II — операция+ЦФ в дозе 100 мг/кг;
III — операция + ЦФ в дозе 250 мг/кг;
IV — ЦФ в дозе 100 мг/кг + операция;
V — ЦФ в дозе 250 мг/кг + операция;
VI — контроль (мыши, не получившие лечения).

В первой серии опытов было изучено влияние пред- и послеоперационной химиотерапии ЦФ в дозах 100 и 250 мг/кг на рост саркомы, индуцированной метилхолантреном. Результаты экспериментов представлены в табл. 18, из которой видно, что все использованные методы лечения МХ-саркомы приводят к 100%-ной излечимости.

В следующей серии опытов изучали влияние различных методов терапии на трансплантационный иммунитет у мышей-опухоленосителей. С этой целью через сутки после трансплантации кожного лоскута было проведено лечение ЦФ в дозах 100 и 250 мг/кг (пересадка кожи от мышей линии C_3H). Контролем служил изологичный лоскут мышей $C_{57}BL/6$.

Таблица 18. Влияние различных методов терапии на рост саркомы, индуцированной метилхолантреном

№ группы	Метод лечения	Полная излечимость, %
I	Операция	100
	Операция+ЦФ в дозе	
II	100 мг/кг	100
III	250 мг/кг	100
	ЦФ в дозе	
IV	100 мг/кг+операция	100
V	250 мг/кг+операция	100
VI	Контроль*	

* Контрольные животные погибли от прогрессивного роста опухоли.

Из табл. 19 видно, что оперативное удаление опухоли, а также пред- и послеоперационная химиотерапия ЦФ в дозе 100 мг/кг не ослабляли трансплантационный иммунитет. Во всех группах кожный лоскут отторгался в те же сроки, что и в контроле. Однако при использовании максимально

Таблица 19. Влияние хирургического лечения, пред- и послеоперационной химиотерапии ЦФ на продолжительность жизни аллотрансплантата

№ группы	Метод лечения	Доза ЦФ, мг/кг	Количество животных		Продолжительность жизни трансплантата, дни
			всего	погибло	
I	Хирургическое удаление опухоли	—	20	—	9.2
II	Операция+ЦФ	100	18	—	9.7
III	Операция+ЦФ	250	22	—	22.8
IV	ЦФ+операция	100	17	—	9.6
V	ЦФ+операция	250	20	1	23.0
VI	Мыши с МХ-саркомой (контроль)	—	10	—	9.3
VII	Интактные мыши	—	10	—	9.1

переносимой дозы препарата (250 мг/кг) и после оперативного лечения продолжительность жизни кожного лоскута значительно удлинялась.

В третьей серии опытов было исследовано состояние специфической резистентности у мышей, которым было проведено хирургическое или комбинированное лечение.

Прежде чем подойти к решению поставленной задачи, необходимо было выяснить оптимальные сроки, при которых у мышей с удаленной первичной опухолью возникает резистентность к реинокуляции изологичной опухоли. С этой целью через 3, 10, 20, 35 и 60 дней после ампутации лапки с МХ-саркомой 1-го пассажа проводили вторичную инокуляцию клеток той же саркомы 2-го пассажа. Приведенные в табл. 20 данные показывают, что через 35 дней после операции (удаление лапки с опухолью) у мышей возникает наибольшая резистентность к реинокуляции сингенной опухоли. Этот срок и был взят как исходный для тестирования специфической противоопухолевой резистентности.

Аналогичный эффект выявлен в группах животных, которым проведена предоперационная химиотерапия ЦФ в дозах 100 и

Таблица 20. Прививаемость реинокулированной саркомы*, индуцированной метилхолантреном, на мышах $C_{57}BL/6$ в различные сроки после удаления первичной опухоли**

День реинокуляции опухоли	3-й	10-й	20-й	35-й	60-й
Прививаемость, %	100	90	80	10	90
Контроль (мыши без опухолей)	100	100	100	100	100

* Под кожу спины инокулировано 1×10^5 клеток саркомы 2-й генерации.
** В каждой подопытной группе использовано 15—18 мышей.

Таблица 21. Прививаемость реинокулированной саркомы, индуцированной метилхолантреном, на мышах $C_{57}BL/6$ через 35 дней после проведенной операции, пред- и послеоперационной химиотерапии ЦФ в дозах 100 и 250 мг/кг

№ группы	Метод лечения	Количество животных	Доза опухолевых клеток	Мыши с опухолью, %	
				опыт	контроль
I	Хирургическое удаление опухоли	20	1×10^5	10	100
II	Хирургическое удаление опухоли+ЦФ в дозе 100 мг/кг	18	1×10^5	5,6	100
III	Хирургическое удаление опухоли+ЦФ в дозе 250 мг/кг	22	1×10^5	27,3	100
IV	ЦФ в дозе 100 мг/кг+хирургическое удаление опухоли	17	1×10^5	—	100
V	ЦФ в дозе 250 мг/кг+хирургическое удаление опухоли	20	1×10^5	5	100

250 мг/кг, а также в дозе 100 мг/кг после операции (табл. 21). Послеоперационная химиотерапия препаратом в максимально переносимой дозе (250 мг/кг) повышает прививаемость реинокулированной саркомы, что свидетельствует о снижении специфической противоопухолевой резистентности.

В следующей серии экспериментов исследовали цитотоксичность иммунных лимфоцитов, полученных из регионарных лимфоузлов мышей, которые подвергались различным методам терапии. Результаты опытов представлены в табл. 22 и на рис. 6. Через 35 дней после проведенной терапии лимфоциты леченных мышей оказывают выраженный ЦЭ. Во всех случаях данные экспериментов были статистически достоверными.

Вместе с тем, если предоперационная химиотерапия ЦФ в дозе 250 мг/кг не подавляет цитотоксичность иммунных лимфоцитов,

Таблица 22. Цитотоксический эффект лимфоцитов из лимфоузлов мышей $C_{57}BL/6$, полученных через 35 дней после проведенной операции

№ группы	Метод лечения	Количество лимфоцитов, введенное в смеси с 1×10^5 клеток МХ-саркомы	Цитотоксический индекс
I	Операция	2×10^7	1,0
II	Операция+ЦФ в дозе 100 мг/кг	2×10^7	1,0
III	Операция+ЦФ в дозе 250 мг/кг	2×10^7	0,76
IV	ЦФ в дозе 100 мг/кг+операция	2×10^7	1,0
V	ЦФ в дозе 250 мг/кг+операция	2×10^7	1,0

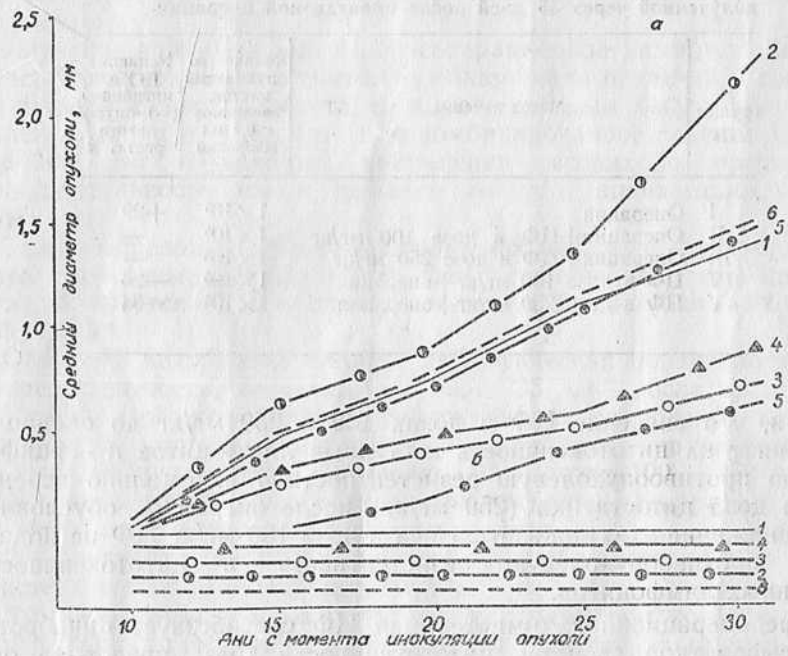


Рис. 6. Влияние сыворотки и лимфоцитов мышей с МХ-саркомой после проведенной операции, пред- и послеоперационной химиотерапии ЦФ в различных дозах на рост изологичной опухоли:

а — сыворотка, *б* — лимфоциты; *1* — контроль (опухолевые клетки+нормальная сыворотка); *2* — опухолевые клетки+сыворотка опухоленосителя, леченного хирургически; *3* — опухолевые клетки+сыворотка опухоленосителя, леченного ЦФ в дозе 250 мг/кг+операция; *4* — то же (ЦФ в дозе 100 мг/кг+операция); *5* — то же (операция+ЦФ в дозе 250 мг/кг); *6* — то же (операция+ЦФ в дозе 100 мг/кг)

то послеоперационное введение той же дозы препарата способствует снижению этого показателя. Лимфоциты интактных мышей не обладали способностью ингибировать опухолевый рост.

У мышей, леченных вышеперечисленными методами, исследовали влияние их сывороток на течение неопластического процесса. С этой целью была поставлена реакция цитотоксичности сыворотки in vivo. Из табл. 23 видно, что сыворотка мышей, леченных оперативно, к 35-му дню оказывала стимулирующее действие. У животных, которым была проведена послеоперационная химиотерапия ЦФ в дозе 250 и 100 мг/кг, сыворотка не влияла на опухолевый рост.

Иная картина наблюдается при использовании тех же доз препарата до операции. В этом случае сыворотка оказывает отчетливое цитотоксическое действие.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов по изучению влияния пред- и послеоперационной химиотерапии по-

Таблица 23. Эффект сыворотки мышей-опухоленосителей, полученной через 35 дней после проведенной операции

№ группы	Метод лечения	Количество опухолевых клеток, введенное с 0,1 мл сыворотки	Усиление (+) или ингибиция (—) опухолевого роста, %
I	Операция	1×10^5	+29
II	Операция+ЦФ в дозе 100 мг/кг	1×10^5	—
III	Операция+ЦФ в дозе 250 мг/кг	1×10^5	—
IV	ЦФ в дозе 100 мг/кг+операция	1×10^5	—26
V	ЦФ в дозе 250 мг/кг+операция	1×10^5	—34

казали, что введение ЦФ в дозах 100 и 250 мг/кг до операции не влияет на цитотоксичность иммунных лимфоцитов и специфическую противоопухолевую резистентность. Максимально переносимая доза цитостатика (250 мг/кг) после операции обусловливает снижение этих показателей, а в дозе 100 мг/кг ЦФ не подавляет противоопухолевую резистентность и цитотоксичность иммунных лимфоцитов.

Предоперационная химиотерапия ЦФ способствует приобретению сывороткой свойств цитотоксичности (без препарата она оказывает стимулирующий эффект), в то время как после операции препарат приводит к потере каких-либо потенций по отношению к опухолевому росту.

Таким образом, исследование влияния различных методов лечения на иммунный ответ организма позволило установить важное обстоятельство, которое заключается в том, что применение максимально переносимых доз ЦФ после операции нецелесообразно, так как при этом значительно подавляются факторы специфического противоопухолевого иммунитета. В то же время была установлена целесообразность использования предоперационной химиотерапии, так как при этом не было обнаружено снижения противоопухолевой резистентности.

Применение ЦФ в дозе 100 мг/кг после операции, возможно, рационально, так как эта доза, не подавляя специфический противоопухолевый и трансплантационный иммунитет, оказывает достаточно выраженный канцеролитический эффект.

Анализ эффективности различных методов лечения (пред- и послеоперационной химиотерапии), использованных в работе, не выявил различий в отношении продолжительности жизни и выживаемости мышей с саркомой, индуцированной метилхолантреном. Это связано, очевидно, с тем, что данная модель опухоли не метастазирует. Поэтому в обсуждении полученных результатов мы будем далее касаться лишь взаимоотношений между проводи-

мым методом лечения и состоянием иммунологической системы организма.

Изучение влияния пред- и послеоперационной химиотерапии на трансплантационный иммунитет не обнаружило различий в сроках отторжения кожного лоскута у мышей, которым было проведено удаление лапки с опухолью или комбинированное лечение ЦФ в дозе 100 мг/кг. Однако при применении высоких доз препарата продолжительность жизни кожного лоскута значительно удлиняется.

Таким образом, результаты наших исследований подтвердили ранее полученные данные о том, что с увеличением дозы препарата усиливается их иммунодепрессивное действие (Schwartz e. a., 1959; и др.).

Опыты, в которых изучалась специфическая противоопухолевая резистентность, показали, что через 35 дней после проведенной терапии резистентность к реинокуляции опухолевых клеток сохраняется в группах животных, подвергшихся хирургическому или химиохирургическому лечению ЦФ в дозах 100 и 250 мг/кг. Аналогичный эффект был получен при введении препарата в дозе 100 мг/кг после операции. В случае увеличения дозы цитостатика до 250 мг/кг при той же схеме опыта наблюдается снижение резистентности к реинокуляции опухоли.

Этот же эффект был зарегистрирован нами при исследовании цитотоксичности иммунных лимфоцитов мышей, леченных по обычной схеме (операция, пред- и послеоперационная химиотерапия ЦФ в дозах 100 и 250 мг/кг). Оказалось, что цитотоксический индекс лимфоцитов во всех случаях равен 1,0, за исключением группы животных, которым препарат инъецировался после операции в дозе 250 мг/кг. При этом наблюдалось снижение цитотоксичности иммунных лимфоцитов.

Для объяснения резистентности специфического противоопухолевого иммунитета к воздействию ЦФ в дозе 250 мг/кг при инокуляции его до операции можно предложить следующую гипотезу, выдвигаемую рядом авторов (Александров, 1959; Майский, Суворова, 1959; Klein e. a., 1960; Makidano, 1961, 1966; Радзиховская, 1965): ЦФ, являясь цитостатиком, способствует некротизации значительной массы опухолевой ткани; альтерация и некротизация неопластических клеток усиливают их антигенные свойства, обусловливая тем самым активацию иммунологической реакции организма против опухоли. В случае применения препарата после удаления опухоли этот механизм исчезает и специфическая противоопухолевая резистентность снижается.

ЦЭ сыворотки мышей-опухоленосителей, которым была проведена предоперационная химиотерапия, также, очевидно, связан с усилением иммунологической реактивности организма, так как в случае чисто хирургического лечения сыворотка обладает стимулирующим действием, а в опытах с введением ЦФ после операции она оказывает ингибирующее влияние на опухолевый рост.

Таким образом, суммируя накопившиеся экспериментальные и клинические данные, представленные в этой главе, можно заключить, что все современные методы терапии злокачественных опухолей используются с целью уничтожения в организме больного максимального количества опухолевых клеток. Однако хорошо известно, что ни в эксперименте, ни тем более в клинике не удалось подобрать такие дозы цитостатиков, которые бы разрушили все опухолевые клетки, не изменив при этом их антигенной структуры и состояния иммунного ответа организма-опухоленосителя. В то же время оставшиеся после проведенного лечения опухолевые клетки могут различными способами влиять на свой рост как посредством антигенов клеточной поверхности, измененной в процессе химиотерапии, так и продукцией факторов, способных воздействовать на эффекторные иммунные механизмы. Установлено также, что большие дозы цитостатиков могут оказывать иммуномоделирующий эффект, который проявляется на первом этапе иммунодепрессией, а впоследствии — стимулирующим действием на иммуногенез, а это может привести к тому, что оставшиеся после проведенного лечения неопластические клетки покрываются антителами, направленными против составных частей клеточной поверхности. Это действие антител приводит к специфическому исчезновению антигенных детерминантов, создавая тем самым условия для усиления роста опухоли. Итак, можно полагать, что ускорение роста и метастазирования опухоли происходит не в период иммунодепрессии, вызванной большими дозами цитостатиков, а в период восстановленного или даже усиленного иммуногенеза.

Глава IX

РОЛЬ ИММУНОТЕРАПИИ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Основная цель иммунотерапии — восстановление или стимуляция физиологических иммунных механизмов, которые могут быть направлены на элиминацию малигнизированных клеток. Прежде чем перейти к описанию различных схем иммунотерапии солидных опухолей, следует отметить, что относительно скромные достижения этого метода лечения связаны с отсутствием четкой характеристики антигенов опухолей (особенно у человека), их локализации, иммуногенности, антигенности, перекрестной реактивности с нормальными компонентами тканей, а также во взаимодействии с иммунокомпетентной системой организма. Кроме того, наши знания эффекторных механизмов *Т*- и *В*-лимфоцитов и их популяций, макрофагов, антител различных классов все еще явно недостаточны, и почти совершенно не изучены факторы, продуцируемые опухолевыми клетками, которые обеспечивают им преодоление первого и очень важного звена защиты — естественной резистентности. Однако, несмотря на все эти пробелы в познаниях, в последние годы наметились следующие основные направления иммунотерапии, подразделяющиеся по специфичности и способу воздействия на организм опухоленосителя: 1) активная неспецифическая; 2) активная специфическая; 3) адаптивная неспецифическая; 4) адаптивная специфическая; 5) пассивная специфическая; 6) профилактическая; 7) профилактическая специфическая и неспецифическая; 8) деблокирующая; 9) комбинированная иммунотерапия с другими методами лечения.

В табл. 24 приведены существующие и разрабатываемые методы иммунотерапии.

Активная неспецифическая иммунотерапия

Задача неспецифической или, как ее иногда называют, адъювантной иммунотерапии — неспецифическая стимуляция иммунной реактивности организма-опухоленосителя с помощью различных вакцин и микробных препаратов (см. табл. 24).

Таблица 24. Методы иммунотерапии (по В. М. Бергольц с соавт., 1978)

Иммунотерапия	Инокулируемый материал	Способ действия (возможный или установленный)
1	2	3
1. Активная неспецифическая	Различные адъюванты иммуногенеза: БЦЖ, ПАФ, экстракты из микобактерий; препараты из Corynebacterium parvum, Corynebacterium granulosum (несколько разных); синтетические адъюванты: полинуклеотиды (полиинозиновая-полицитидиловая кислота — poly I-poly C), полиаденциловая-полиурациловая кислота (poly A-poly U), левамизол; коклюшная вакцина; вакцина эпидемического паротита; зимозан; интерферон, фитогемагглютинин и др.	Стимуляция фагоцитоза: стимуляция пролиферации *Т*-лимфоидных клеток, среди которых пролиферируют и специфически иммунные по отношению к опухоли клетки; стимуляция *В*-лимфоцитов с усилением выработки гуморальных антител, в том числе и специфических цитотоксических
2. Активная специфическая	Опухолевые клетки (ОК), нативные облученные; ОК, обработанные ингибирующими их пролиферацию веществами; разными способами приготовленные экстракты из ОК; модифицированные (для усиления иммуногенности) аутологичные ОК	Стимулирующий клеточный и гуморальный иммунитет эффект от введения перечисленных препаратов объясняют тем, что инокуляции «вакцины» проводятся повторно и в разные участки тела, что вовлекает в ответ большие объемы иммунокомпетентных клеток
3. Адаптивная неспецифическая	Лимфоциты периферической крови или из грудного протока; суспендированные клетки лимфоидных органов; трансфузия костного мозга здоровых доноров	Увеличение плацдарма иммунокомпетентных клеток за счет перелитых донорских
4. Адаптивная специфическая	Иммунокомпетентные клетки от иммунизированных данной опухолью животных; иммунокомпетентные клетки от больных, находящихся в стадии ремиссии или выздоровевших от аналогичной опухоли; фактор переноса от иммунизированных доноров или от больных, находящихся в стадии ремиссии или выздоровевших от аналогичной опухоли; РНК от иммунизированных доноров или от больных в состоянии ремиссии	Разрушение опухоли в организме реципиента перелитыми лимфоидными клетками, обладающими специфическими противоопухолевыми детерминантами. Фактор передачи и(или) РНК из специфически иммунных клеток, вступив в контакт с собственными лимфоцитами реципиента, превращает их в специфически иммунные, способные разрушать опухолевые клетки

Продолжение табл. 24

1	2	3
5. Пассивная специфическая	Сыворотки специфически иммунизированных или выздоровевших от опухоли животных; сыворотки больных, находящихся в состоянии ремиссии или выздоровевших; сыворотки от перекрестно иммунизированных больных (или животных)	Цитолитическое действие пассивно перелитых антител (специфическое). Возможен нежелательный усиливающий рост опухоли эффект (вследствие введения «блокирующих» антител)
6. Профилактическая неспецифическая	Те же, что в п. 1, но до пересадки опухоли (вируса) или до начала ее спонтанного развития	Усиление или предупреждение опухолевого роста в зависимости от срока и способа введения
7. Профилактическая специфическая	Те же, что в п. 2, но до пересадки опухоли (вируса) или до начала ее спонтанного развития	Стимуляция иммунитета (специфического), препятствующего развитию опухоли
8. Деблокирующая	Антисыворотки от животных других (по отношению к опухоленосителю) видов, иммунных к блокирующему фактору; сыворотки от животных того же вида (или даже сингенных), иммунных к данному опухолевому антигену; отдельные виды иммуноглобулинов из сывороток опухоленосителей; антиглобулиновые сыворотки к отдельным видам иммуноглобулинов	В зависимости от вида деблокирующего агента: связывание и инактивирование блокирующих факторов, или создание избытка цитотоксических антител, или, наконец, при пассивном попадании в организм действие по принципу обратной связи, ингибирование выработки гуморальных блокирующих иммуноглобулинов

Известно много агентов, усиливающих *Т*- и *В*-клеточные иммунологические реакции. При этом взаимодействия между различными клетками-эффекторами в иммунологическом механизме сложные, так что «стимулирующий» эффект данного препарата может широко варьировать в смысле интенсивности и природы эффекта в зависимости от дозы препарата, времени и способа его введения. В зависимости от вышеуказанных иммунологических параметров один и тот же препарат можно рассматривать как иммуностимулирующий, так и иммунодепрессивный.

Одним из наиболее мощных и широко применяемых стимуляторов иммунологических механизмов является вакцина БЦЖ. Ее применение задерживает рост перевитой или индуцированной опухоли, уменьшает прививаемость и увеличивает продолжительность жизни животных.

Например, введение БЦЖ в растущий меланомный узел вызы-

вает его временную регрессию (Morton e. a., 1970), задерживает появление и рост опухоли молочной железы, индуцированной диметилбензантраценом у крыс (Piessens, 1971). Gorman e. a. (1980) провели внутривенную терапию БЦЖ опухолей собак. Оказалось, что данная вакцина значительно тормозит появление легочных метастазов остеогенной саркомы и опухоли молочной железы, а также увеличивает продолжительность жизни животных.

Имеются также сведения о применении БЦЖ в клинике. Меланома — одно из первых солидных новообразований, которое чаще всего подвергалось иммунотерапии с целью уничтожения оставшихся клеток после хирургического лечения. Первое исследование было проведено Bluming e. a. (1972, 1974), которые использовали БЦЖ Пастера или Глаксо. Установлено, что первый штамм — наиболее иммуногенный, второй — наименее иммуногенный из всех существующих (Laucius e. a., 1974). В результате лечения у всех пациентов, получивших внутрикожно БЦЖ Глаксо, наблюдалась ремиссия в пределах 30 недель, в то время как продолжительность ремиссии больных, подвергнутых лечению препаратом Пастера, была в два раза больше.

Gutterman e. a. (1973, 1975) подвергли больных, пораженных обширной меланомой с метастазами в регионарные лимфатические узлы (III стадия) или отдаленными метастазами (IV стадия), лечению БЦЖ, наносимой на кожные скарификации после хирургического удаления всех выявленных очагов опухоли. Авторы отмечали положительный результат терапии.

Аналогичные данные, свидетельствующие об уменьшении рецидивов и продлении жизни при помощи иммунотерапии БЦЖ, применяемой после хирургического лечения во II и III стадиях заболевания, приведены Morton e. a. (1976), Grooms, Morton (1975). Lamm e. a. (1980), Stöber e. a. (1980) обнаружили положительный эффект БЦЖ у больных раком мочевого пузыря. Подобные результаты получены Israel (1972, 1974) при раке бронхов и Marcove e. a. (1974) в случае остеосаркомы.

Однако есть сообщения и об отрицательных результатах применения вакцины БЦЖ и АФ. Levy e. a. (1972) зарегистрировали ухудшение состояния больных-носителей меланом после лечения БЦЖ, при этом обнаружено увеличение титра антибластомных антител, которые носят блокирующий характер в отношении цитотоксического действия лимфоцитов.

Ускорение развития метастазов при иммунотерапии БЦЖ было обнаружено Colmerauer e. a. (1980) в случае еженедельного введения 5×10^7 микробных тел мышам BALB/C с аденокарциномой толстой кишки. После удаления первичной опухоли усиливался рост метастазов в легких, повышалась смертность и уменьшалась продолжительность жизни по сравнению с контрольными животными.

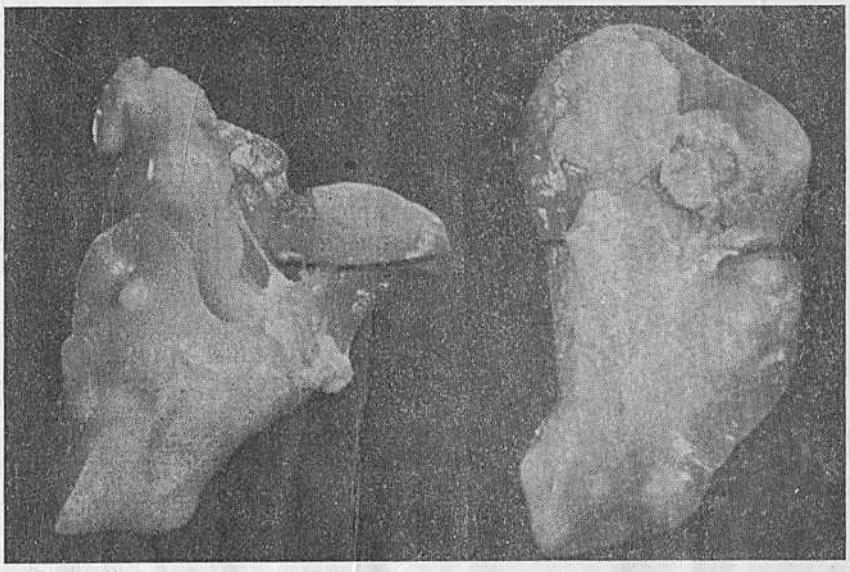


Рис. 7. Множественные крупные метастазы в легких у крысы, предварительно обработанной АФ и забитой на 21-й день после прививки в хвост опухоли ССК

Имеются данные о том, что БЦЖ может ускорять появление химически индуцированных (5 мг бензпирена) опухолей в трахее у сирийских хомяков.

Ранее А. И. Волегов и С. П. Гордиенко (1970) исследовали влияние предварительного введения АФ на рост и метастазирование саркомы ССК крыс. Причем адъювант инъецировался различными способами.

Контролем служила группа крыс (22), получивших только опухолевые клетки; крысам II группы (29) АФ вводили в подушечку задней левой лапки; III (32 крысы) — под кожу спины. Через 12 дней после введения АФ в дозе 0,04 мл крысам под кожу средней трети хвоста прививали 5×10^5 клеток саркомы ССК. Указанная доза клеток была оттитрована заранее и не вызывала роста опухоли у интактных крыс. Развитие новообразований регистрировали на 7-й день после перевивки и на 21-й, когда животных забивали и исследовали на наличие метастазов. Показатели роста и метастазирования саркомы ССК представлены на рис. 7, из которого видно, что у контрольных животных к 7-му дню опухоли не наблюдались, а к 21-му — они возникли у 2 животных. Метастазов не было.

У 15 крыс II группы опухоли в месте введения появились к 7-му дню, а у 25 — к моменту забоя. В забрюшинных лимфатических узлах и легких были обнаружены метастазы (рис. 8).

В III группе животных к 7-му дню опухоли не развивались,



Рис. 8. Множественные опухолевые узлы в брюшной полости крысы Вистар, привитой подкожно штаммом саркомы 321-КРС

а к 21-му — они возникли у 12 крыс. У одной из них выявлены множественные метастазы в легкие и лимфатические узлы.

Таким образом, введение АФ за 12 дней до перевивки опухоли ССК способствовало усилению ее прививаемости и метастазирования в зависимости от места инъекции.

С. П. Гордиенко и А. И. Агеенко (1971) провели исследование по изучению влияния АФ на рост опухолевых клеток саркомы 321-КРС. Как видно из табл. 25, в контрольной группе одномесячных животных (не обработанных АФ) новообразования со средним латентным периодом в 17 дней, локализующиеся под кожей, возникли лишь у 4 из 30 крыс. Внутрибрюшинных опухолей не было. Клетки саркомы, введенные в дозе $3{,}5\times10^5$ под кожу спины, привились в 100% случаев у крыс месячного возраста линии Вистар, предварительно (за 10 дней) инокулированных АФ. При этом у 26 из 30 крыс новообразования отсутствовали в месте введения, но локализовались в брюшной полости, достигая размеров 3—8 см в диаметре. Средний латентный период появления опухолей составлял 90 дней. У 4 крыс этой группы в месте инокуляции появились новообразования с латентным периодом в 17 дней. В двух случаях опухоли были под кожей спины, но не в брюшной полости. Таким образом, у животных, получивших АФ, значительно удлинялся латентный период появления ретикулосарком. В других случаях опухоли локализовались не подкожно, а внутрибрюшинно, что ни разу не наблюдалось в контроле, где прививаемость была очень низкой — 12% (в подопытной группе она равнялась 100%).

Аналогичный эффект воздействия на онкогенные потенции ретикулосаркомы 321-КРС, вызванной АФ, был получен во второй серии экспериментов на крысах линии Вистар в возрасте 4,5 мес (см. табл. 25). Клетки саркомы 321-КРС в дозе 3×10^6, инъецированные под кожу спины животным, предварительно обработанным АФ, обусловили внутрибрюшинный опухолевый рост со средним латентным периодом в 160 дней у 13 из 20 крыс (65%). В одном случае опухоль была обнаружена через 270 дней после

Таблица 25. Влияние АФ на рост опухолевых трансплантатов крысиной саркомы 321-КРС

Инокулированный материал	Возраст крыс линии Вистар в момент инокуляции опухоли, мес	Доза клеток саркомы 321-КРС	Число крыс		Средний латентный период, дни	Локализация опухоли	
			привитых	с опухолью		под кожей спины	в брюшной полости
АФ	1	—	15	—	—	—	—
Клетки саркомы 321-КРС+АФ	1	$3{,}5\times10^5$	30	30	90	4	26
Клетки саркомы 321-КРС (контроль)	1	$3{,}5\times10^5$	30	4	17	4	—
АФ+клетки саркомы 321-КРС	4,5	3×10^6	20	13	160	—	13
Клетки саркомы 321-КРС (контроль)	4,5	3×10^6	20	2	22	2	—
АФ	4,5	—	15	—	—	—	—

перевивки опухолевых клеток. У 2 из 20 крыс контрольной группы возникли подкожные новообразования с латентным периодом в 22 дня.

Как в первой, так и во второй серии опытов новообразования, возникшие в брюшной полости, по гистологическому строению представляли собой ретикулосаркому.

Полученные данные свидетельствуют о том, что введение полного АФ существенно влияет на биологические свойства ретикулосаркомы 321-КРС. При подкожной перевивке клеточными суспензиями опухоли возникли в более поздние сроки, причем не подкожно, а внутрибрюшинно. Кроме того, с увеличением возраста животных, с одной стороны, увеличивался латентный период появления опухолей, а с другой — уменьшалась частота их возникновения. Важно отметить, что у крыс, не обработанных АФ при инокуляции клеток саркомы 321-КРС под кожу спины, не наблюдалось ни одной внутрибрюшинной опухоли в течение многолетних подкожных перевивок этого новообразования, прошедшего более 100 генераций.

Так как в опытах использованы беспородные животные и длительно пассируемые перевивные опухоли, естественно, возникло предположение о том, что стимуляция опухолевого роста, вызванная инокуляцией АФ, связана с подавлением клеточных факторов иммунитета.

В этой связи нами были поставлены эксперименты на сингенных мышах C_3H, которым прививали под кожу спины клетки саркомы, индуцированной метилхолантреном, в дозе 1×10^5. АФ инокулировали внутрибрюшинно в дозе 0,1 мл за 7 и 45 суток до перевивки и одновременно с ней.

Таблица 26. Изменение темпа роста саркомы, индуцированной метилхолантреном, в зависимости от срока введения АФ

№ группы	Время введения АФ	Количество мышей	Средняя масса опухоли к 10-му дню, мг	Достоверность P	Продолжительность жизни мышей с опухолями, дни	Достоверность P
I	Контроль (опухолевые клетки введены под кожу спины в дозе 1×10^5)	15	76,4±8		62±2,5	
II	за 7 дней до перевивки опухоли	15	279±18	$P<0,001$	32±2	$P<0,001$
III	одновременно с перевивкой опухоли	15	204±12	$P<0,001$	45±4	$0,01>P<0,001$
IV	за 45 суток до перевивки опухоли	15	146±10,3	$0,01>P<0,001$	46±4,24	$0,01>P<0,001$

Из табл. 26 видно, что наибольшая стимуляция опухолевого роста и наименьшая продолжительность жизни была у мышей, которым АФ инокулировался за 7 дней до перевивки опухоли. Менее выраженный эффект наблюдался при введении АФ одновременно или за 45 суток до инъекции трансплантатов опухоли.

Для исследования состояния трансплантационного иммунитета у мышей, обработанных АФ за 7 дней до перевивки МХ-саркомы, был поставлен трансплантационный тест с пересадкой аллогенного кожного лоскута. Донором служили мыши C_3H, реципиентом — мыши $C_{57}BL/6$. В результате опытов оказалось, что АФ, введенный за 7 дней до пересадки кожи, укорачивает продолжительность жизни кожного лоскута с 9 дней в контрольной группе до 7 в подопытной. Такой же эффект был получен у мышей с опухолью, обработанных АФ. Кожный лоскут пересаживали через 10 дней после перевивки опухоли или через 17 дней после инокуляции АФ. В этом случае также наблюдалось статистически значимое укорочение жизни кожного трансплантата ($P<0,01$).

Для выяснения роли сыворотки и лимфоцитов в полученном феномене стимуляции опухолевого процесса была поставлена реакция цитотоксичности сыворотки и лимфоцитов in vivo по методу Winn (1961).

Из табл. 27 видно, что сыворотка мышей-опухоленосителей линии C_3H стимулирует рост МХ-саркомы 2-го пассажа. В то же время сыворотка мышей-опухоленосителей, обработанных АФ, приводит к еще большей стимуляции неопластического процесса. Различие в обоих случаях статистически достоверно ($P<0,001$). Сыворотка интактных мышей и обработанных АФ не обладает стимулирующим свойством.

Данные о влиянии лимфоцитов на опухолевый рост, представленные в табл. 28, свидетельствуют о том, что лимфоциты мышей-опухоленосителей, введенные в соотношении 200 : 1 к опухолевым клеткам, полностью предотвращают опухолевый рост.

Таблица 27. Влияние сыворотки мышей-опухоленосителей, обработанных или не обработанных полным АФ, на рост саркомы, индуцированной метилхолантреном

№ группы	Инокулированный материал	Количество мышей	Средняя масса опухоли, мг	Усиление (+) или ингибиция (—) опухолевого роста, %	Достоверность P
I	Контроль (клетки МХ-саркомы)	5	80,4±5,9		
II	Сыворотка интактных мышей+клетки МХ-саркомы	15	85,6±3,3	+6,5	недостоверно 0,5>P<0,2
III	Сыворотка мышей-опухоленосителей +клетки МХ-саркомы	15	145±14,8	+80,5	0,01>P<0,001
IV	Сыворотка мышей-опухоленосителей, обработанных АФ+ +клетки МХ-саркомы	15	270±12,5	+237	P<0,001
V	Сыворотка мышей без опухолей, обработанных АФ+МХ-саркомы	15	83,2±5,8		недостоверно P>0,5

Аналогичный эффект был получен при инокуляции лимфоцитов мышей-опухоленосителей, обработанных АФ. Лимфоциты интактных мышей не оказывали какого-либо влияния на опухолевый рост. В то же время лимфоциты мышей без опухолей, обработанных АФ, способствовали статистически достоверному торможению роста опухоли.

Таким образом, изучение влияния АФ на рост некоторых сингенных и аллогенных опухолей показало, что АФ во всех случаях стимулирует рост изологичных опухолей, изменяет биологические

Таблица 28. Влияние лимфоцитов интактных мышей и опухоленосителей, не обработанных или обработанных полным АФ

№ группы	Инокулированный материал	Количество лимфоцитов, введенное в смеси с 1×10^5 клеток МХ-саркомы	Количество мышей	Средняя масса опухоли, мг	Цитотоксический индекс	Достоверность P
I	Контроль (клетки МХ-саркомы)	—	5	80,4±5,9	—	
II	Лимфоциты интактных мышей+МХ-саркомы	2×10^7	15	74,6±2,5		
III	Лимфоциты интактных мышей, обработанных АФ+клетки МХ-саркомы	2×10^7	15	58,8±4	0,27	0,02>P>0,01
IV	Лимфоциты мышей-опухоленосителей+клетки МХ-саркомы	2×10^7	15	—	1,0	P<0,001
V	Лимфоциты мышей-опухоленосителей, обработанных АФ+клетки МХ-саркомы	2×10^7	15	—	1,0	P<0,001

свойства саркомы 321-КРС, а также обусловливает рост и метастазирование саркомы ССК.

Эксперименты указывают на то, что разные способы и время введения АФ по отношению к перевивке опухоли значительно влияют на стимуляцию неопластического процесса.

Было установлено, что лимфоциты мышей с саркомой, индуцированной метилхолантреном, обработанных АФ, ингибируют опухолевый рост, в то время как сыворотка этих же животных обладает стимулирующим свойством.

Данные трансплантационного теста свидетельствуют о том, что АФ усиливает трансплантационный иммунитет, что выражается в укорочении продолжительности жизни аллогенного кожного лоскута с 9 дней в контроле до 5—7 дней в опыте. Кроме того, оказалось, что усиление роста сингенных и аллогенных опухолей не связано с подавлением клеточных факторов иммунитета.

В ряде экспериментальных работ изучалось влияние вакцинации БЦЖ на продукцию специфических противоопухолевых гуморальных антител. Ankerst и Jonsson (1972) на модели аденовирусного канцерогенеза мышей показали, что при раннем введении БЦЖ развитие опухолей тормозилось, при поздней или повторной инъекции оно слегка ускорялось по сравнению с контролем. Сывороточные факторы, блокирующие действие иммунных лимфоцитов на опухолевые клетки-мишени, были обнаружены в контроле и в группе мышей лишь при позднем введении БЦЖ. Авторы полагают, что при ранней инокуляции вакцина БЦЖ стимулировала защитные механизмы, а при поздней — блокирующие факторы. Аналогичные результаты были получены Sjögren, Borum (1971), а также Bansal, Sjögren (1973) в опытах с полиомой крыс.

Имеются также экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что вакцина БЦЖ может стимулировать продукцию деблокирующих сывороток, которые содержат субстанции, препятствующие лимфоцитарной цитотоксичности in vitro. Деблокирующие сыворотки, добавленные к блокирующим, снижают этот эффект. Иммунизированные полиомными опухолевыми клетками кролики и крысы после вакцинации БЦЖ способны продуцировать деблокирующие сыворотки (Bonsal, Sjögren, 1972).

Из других вакцин, используемых в иммунотерапии, следует назвать Corynebacterium parvum. Woodruff e. a. (1973) обнаружили регрессию спонтанной мышиной карциномы молочной железы или саркомы, индуцированной метилхолантреном, после однократной внутривенной инъекции Corynebacterium parvum. Этот препарат показал такую же активность у мышей, лишенных *Т*-клеток.

Предпринимались попытки лечения больных солидными опухолями различной локализации путем введения Corynebacterium parvum (James e. a., 1975), в результате чего клиническое состояние больных значительно улучшилось. Исследование иммуногло-

булинов различных классов у этих же больных показало, что опухоль неспособна связывать IgG_2-антитела. Основываясь на этих положениях, авторы считают, что иммунотерапия Corynebacterium parvum, стимулируя продукцию IgG_2, препятствует тем самым продукции блокирующих антител, локализующихся в других подклассах, что и определяет эффективность лечения.

Определенный интерес представляет работа Basic e. a. (1980), которая дает возможность определить механизм противоопухолевого действия Corynebacterium parvum. Было установлено, что внутривенное или внутриплевральное введение этой вакцины за 2—7 дней до внутривенной прививки клеток опухоли молочной железы уменьшало количество метастазов в легких у тимэктомированных или облученных (600 рад) мышей CBA, причем внутриплевральная инъекция оказалась более эффективной, чем внутривенная. В то же время обработка мышей антимакрофагальным агентом (каррагинином) полностью предотвращало противоопухолевый эффект адъюванта. Авторы полагают, что противоопухолевый эффект Corynebacterium parvum опосредован неспецифически стимулированными макрофагами. В то же время в исследованиях Biossi e. a. (1979) постулируется гипотеза о том, что в механизме противоопухолевого действия данной вакцины лежит кооперация *Т*- и *В*-лимфоцитов и макрофагов.

В последнее время предприняты попытки использования левамизола при злокачественных опухолях в эксперименте и клинике. Установлено, что в эксперименте препарат оказывает терапевтическое действие в дозе 2,5—10 мг/кг, обладает противометастатическим действием и наиболее эффективен при адъювантной терапии медленно растущих опухолей. Левамизол восстанавливает сниженный клеточный иммунитет онкологических больных, что коррелирует с благоприятным прогнозом. Терапевтический эффект левамизола отмечен при операбельном раке легкого (Holmes, Golub,1976; Doddi e. a., 1980), у облученных больных с III стадией рака молочной железы (Glass e. a., 1976), у больных с опухолями желудочно-кишечного тракта (Miwa e. a., 1979), а также в сочетании с полихимиотерапией (Hortobagizi e. a., 1978), злокачественной меланомой (Carter, 1976), острым миелолейкозом (Brincer e. a., 1976).

Таким образом, несмотря на многие нерешенные вопросы и противоречивость полученных результатов, адъювантная иммунотерапия постепенно находит применение в лечении солидных опухолей. Нет сомнения в том, что познание механизмов действия адъювантов на организм опухоленосителя расширит показания к использованию стимуляторов иммуногенеза и позволит проводить терапию онкологических больных более эффективно, с учетом иммунологического статуса каждого больного.

Механизм действия адъювантов. Многочисленные исследования показали, что все адъюванты, как правило, стимулируют ретикулоэндотелиальную систему, влияют на лимфоциты и макро-

фаги (масса селезенки и лимфатических узлов после их введения может увеличиваться вплоть до 10-кратной величины) (Pernis, Paronetto, 1964).

Одним из основных механизмов действия адъювантов является стимуляция клеточного деления (Dressor, 1970), усиление синтеза гуморальных антител (Halpern e. a., 1958). Показано также прямое действие адъювантов на макрофаги (Baldvin, Pimm, 1975; Basic e. a., 1980). Некоторые адъюванты стимулируют *B*-лимфоциты. Это относится к пинополисахариду E. coli, который является, кроме того, антигеном, вызывающим иммунные реакции, не зависящие от тимуса, митогеном для *B*-, но не для *T*-лимфоцитов (Möller, 1972).

Известно что большинство адъювантов повышает общую выработку гуморальных антител, включая продукцию цитотоксических, по отношению к опухолевым клеткам у животных с соответствующими новообразованиями.

Bansal и Sjögren (1972) показали, что крысы или кролики, обработанные БЦЖ и митомицином *C* за 12 дней до перевивки опухоли, через 2—4 дня вырабатывают один или несколько «деблокирующих» факторов в своей сыворотке. Инъекция сыворотки животным с растущими опухолями и тем, у которых был обнаружен блокирующий фактор, может замедлить рост опухоли, вызвать выработку цитотоксических антител и нейтрализовать блокирующий фактор (Sjögren, 1974).

Установлено также, что большинство адъювантов действует на *T*-лимфоциты, причем они не только стимулируют иммунные реакции организма, но и могут обладать супрессорным действием. Этот факт был установлен на следующей модели: БЦЖ, введенная в дозах, усиливающих рост опухоли, ингибирует иммунную реакцию по отношению к бараньим эритроцитам (Mathe, 1976) и реакцию трансплантата против хозяина (Geffard e. a., 1976). Причем подавление осуществляется посредством стимуляции *T*-супрессоров. Mitchell (1976) к тому же наблюдал, что БЦЖ может оказывать супрессорное действие посредством макрофагов.

Corynebacterium parvum, инъецированная внутривенно, также уменьшает иммунитет клеточного типа при помощи механизма, связанного с активацией макрофагов (Scott, 1972).

Аналогичный супрессорный эффект на *T*-клеточный иммунитет был обнаружен у левамизола, причем только в случае ежедневного применения препарата, так как ежедневное его введение активизирует *T*-супрессоры. Эти исследования чрезвычайно важны, потому что в зависимости от времени инокуляции можно получить различный терапевтический эффект.

Таким образом, как видно из приведенных материалов, адъюванты оказывают многостороннее стимулирующее влияние на иммунную реактивность организма, а в определенных условиях — супрессорный эффект. Чрезвычайно важно знать, на какое звено механизма иммунной реакции может воздействовать адъювант,

ибо он используется, как правило, в сочетании с химиотерапией, что может потенцировать иммунодепрессивное действие цитостатиков. Этот факт был установлен при определенных условиях сочетания БЦЖ и ЦФ.

Активная специфическая иммунотерапия

В результате исследований последних лет установлено, что активная специфическая иммунотерапия, предусматривающая введение в организм-опухоленоситель антигена раковых клеток или онкогенного вируса, способна замедлить развитие опухоли, продлить срок жизни, а в некоторых случаях даже излечить животных, в то время как контрольные погибают от прогрессивного развития болезни. Однако этот терапевтический эффект может быть обнаружен только у тех экспериментальных животных, которым трансплантировали 10^5 опухолевых клеток или меньше. В случае же введения их в дозе 10^6 или больше наблюдался быстрый рост бластоматозных клеток (Mathe e. a., 1969). Эти исследования показали, что активная специфическая иммунотерапия, очевидно, будет эффективной лишь в том случае, если массу опухоли предварительно уменьшить другими методами лечения.

Одной из нерешенных проблем, отрицательно влияющих на практическое применение активной специфической иммунотерапии является фактор дозы антигена, используемой для иммунотерапии. Показательны в этом отношении эксперименты Sedlacek e. a. (1975), которые установили, что иммунизация собак аутологичными опухолевыми клетками молочной железы в дозе 2×10^7 приводила к регрессии бластом, в то время как увеличение иммунизирующей дозы клеток до 1×10^8 оказывало действие, стимулирующее рост опухоли. Эксперимент убедительно продемонстрировал, что доза антигена, которая может оказаться как слишком малой, так и слишком большой, является существенным фактом в иммунотерапии. В целом эффективность иммунизации зависит от баланса между количеством имеющихся в организме опухолевых клеток, содержащих специфический антиген, и степенью специфического иммунитета, которую можно создать путем активной иммунизации.

Серьезной проблемой, препятствующей успешному применению аутологичных клеток с целью активной специфической иммунизации, является их слабая иммуногенность. В этой связи были предприняты попытки сделать неопластические клетки более антигенными, что приводит к усилению их иммуногенности. Czajkowski e. a. (1966, 1967) получили положительные результаты путем химического соединения (посредством бисдиазобензидина) аутологичных раковых клеток с кроличьим γ-глобулином, являющимся инородным сильноантигенным белком. Sanford (1976) показал in vitro, что обработка опухолевых клеток нейраминидазой холерного вибриона (NVC) увеличивает их антигенность.

Исследованиями Simmons e. a. (1974) установлено, что прививка клеток индуцированной метилхолантреном саркомы, обработанных нейраминидазой для иммунотерапии мышей-опухоленосителей, задерживает рост изологичной опухоли.

Sparks и Breeding (1974) использовали нейраминидазу в виде систематических инъекций и наблюдали некоторое замедление развития опухоли. Однако неизвестно, является ли механизм действия нейраминидазы в подобных случаях иммунным.

Один из возможных способов усиления иммуногенности опухолевых клеточных вакцин — обработка их конканавалином А, в результате которой заметно повышается способность реципиента к распознаванию минимальных различий в иммуногенности между нормальными и опухолевыми клетками (Meyer e. a., 1977).

В более ранних работах (Brugarolas e. a., 1972) также отмечено, что опухолевые клетки плазмацитомы мышей, обработанные конканавалином *А*, способствуют увеличению продолжительности жизни мышей-опухоленосителей. Обработка опухолевых клеток этим препаратом может приводить не к регрессии и торможению, а к усилению опухолевого роста.

Отрицательный результат при использовании конканавалина *А* был получен Brum (1975) на модели лимфосаркомы у хомяков, вызванной первоначально диметилбензантраценом. Coudert e. a. (1972) также наблюдали, что обработка опухолевых клеток папаином, который, как и нейраминидаза, увеличивает антигенность, ухудшает течение опухолевого процесса, сокращая продолжительность жизни мышей с саркомой.

Успехи применения активной специфической иммунотерапии экспериментальных опухолей определили интерес к иммунотерапевтическим попыткам в онкологической клинике. В качестве вакцинного материала использовались нативные аутологичные опухолевые клетки, обработанные тем или иным способом с целью предотвращения их пролиферации в организме реципиента (облучение, обработка некоторыми химическими веществами и т. п.).

В СССР первые наблюдения по применению аутовакцины из лизированных клеток рака молочной железы человека были начаты В. В. Городиловой с сотрудниками под руководством Л. А. Зильбера в МНИОИ им. П. А. Герцена. Анализ 10-летних результатов показал преимущество комбинированного лечения в сочетании с иммунотерапией перед обычным методом, не включающим иммунотерапию.

К настоящему времени в литературе появились сообщения об успешном применении активной специфической иммунотерапии опухолей некоторых локализаций (рак легкого, молочной железы и др.).

Takita и Brugarolas (1973) лечили больных с обширными бронхиальными карциномами «аутологичной опухолевой вакци-

ной». При этом наблюдалось клиническое улучшение состояния больных и увеличение продолжительности жизни.

Marcove e. a. (1974) вводили опухолевый водный экстракт больным остеосаркомами через месяц после оперативного лечения. Было отмечено, что ремиссия и продолжительность жизни этих больных были более длительными, чем контрольных, не получавших иммунотерапию.

Наконец, положительные результаты получили Grant e. a. (1974). Лечение меланомы аутологичными облученными опухолевыми клетками способствовало 4-недельной регрессии опухолевой массы, расположенной на глазной орбите.

Вместе с тем по данным других авторов, активная иммунотерапия из аутологичных опухолевых клеток при раке желудка или гепатокарциноме клинического эффекта не дала.

Итак, полученные к настоящему времени экспериментальные и клинические результаты свидетельствуют о том, что потенциальные возможности метода активной специфической иммунотерапии солидных опухолей все же имеются, и необходимы дальнейшие исследования, направленные на совершенствование этого метода и изучение сложного механизма иммунного ответа организма-опухоленосителя.

Комплексная иммунотерапия. В последнее время ряд исследователей применяют комплексную иммунотерапию путем сочетания активной специфической иммунизации с адъювантной терапией. Причем было обнаружено, что сочетание БЦЖ и облученных опухолевых клеток, вводимых в различные участки, оказалось более эффективным, чем введение каждого из этих агентов порознь (Mathe, 1968, 1969).

Sparks e. a. (1973) применяли комплексную иммунотерапию после хирургического удаления изологичной метастазирующей карциномы молочной железы у крыс. Было установлено, что подкожное введение БЦЖ в сочетании с опухолевыми клетками значительно увеличило выживаемость животных по сравнению с контрольными, которые были подвергнуты только операции.

На другой экспериментальной модели Levy e. a. (1974) показали, что оперативное удаление саркомы, индуцированной метилхолантреном, и последующее введение БЦЖ в сочетании с изологичными опухолевыми клетками намного уменьшало частоту рецидивов. Причем эффективность иммунотерапии зависела от величины опухоли. С увеличением ее размеров наблюдалось лишь незначительное продление жизни животных.

Весьма существенное значение в противоопухолевом действии имеет способ инокуляции опухолевых клеток и адъюванта. Результаты многочисленных исследований, проведенных на морских свинках (Littman e. a., 1973), на мышах (Tokunaga e. a., 1973) и на крысах (Baldwin, Pimm, 1973), показали преимущество введения опухолевых клеток в смеси с адъювантом.

Вместе с тем некоторые авторы, применявшие аналогичные иммунотерапевтические схемы, получили худший эффект. Так, Bartlett и Lbar (1972) было обнаружено, что опухолевые клетки, эмульгированные с полным АФ, оказались неэффективными в отношении саркомы мышей.

Основываясь на положительных результатах экспериментальных данных по иммунотерапии солидных опухолей, ряд исследователей использовал принцип активной системной специфической иммунотерапии в клинической практике. Работ такого рода не так много, однако они заслуживают пристального внимания. Например, Jerri e. a. (1978) провели углубленное изучение влияния иммунотерапии БЦЖ, левамизолом и аутовакциной у больных меланомой. При этом было отмечено, что, используя различные схемы иммунотерапии, можно получить неодинаковый по силе терапевтический эффект. Подобный факт авторы объясняют значительной стимуляцией кооперации *Т*- и *В*-клеточных систем иммунитета организма-опухоленосителя, нарушенной в процессе опухолевого роста.

Немаловажное значение придается *К*-клеткам (антителозависимые цитотоксические лимфоциты), которые резко усиливают функциональную активность под действием комплексной иммунотерапии. Эти клетки являются мощным фактором, разрушающим сенсибилизированные клетки-мишени, что может играть большую роль в элиминации опухолевых клеток из организма больного (Campbell, McLennan, 1976).

Пассивная специфическая иммунотерапия

Этот вид иммунотерапии основан на введении в организм-опухоленоситель сывороточных противоопухолевых антител, содержащихся у здоровых людей и животных, иммунизированных клетками злокачественной опухоли.

Многочисленные попытки применения аллогенных и гетерогенных сывороток для лечения различных форм экспериментальных опухолей не дали однозначных результатов. В литературе имеются лишь единичные наблюдения успешной пассивной иммунотерапии. Так, Peak (1971) сообщил об удачном использовании крови больного, который 4 года назад был излечен хирургическим путем от меланомы с метастазами в лимфатические узлы. Через 3 недели ему повторно была осуществлена эндолимфатическая инфузия крови (50 мл) от донора, оперированного 18 лет назад с тем же диагнозом. Спустя 2 года отмечался медленный регресс кожных и подкожных метастазов, а через 5 лет никаких симптомов заболевания не было выявлено. Интерпретировать этот эффект очень трудно. Можно полагать лишь, что сыворотка послужила пусковым механизмом, изменив течение опухолевого процесса,

ибо известно, что действие иммунных антител довольно кратковременно (около месяца).

Незначительный успех пассивной иммунотерапии объясняется недостаточной специфичностью используемых антисывороток к опухолеассоциированному антигену трансплантационного типа, проблема получения которого в настоящее время не решена. Кроме того, возможно побочное действие гетерогенных сывороток (нефропатия, анафилактический шок и др.). Известен также эффект, усиливающий рост опухоли, который могут оказывать иммунные сыворотки. Все вышеперечисленные факты существенно осложняют перспективы использования сывороток в иммунотерапии опухолей. Вместе с тем принципиальная возможность добиться деблокирующего терапевтического эффекта с помощью введения гуморальных антител делает поиски в этом направлении весьма многообещающими.

Адаптивная неспецифическая иммунотерапия

Адаптивная неспецифическая иммунотерапия заключается во введении больным злокачественными заболеваниями иммунокомпетентных клеток другого пациента, неиммунизированного по отношению к опухоли донора (клетки лимфатических узлов, селезенки, костного мозга сингенных и несингенных доноров). Несенсибилизированные лимфоциты способны воздействовать на опухолевые клетки вследствие реакции трансплантата против хозяина и в результате аллогенной ингибиции лимфоидными клетками опухолевых. Возможен и другой механизм в случае инокуляции клеток костного мозга в организм-опухоленоситель, который находится в продуктивной фазе иммуногенеза. Основываясь на экспериментальных данных А. А. Михайловой с соавт. (1976), можно полагать, что регуляторная функция костного мозга, введенного в организм-опухоленоситель, находящийся в продуктивной фазе иммуногенеза, может осуществляться путем конкурентного взаимодействия между стимулирующим фактором костного мозга и супрессорной активностью *Т*-лимфоцитов. Вероятно, стимулирующий фактор костного мозга обладает бóльшим сродством к рецепторам клеток-мишеней, чем эффекторы *Т*-супрессоров. Занимая рецепторы на клеточной поверхности, он оказывает стимулирующее действие и препятствует проявлению супрессорной функции *Т*-клеток. Не исключено также, что фактор, вырабатываемый клетками костного мозга, способен снимать супрессию с заблокированных *Т*-супрессорами антителообразующих клеток, инактивировать непосредственно *Т*-супрессоры или нейтрализовать вырабатываемый ими медиатор. Если высказанное предположение правильно, то можно надеяться, что метод адаптивной иммунотерапии может улучшаться, но для этого должна быть решена проблема выявления донора аллогенного костного мозга, удовлетворяющего тре-

бованиям максимальной гистосовместимости. Пока же результаты адаптивной неспецифической иммунотерапии солидных опухолей весьма скромные.

Адаптивная специфическая иммунотерапия

Адаптивная специфическая иммунотерапия заключается во введении больному злокачественной опухолью иммунокомпетентных клеток от иммунизированного или выздоровевшего от этого же заболевания донора с целью разрушения опухолевых клеток реципиента (Hall, 1970).

В литературе накапливается большой и интересный материал, касающийся опытов по инокуляции животным и человеку лимфоцитов от донора к реципиенту (Curtis e. a., 1970). В ходе успешных экспериментальных терапевтических исследований животных с различными солидными опухолями (Bill e. a., 1971; Costachel e. a., 1971) показано, что главную роль в подавлении или предотвращении опухолевого роста играют *Т*-лимфоциты (Freedman e. a., 1972; Likasewycz e. a., 1970).

В настоящее время наиболее перспективным видом специфической адаптивной иммунотерапии является использование так называемого фактора переноса (Transfer factor) и РНК.

Фактор переноса был впервые описан Lawrence в 1954 г., показавшим, что с помощью бесклеточного экстракта из лейкоцитов, сенсибилизированных стрептококковым антигеном, можно перенести РГЗТ к этим антигенам другому индивиду (Griscelli e. a., 1973). Было установлено, что фактор переноса избирательно стимулировал *Т*-клетки, ответственные за реакции клеточного иммунитета. До сих пор у данного фактора не удалось выявить способности переносить гуморальный иммунитет. Предполагают, что он активирует лишь *Т*-клетки, не влияя на *В*-клетки. Этот факт чрезвычайно важен, так как, если это действительно имеет место, в этом случае не происходит синтеза блокирующих антител (Basten e. a., 1975).

В последние годы фактор переноса с определенным терапевтическим успехом применяется в иммунотерапии злокачественных опухолей. Levin e. a. (1975) описали результаты использования фактора переноса, полученного у родственников 13 больных с остеогенными саркомами. Во всех случаях после иммунотерапии данным фактором усилилась специфическая цитотоксичность лимфоцитов по отношению к опухолевым клеткам. У 6 человек, которым фактор переноса вводился в качестве адъюванта после хирургического вмешательства, продолжительность ремиссии колебалась от 9 до 26 мес (в среднем 16 мес).

Имеются и другие сообщения, свидетельствующие об эффективности использования фактора переноса у больных солидными опухолями (Krementz e. a., 1974; Lo-Buglio, Neidhart, 1976).

Интересные данные представили Yasuda e. a. (1980), изучав-

шие влияние фактора переноса на состояние *Т*-клеточного иммунитета при раке легкого. Авторы показали, что его применение способствовало усилению реактивности лимфоцитов на ФГА in vitro и коррелировало с РГЗТ in vivo. Кроме того, был установлен чрезвычайно важный факт, свидетельствующий о том, что фактор переноса устранял блокирующее действие сыворотки у больных раком легкого.

Следует отметить, что применение фактора переноса имеет свои технические трудности, заключающиеся в подборе донора. В качестве адекватного критерия для отбора обычно используют результаты исследования in vitro, подбирая лиц с положительными клеточными иммунными реакциями на соответствующий ассоциированный с опухолью антиген (Lo-Bulgio e. a., 1973; Levin e. a., 1975).

Другим видом адаптивной специфической иммунотерапии опухолей является использование РНК, экстрагированной из лимфоидных клеток животных и человека.

Alexander e. a. (1967) в экспериментах на крысах с саркомой, индуцированной бензпиреном, показал, что введение РНК, экстрагированной из лимфоидных клеток овец, которые были предварительно иммунизированы этой опухолью, приводит к замедлению роста саркомы, а в отдельных случаях к их регрессии.

На другой опухолевой модели Rigby (1969) продемонстрировал увеличение продолжительности жизни у мышей с асцитной опухолью Эрлиха в результате инокуляции им сингенных селезеночных клеток, предварительно инкубированных с иммунной РНК из селезенок мышей, иммунизированных этой опухолью. Londner e. a. (1968) описали замедление роста трансплантатов спонтанной саркомы крыс после внутрибрюшинной инъекции иммунной РНК, экстрагированной из селезенок крыс, иммунизированных той же опухолью.

Результаты описанных выше экспериментов послужили основанием для проведения клинических исследований (применения иммунной РНК в иммунотерапии солидных опухолей).

Pilch e. a. (1976) установили, что применение иммунной РНК приводит к улучшению общего состояния больных с различными формами злокачественных новообразований и стабилизации опухолевого роста.

Таким образом, положительные результаты применения специфической адаптивной иммунотерапии РНК указывают на перспективность этого метода и требуют дальнейшего его совершенствования, тем более, что он не предполагает введения сыворотки или плазмы, которые могут содержать блокирующие факторы, способные усиливать опухолевый рост. Кроме того, исключается опасность развития реакции «трансплантат против хозяина». Следует отметить, что перечисленные выше достоинства иммунотерапии с помощью РНК могут быть распространены и на иммунотерапию фактором переноса.

Комбинированная химиоиммунотерапия

Многие исследователи в последние годы приходят к выводу, что в некоторых случаях результаты комбинированной химиоиммунотерапии злокачественных опухолей лучше, чем использование каждого из этих методов в отдельности.

Currie и Bagshawe (1970) отметили положительный терапевтический эффект у мышей-носителей изогенной фибросаркомы при инокуляции внутрикожно 200 мГт Corynebacterium parvum через 12 дней после химиотерапии ЦФ. В этом случае полная регрессия опухоли наступила у 70% животных, в то время как раздельное применение этих препаратов было неэффективным. Интервал в 12 дней между введением адъюванта и цитостатика оказался чрезвычайно важным, ибо, когда он составлял 6 или 16 дней, полной регрессии не достигалось.

Не менее интересные результаты были получены Culo e. a. (1980), которые показали, что эффективность влияния ЦФ на развитие опухоли Эрлиха зависит от времени введения цитостатика после перевивки опухоли. Так, инокуляция ЦФ на 5-й или 7-й день после прививки асцитной опухоли Эрлиха увеличивала продолжительность жизни мышей с опухолью, в то время как введение его на 2-й или 11-й день укорачивало жизнь экспериментальных животных. С помощью метода химиоиммунотерапии, используя иммунные клетки селезенки и ЦФ, авторам удалось доказать существенную важность для организма-опухоленосителя величины дозы цитостатика и времени введения иммунокомпетентных клеток. Инокуляция иммунных клеток селезенки и ЦФ на 11-й день неэффективна, в то время как эта же комбинация на 2-й день после прививки приводит к 60%-ной регрессии опухолей. Использование этого же соединения, но в более поздние сроки (на 5-й и 7-й дни) способствует снижению количества выживших животных. Применение высоких доз ЦФ (240—300 мг/кг) в сочетании с иммунокомпетентными клетками уменьшало процент выживших животных. Этот факт свидетельствует о том, что побочный эффект ЦФ не полностью компенсируется переносом иммунных клеток селезенки.

Значительный интерес представляют исследования японских авторов (Kataoka e. a., 1980), которые установили, что комбинированное применение митомицина *C* в дозе 1,25 мг/кг на 5-й день после трансплантации опухоли вместе с вакциной, приготовленной из этой опухоли в соединении с конканавалином *A*, усиливает противоопухолевый терапевтический эффект. Такая комбинация более эффективна, чем использование каждого агента в отдельности. Авторы объясняют положительный противоопухолевый эффект химиоиммунотерапии, использованной ими в эксперименте, действием митомицина *C* на *T*- и *B*-супрессоры организма-опухоленосителя, исчезновение которых улучшает противоопухолевый эффект вакцины.

В литературе имеются данные, свидетельствующие о том, что эффективность химиоиммунотерапии зависит от степени антигенности опухоли. Giuliani e. a. (1974) на модели вирусной саркомы Молони показали, что использование БЦЖ в сочетании с адриамицином дает положительный терапевтический эффект, в то время как применение этой же комбинации на спонтанных опухолях молочной железы неэффективно.

Известно, что большинство химиотерапевтических агентов действует на клетки в фазе *S* или *M* (Bruce e. a., 1966; Van Putten, 1972). В этой связи можно предположить, что иммунотерапия будет минимально эффективной в фазе *S*, когда антигены, ассоциированные с опухолями, слабо выражены. В то же время ее эффективность, по всей вероятности, будет максимально действенна в фазе G, в процессе которой антигены интенсивно выражены (Cikes, 1971).

Экспериментальные исследования химиоиммунотерапии солидных опухолей выявили и отрицательные результаты этото метода лечения. Так, Mathe e. a. (1975) показали, что использование БЦЖ в сочетании с ЦФ при определенном режиме введения ухудшает терапевтическое действие последнего. На модели лейкоза эти же исследователи установили, что БЦЖ, инъецированная до ЦФ, ослабляет эффект низких доз цитостатика, а после — значительно повышает его.

Изучение механизма этого феномена показало, что БЦЖ, инокулированная до ЦФ, значительно продлевает жизнь аллогенного кожного трансплантата, что косвенно может свидетельствовать об усилении иммунодепрессивного действия такого сочетания.

В то же время Benett e. a. (1979) сообщили, что введение БЦЖ мышам $C_{57}BL/6$ приводит к активации клеток костного мозга, подавляя развитие Т-клеточного иммунитета in vitro. Причем было установлено, что активность супрессорных клеток зависит от дозы и схемы введения вакцины. Наивысшая активность супрессорных клеток отмечена на 7-й день после инъекции, а с 14-го дня она понижалась. Введение животным ЦФ по 60 мг/кг в день в течение 4 суток до или после БЦЖ усиливало индукцию супрессорных клеток последней. Эти эксперименты подтвердили данные Mathe e. a., а также помогли объяснить некоторые отрицательные результаты сочетания БЦЖ и ЦФ.

Ряд исследователей опубликовали результаты клинических испытаний сочетания химио- и иммунотерапии у больных с солидными опухолями. Cohen e. a. (1979) применили комбинацию тимозина и различных цитостатиков. Авторы отметили значительное увеличение продолжительности жизни больных, получивших метод химиоиммунотерапии, объясняя этот эффект восстановлением иммунного дефицита, возникшего вследствие опухолевого процесса или химиотерапии.

Комбинация иммунотерапии левамизолом и полихимиотерапии

при распространенном раке молочной железы также выявила преимущество использования этого метода лечения. Было установлено (Klefström, 1980), что левамизол наиболее эффективен в сочетании с цитостатиками в случае наличия метастазов в лимфоузлы, печень, легкие, в меньшей степени при метастазах в кости и неэффективен при метастазах в кожу и подкожные ткани.

Аналогичный положительный результат получен Hortobagy (1979) у больных с метастатическим раком молочной железы, леченных БЦЖ и цитостатиками (5-фторурацил, адриамицин и ЦФ). Авторы сообщили о значительном улучшении противоопухолевого эффекта при использовании такой комбинации.

Таким образом, удовлетворительные терапевтические результаты после применения химиоиммунотерапии позволяют сделать вывод о принципиальной возможности и перспективности изучения этого метода лечения солидных опухолей.

Итак, несмотря на целый ряд неясных положений в отношении использования иммунотерапии в каждом конкретном случае при той или иной локализации опухоли, перспективность этого нового метода лечения злокачественных новообразований не вызывает сомнений. Ясно одно, что он может быть с успехом использован лишь при условии минимального количества опухолевых клеток, оставшихся после проведенного лечения. Дальнейшее познание эффекторных механизмов иммуногенеза и их модуляции при воздействии различных адъювантов, химио- и лучевой терапии поможет сделать иммунотерапию целенаправленным методом воздействия на иммунологические реакции организма, нарушенные в процессе канцерогенеза.

Глава X

КАНЦЕРОЛИТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ГИДРОБИОНТОВ

Хорошо известно, что возможность развития клинической химиотерапии опухолевых заболеваний в первую очередь связана с созданием более активных противоопухолевых препаратов. В последние годы большое внимание уделяется поискам новых противоопухолевых препаратов из морских организмов. Это зависит от необычности строения биологически активных веществ (БАВ) гидробионтов и их значительного ингибирующего эффекта в отношении роста экспериментальных опухолей. Вещества, угнетающие развитие этих опухолей, открыты в различных видах морских организмов растительного и животного происхождения. В химическом отношении ингибиторы клеточного роста быстро пролиферирующих тканей также относятся к самым разнообразным группам веществ — стероидам, терпенам, нуклеотидам, полипептидам, специфическим полипептидам, веществам невыясненного строения и т. д. Наиболее активными продуцентами «цитостатиков моря» являются губки, моллюски, иглокожие, кишечнополостные, членистоногие и хордовые (Petit, Day, 1970; Petit e. a., 1977, 1978, 1979).

Одно из весьма интересных веществ с цитотоксической активностью было выделено еще в 1950 г. Bergman из губки Cryptotethya Crypta. Изучение противоопухолевой активности привело к идентификации активных субстанций — спонготимидина и спонгоуридина. Следует отметить, что ранее эти нуклеотиды не были обнаружены. Спонготимидин и спонгоуридин явились как бы естественными моделями антиметаболитов в нуклеотидном обмене. Исходя из структуры нуклеозидов губки Cryptotethya Crypta, ученые приступили к синтезу новых аналогов пиримидина и пурина. В частности, был создан первый антиметаболит из группы аналогов пиримидинового обмена — *Д* — арабинозил-цитозин, показавший в эксперименте высокую эффективность как ингибитор роста саркомы-180, карциномы Эрлиха и лейкемии L1210 (Cohen, 1963; Kleine e. a., 1966).

В настоящее время этот антиметаболит применяется в кли-

нике отдельно и в комбинации с другими препаратами для лечения лейкозов, лимфом, меланом (Hart, 1969; Carter, 1974).

Наиболее интересным биологически активным веществом, обладающим мощным противоопухолевым действием, является голотурин, который относится к тетрациклическим тритерпеновым гликозидам голостанового ряда. ЦЭ голотурина впервые был установлен Nigrelli (1952) на мышах с имплантированной саркомой-180. Автор показал, что инъекции суспензии кювьеровых желез, предпринятые через 3 дня после инокуляции опухоли, вызвали уже на 6-й день распад и значительное уменьшение размеров новообразования. В опытах in vitro с культурой клеток мышиной саркомы-180 было продемонстрировано, что задержка роста опухолевой культуры голотурином зависит от концентрации в среде последнего. При использовании суспензии клеток саркомы-180, содержащей 10 млн. клеток в 1 мл, ингибирующее действие голотурина увеличивается с повышением его дозы в среде с 1 мкг до 1 мг. После тщательного перемешивания смеси культуры клеток с различными количествами голотурина в течение часа во вращающемся аппарате при температуре 34°*C* мышам подкожно вводили по 2×10^6 опухолевых клеток. Спустя 7 дней развившиеся опухоли иссекали, исследовали и взвешивали. Результаты опыта указывают на то, что предварительная обработка культуры клеток саркомы-180 голотурином значительно угнетает их рост.

В другом эксперименте (Sullivan e. a., 1955) было показано, что предварительная обработка опухолевых клеток (асцитная опухоль Кребс-2) голотурином в дозе 0,1 мг в 100% случаев предотвращает развитие новообразования после инокуляции 2×10^6 опухолевых клеток (60 дней наблюдения не выявили рецидивов). Контрольные животные, получившие то же количество клеток асцитной опухолевой культуры Кребс-2, погибли в среднем через 12,5 дней. Результаты исследований, проведенных на лабораторных животных, подтвердили прежние сообщения о подавлении роста новообразований голотурином и о зависимости его действия от величины дозы. Мышам инокулировали стандартные количества высоковирулентной культуры клеток асцитной опухоли Кребс-2 (4×10^6) и через день после трансплантации новообразования начинали вводить стерильный раствор голотурина в дозах 0,01, 0,05 и 0,1 мл на инъекцию для соответствующей серии опытных животных. Как в контрольной группе, так и у мышей, получавших голотурин в количестве 0,01 мг на инъекцию, наблюдался бурный рост новообразований. Животные быстро набирали вес (за счет асцита) и в течение 7—19 дней все погибали. У мышей, которым вводили внутрибрюшинно 0,05 мг голотурина, отмечалась тенденция к замедлению увеличения веса и возрастанию продолжительности жизни по сравнению с контрольной группой мышей-опухоленосителей, не получавших голотурин. Те же, но более отчетливо выраженные признаки наблюдались в эксперименте после применения голотурина в дозе 0,1 мг на инъекцию. В этом

случае при 7-10 инъекциях раствора средняя продолжительность жизни животных увеличивалась до 34,6 дня (контроль — 13,7 дня) и их средняя масса достигала 20,6 г (контроль — 30,2 г). Продолжительность жизни 4 из 24 мышей, получивших по 0,1 мг голотурина в течение 20 дней (10 инъекций), составила 6 мес.

С целью выяснения значения специфичности химической структуры гликозидов голотурина для ингибирующего действия на рост асцитной опухоли Кребс-2 была выполнена большая экспериментальная работа. Мышам линии JKR инокулировали 2×10^6 клеток асцитной опухоли и через 48 ч начинали вводить по 0,1 мг голотурина. Животным других групп с привитой опухолью инъецировали адекватно препараты стероидной структуры — сапонины, гликозиды, включая строфантин, дигиталис, дигитонин и т. д. На 10-й день средняя масса животных, получивших голотурин, составила 23,5 г (контроль — 32 г). Средняя продолжительность жизни животных в контрольных группах достигала 11,9 дня, мышей, которым вводили голотурин,— 25,4 дня; 11 мышей, леченных голотурином, прожили более 15 мес (Sullivan, Nigrelli, 1956). Этот эксперимент позволил выявить специфичность химической структуры голотурина.

Экспериментально была показана также ингибирующая активность голотурина из Actinopyga agassizi в отношении аденокарциноматоза мышей (Leither e. a., 1962) и эпидермальной карциномы человека в культуре (Nigrelli e. a., 1967).

Следует сказать, что лишь крайне незначительная часть иглокожих исследована на наличие БАВ и БАВ цитостатического действия.

Сапонины морских звезд — астеросапонины — имеют очень близкую к голотурину стероидную природу и наряду с ним обладают выраженным противоопухолевым действием. В процессе 10-летних экспериментально-поисковых работ исследователям Аризонского университета удалось обнаружить несколько видов морских огурцов, характеризующихся высокой цитостатической активностью (Petit e. a., 1976, 1978, 1979).

Механизм цитостатического действия тритерпеновых гликозидов изучен крайне недостаточно. В начале 50-х гг. было высказано предположение (Glaureat e. a., 1962), что цитостатическое действие стероидных астеросапонинов и голотурина может объясняться их пенетрацией в мембраны быстро пролиферирующих клеток и образованием прочных комплексов с их липидами, в частности, с холестерином, что ведет к структурным нарушениям мембран новообразующих клеток. Состав, свойства и получение голотурина хорошо описаны в литературе (Chanley e. a., 1959; Matsuno e. a., 1961; Yasumoto e. a., 1967; Туманян с соавт., 1979; и др.). Добавим лишь, что голотурин является смесью весьма близких по структуре гликозидов, у которых бóльшая часть, подобно растительным сапонинам и дигитонину, образует комплекс с холестерином. Голотурин хорошо растворяется в воде, легко

выдерживает стерилизацию кипячением и автоклавированием. Однако следует отметить, что это вещество высокотоксично. Гибель мышей наступает при внутривенном введении 5—15 мг/кг голотурина и интраперитонеальной инъекции его в дозе 10 мг/кг (Sullivan e. a., 1955; Friess e. a., 1960). Голотурин обладает также нейротропным, миотропным и гемолитическим эффектами (Friess e. a., 1960; Nigrelli, Jacowska, 1960).

Исследование различных видов кишечнополостных на наличие БАВ с цитостатической направленностью привело к открытию новых активных противоопухолевых средств. Одним из таких соединений является крассин-ацетат, относящийся к терпенам. Вещество было выделено в 1960 г. Ciereszko e. a. из мягких кораллов и обнаружило выраженную канцеролитическую активность (Rise e. a., 1970; Weinheimer e. a., 1975), тормозя рост саркомы-180 и лейкемии Р-388. И хотя в опытах на мышах цитостатическое действие крассин-ацетата оценивается как весьма умеренное (эффективная доза, вызывающая 50%-ное подавление роста опухоли, составляет 50—130 мг/кг), его открытие послужило стимулом для поиска более активных антимитозных БАВ среди других видов кишечнополостных, особенно среди коралловых полипов (Weinheimer e. a., 1975). Действительно, систематическое исследование коралловых полипов на наличие БАВ цитостатического действия привело к открытию новых видов гидробионтов, продуцирующих полициклические терпены с противоопухолевой активностью. В частности, из коралла Sinularia flexibilis (Австралия) были изолированы терпены — цембранолоиды — синуларин, дигидросинуларин и синуларнолид, привлекшие внимание исследователей высокой цитостатической активностью: эффективная доза, вызывающая 50%-ное подавление опухолевых клеток in vitro (эпителиальная карцинома человека и лейкемия Р-388), составляет 0,3 и 0,3; 16 и 1,1; 20 и 7,0 мкг/мл соответственно (Weinheimer e. a., 1977). В опытах на животных также подтверждено выраженное цитостатическое действие этих цембранолоидов, особенно синуларина (препарат NSC 285706), в частности, в отношении лейкемии Р-388 (Weinheimer e. a., 1977).

Несомненный интерес представляют дитерпены, выделенные из других видов кораллов, обитающих в различных регионах Тихого океана. Все эти БАВ являются производными цембрена, весьма близкими стереохимически и структурно к крассин-ацетату и синуларину. Так, в коралле Nephthea sp. (Маршалловы острова) обнаружены 0,75% эпоксинефтенола-ацетата и 0,05% нефтенола соответственно (Schmitz e. a., 1974), в коралле Lobophytum crista-gall (Индонезия) — цембранолоид-лобофитолид (Tursch e. a., 1974), в коралле Litophyton viridis — дитерпен-2-гидроксинефтенол (Fursch e. a., 1975).

Систематические исследования полипов на наличие новых БАВ привели к выделению исключительно интересного в химическом и фармакологическом отношениях соединения, названного пали-

Таблица 29. Сравнительная цитостатическая активность палитоксинов, полученных из различных видов кораллов, в отношении карциномы Эрлиха (по Quinn e. a., 1974)

Источник	Доза, мкг/кг	Количество животных	Смерть от интоксикации	Выживаемость в течение 30 дней,%	
				выжившие	без асцита
Palythoa toxica	1,28	5	5	—	—
	$6{,}4\times10^{-1}$	5	5	—	—
	$3{,}2\times10^{-1}$	5	—	100	100
	$1{,}6\times10^{-1}$	5	—	80	60
	$0{,}8\times10^{-1}$	5	—	—	—
Palythoa mammilosa	1,28	5	5	—	—
	$6{,}4\times10^{-1}$	5	1	100	100
	$3{,}2\times10^{-1}$	5	—	80	80
	$1{,}6\times10^{-1}$	5	—	—	—
	$0{,}8\times10^{-1}$	5	5	—	—
Palythoa spp.	1,28	5	5	—	—
	$6{,}4\times10^{-1}$	5	4	100	100
	$3{,}2\times10^{-1}$	5	—	40	40
	$0{,}8\times10^{-1}$				

токсином. Интерес к палитоксину в определенной степени связан с историей его открытия и обусловлен, главным образом, сложностью его строения и разнообразием вызываемых им фармакологических эффектов, из которых наиболее существенным является цитостатическое действие, в частности, в отношении лейкемии Р-338 и асцитной карциномы Эрлиха (Quinn e. a., 1974). Палитоксин нельзя отнести ни к одной из известных структур: пептидам, гликозидам, стероидам и т. д. Следует отметить, что данное соединение в дозе 5 мг/кг вызывает четкое угнетение роста асцитной карциномы Эрлиха.

Экспериментальные данные цитостатического действия палитоксина и этанольных экстрактов из различных полипов приведены в табл. 29, из которой видно, что с увеличением дозы вещества усиливается противоопухолевая активность (Quinn e. a., 1974).

Многие виды моллюсков использовались еще в античной, народной и китайской медицине с различными лечебными целями. Однако только в начале 50-х гг. XX века появились сообщения, подтверждающие сведения о способности вытяжек из некоторых моллюсков тормозить клеточное деление, влияя, таким образом, на тканевый рост. Изучение противоопухолевой активности этих вытяжек показало, что во многих случаях они проявляют ингибирующее действие на рост опухолей in vitro и in vivo, это относится, кроме того, к веществам неустановленного строения, выделенным, например, из моллюсков Loligo pealii, Mercenaria Mercenaria, Busycon cananiculatum, Crassostrea virginica, Mercenaria camprechiensis и др.

В одном из первых общих описаний свойств экстракта, сепа-

рированного из моллюска Mercenaria Mercenaria, отмечается его значительная ингибирующая активность в отношении саркомы-180 белых мышей (Schmeer, 1964). В опытах экстракт этого вида моллюска вызывал задержку роста саркомы-180 мышей в дозах, не оказывающих токсического действия. Причем мыши с опухолью, не получавшие Mercenaria Mercenaria, все погибали в течение 10 дней, в то время как продолжительность жизни леченных животных достигала 6 мес. При вскрытии у этих мышей отсутствовали признаки пролиферативных изменений.

Несколько позднее появились сообщения о цитостатической активности экстракта Mercenaria Mercenaria в отношении асцитной опухоли Кребс-2 мышей (Schmeer, 1964). Особенно интересно сообщение Timmermans e. a. (1978), которые получили из моллюсков избирательное, но токсичное в отношении опухолей вещество — сакситоксин. Летальная доза сакситоксина для человека — 5 мг: через 1—3 ч после его введения появляются первые симптомы — расслабление мышц и нарушение периферической нервной системы. Если через 12 ч больной не умирает от токсического действия сакситоксина, то опухоль регрессирует в течение нескольких дней. Авторы сообщают, что имеется значительное различие в чувствительности опухолевых и нормальных клеток к этому веществу. Первые — более чувствительны. В этой связи возможно введение сакситоксина в минимальных дозах, которые не оказывают повреждающего действия на нормальные клетки и цитотоксичны по отношению к опухоли. Авторы рекомендуют применение сакситоксина в терапевтических дозах для лечения онкологических больных как самостоятельно, так и после хирургического вмешательства.

Среди многочисленной группы соединений с цитостатической активностью, выделенных из морских организмов, особое внимание привлекают кейлоны — вещества пептидной природы, участвующие в регуляции митотического деления клеток. Являясь специфическими ингибиторами клеточного деления, кейлоны способны вызывать обратное развитие опухолей самой различной этиологии и локализации. В литературе имеются сведения о том, что в клетках животных-обитателей Мирового океана синтезируется значительное количество тканеспецифических кейлонов, легко экстрагируемых в обычных условиях и оказывающих ингибирующее действие на развитие опухоли (Bullough e. a., 1967, 1968).

Таким образом, исследование БАВ с цитостатической направленностью из организмов моря привело к открытию новых канцеролитических средств с противоопухолевым действием. Анализ тенденции развития морской фармакологии дает основание надеяться, что в ближайшем будущем будут созданы высокоэффективные противоопухолевые средства. Не исключено обнаружение новых путей торможения злокачественного роста. А это в свою очередь даст возможность использовать найденные принципы про-

тивоопухолевого действия БАВ гидробионтов для целенаправленного создания синтетических лекарственных препаратов.

В заключение следует сказать, что к имеющимся шести группам противоопухолевых препаратов можно присоединить седьмую группу веществ, полученных из гидробионтов. Дальнейшее накопление знаний механизма противоопухолевого действия канцеролитических средств, полученных из морских организмов, будет способствовать разработке рациональных схем их использования в терапии злокачественных опухолей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленный в книге экспериментальный материал убедительно свидетельствует о том, что неопластическое превращение клеток — сложный, многоэтапный макромолекулярный процесс, который всегда сопровождается антигенной трансформацией. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в изучении антигенной структуры опухолевых клеток, до сих пор не уточнена роль антигенной перестройки в иммунном ответе. Не ясно, обусловливаются ли селективные преимущества трансформированных клеток экспрессией на плазматических мембранах антигенов, которые отражают, по существу, механизм опухолевого превращения клеток, или же они являются «сопутствующими продуктами» онкогенеза. При этом важно подчеркнуть, что каждая опухоль практически индивидуальна по основным иммунологическим характеристикам — иммуногенности и иммуночувствительности. Исключение составляют злокачественные новообразования вирусной природы только за счет сильных TSTA- или TSSA-антигенов, но и они на поверхностных мембранах несут индивидуальные антигенные детерминанты. Следовательно, взаимоотношения между неопластически трансформированными клетками и иммунокомпетентной системой организма также в основной своей массе индивидуальны, и поэтому, естественно, различные воздействия на организм, обусловливающие супрессию или стимуляцию иммунного ответа, по-разному влияют на бластоматозный процесс. Анализ огромного экспериментального и клинического материала по антигенным изменениям тканей-мишеней в динамике канцерогенеза показал, что такой подход не может дать ответа о роли происходящих белковых сдвигов в этом процессе. Поэтому разработка новых методических приемов и теоретических основ в этом направлении является весьма актуальной.

На протяжении последних лет в лаборатории вирусологии МНИОИ им. П. А. Герцена была предложена, а затем экспериментально обоснована новая концепция вирусного канцерогенеза (на системе мыши СВА + ДНК-содержащий опухолеродный вирус SA7 (C8)), согласно которой на плазматических мембранах

трансформированных клеток экспрессируются как минимум две группы антигенов, распознаваемых в аутосистеме и специфичных в отношении иммуностимуляции и иммуноингибиции опухоли (Агеенко, Ерхов, 1977, 1978, 1979; Агеенко, 1978). Принципиальное отличие постулируемой концепции заключается в том, что вирусный канцерогенез рассматривается как следствие взаимодействия неопластически трансформированных клеток, несущих на поверхностных мембранах стадиоспецифические эмбриональные антигены, с возникающими клонами иммунокомпетентных клеток, обусловливающих усиление их пролиферативной активности путем действия на эти антигены. При этом имеется в виду присутствие на поверхности опухолевых клеток антигенов как для иммуноцитолиза, так и для иммуностимуляции. Предполагается, что в случае прогрессивного роста трансформированных клеток величина мишени для иммуностимуляции их роста значительно больше, чем для иммунодеструкции опухолевых клеток. Поэтому блокирование роста опухоли рассматривается как частный случай иммунологических взаимоотношений опухоль-организм. Следовательно, иммунный ответ на неопластические клетки, согласно концепции, состоит из двух взаимодействующих компонентов: стимулирующего и подавляющего опухолевый рост. При таком подходе вполне объяснимы те несоответствия, которые иногда имеют место при обсуждении теории иммунологического надзора Burnet (1971). Кроме того, следует обратить внимание на то, что предлагаемая концепция рассматривает аутоиммунитет как одно из звеньев канцерогенеза, то есть возникновение клонов лимфоцитов, иммунных к определенным опухолеассоциированным антигенам, что создает дополнительный пролиферативный стимул. С этих позиций механизм иммуностимуляции постулируется как общий регулятор роста тканей в организме, в частности, регенерирующих. Таким образом, данная концепция, вероятно, может иметь более широкий диапазон и канцерогенез можно рассматривать как частный случай нарушения физиологического аутологичного иммунного контроля клеточной пролиферации.

Итак, нельзя исключить, что иммуностимуляция является механизмом, запускающим канцерогенез, а затем, вероятно, играющим существенную роль в прогрессии опухолей. Иными словами, быстрое размножение трансформированных клеток происходит тогда, когда на их поверхности появляется антиген (антигены), вызывающий стимуляцию их роста. В роли таких антигенов могут, по-видимому, выступать вирусиндуцированные полипептиды в различных сочетаниях с эмбриональными белками. Показано, что иммуностимуляция может обусловливаться иммунными *Т*-клетками, коммитированными к эмбриональным опухолеассоциированным антигенам (Агеенко, Ерхов, 1979). Фракционирование позволило установить, что W325-*Т*-лимфоциты вызывают стимуляцию роста опухоли, в то время как $W325^{+}$-*Т*-лимфоциты осуществляют быструю регрессию трансформированных клеток (Fernandez-

Cruz e. a., 1980). Недавно было также обнаружено, что стимулирующим эффектом роста различных сингенных опухолей обладают макрофаги (Gabizon e. a., 1980).

Таким образом, учитывая вышеизложенное, можно предполагать, что канцерогенез является системой с положительными обратными связями, часть которых несомненно имеет иммунологическую природу.

К успехам, достигнутым при исследованиях функций иммунитета при канцерогенезе, относится установление корреляций между чувствительностью (или резистентностью) к канцерогенезу различных линий мышей и их способностью подвергаться иммунодепрессии под влиянием РНК- и ДНК-содержащих онковирусов (Агеенко, Ерхов, 1974; Ерхов, Агеенко, 1974; Kummer, 1976). Показано, что ген, определяющий чувствительность к онкогенезу, индуцированному аденовирусом обезьян SA7(C8), наследуется как рецессивный однофакторный признак. Следовательно, системное действие опухолеродного вируса, вероятно, детерминировано генетически.

Важно отметить, что онковирус, первично трансформировавший клетки, активно участвует в их прогрессии как за счет эпигеномных механизмов регуляции, так и в качестве модулятора иммунного ответа на трансплантационный опухолевый антиген путем иммунодепрессии, стимуляции выработки блокирующих комплексов антиген-антитело и др., то есть факторов, ускоряющих онкогенез. При этом иммунодепрессия, являющаяся общим универеальным свойством всех канцерогенных агентов, в отношении TSTA представляет собой, по-видимому, один из механизмов, лимитирующих специфический противоопухолевый иммунитет.

Второй компонент иммунного ответа на опухоль осуществляет функции иммунологического надзора, который представляет собой многофакторную систему защиты. Первым звеном этого сложного механизма является естественная резистентность, важная роль в которой принадлежит макрофагам, моноцитам и лимфоидным клеткам, не несущим типичных маркеров *T*- и *B*-лимфоцитов и не относящимся к макрофагально-моноцитарным клеткам. Общими отличительными свойствами этих клеток являются присутствие на их поверхностных мембранах Fc-рецептора и способность оказывать цитотоксический эффект без предварительной сенсибилизации. Однако по механизму литического действия эти лимфоциты могут быть разделены на два основных типа: *K*- и NK-клетки. *K*-лимфоциты осуществляют комплементнезависимый цитотоксический эффект, лизируя клетки-мишени, покрытые специфическими антителами. При этом Fc-рецептор *K*-лимфоцита связывается с Fc-фрагментом антител класса IgG на поверхности клеток-мишеней. NK-клетки способствуют цитолизу клеток-мишеней при помощи Fc-рецепторов или вследствие прямого контакта с клетками-мишенями, используя с этой целью свои специальные рецепторы к лизируемым клеткам.

Считают, что естественные клетки-киллеры и *К*-лимфоциты обусловливают наиболее ранний контроль опухолеобразования, элиминируя любые мутировавшие или неопластически трансформированные клетки. Иными словами, они являются, по-видимому, первыми клетками, атакующими любые измененные единичные клетки в организме.

Помимо описанных лимфоидных клеток существует популяция *Т*-лимфоцитов, которые также не требуют сенсибилизации для проявления цитотоксического действия по отношению к трансформированным клеткам. Особенно эффективно эти *Т*-лимфоциты уничтожают быстро размножающиеся несингенные клетки-предшественники: остеобласты, стволовые кроветворные клетки, предшественники антителопродуцентов и т. д. (Петров с соавт., 1981).

Очевидно, одновременно или несколько позже (необходимо определенное количество TSTA- или других антигенов, функционирующих в качестве трансплантационных, например, сам ретровирус С-типа или его структурные белки gp70 gp85 tsE, p30 и т. д.) включаются механизмы специфического противоопухолевого иммунитета, обеспечивающие выработку двух типов эффекторных клеток: сенсибилизированных *Т*-киллеров и *В*-лимфоцитов, продуцирующих специфические антитела. Причем появление даже в небольших количествах специфических антител обусловливает необходимые условия для киллерного действия *К*-лимфоцитов. Эти и другие имеющиеся экспериментальные факты дают возможность предполагать, что обе системы (естественной резистентности и специфического противоопухолевого иммунитета) не только дополняют, но и зависят друг от друга. Вместе с тем до сих пор много неясного во взаимоотношениях этих двух систем иммунологического надзора, и в должной мере не исследованы вопросы общих и локальных механизмов их действия. Недостаточно изучены также свойства, мембранные структуры естественных клеток-киллеров и *К*-лимфоцитов и практически не выяснены вопросы относительно идентичности этих лимфоидных клеток и их природы. Понятно, что изучение этой исключительно важной в общебиологическом значении проблемы несомненно будет способствовать, с одной стороны, разработке эффективных методов терапии, в том числе и иммунотерапии, и иммунопрофилактики рака, а с другой — внесет существенный вклад в понимание структуры и функций иммунокомпетентной системы организма.

Итак, несмотря на значительный прогресс в области изучения этиологии и патогенеза неопластического процесса, проблема терапии злокачественных опухолей все еще остается нерешенной. Одной из возможных причин недостаточной эффективности избираемого метода лечения бластоматозного процесса, по всей вероятности, является отсутствие объективного критерия оценки иммунологического статуса онкологического больного. Кроме того, не всегда ясно, насколько отдаленные результаты лучевого, химического или комбинированного лечения многих новообразо-

ваний лучше (или хуже) одного хирургического вмешательства. В то же время совершенно очевидно, что все используемые методы терапии опухолей являются активными факторами, влияющими на иммунный ответ организма-опухоленосителя.

Анализ большого числа работ по изучению иммунологического статуса животных и больных с различными формами прогрессивно растущих злокачественных новообразований позволяет предположить, что иммунная система опухоленосителя достаточно сохранена и функционально направлена главным образом на защиту неопластических клеток (иммуностимуляция, блокирующий фактор, *Т*-супрессоры и т. д.), а не организма-хозяина. Исходя из этих позиций становятся объяснимыми данные многих исследований о якобы несуществующей корреляции между кожной реакцией замедленной гиперчувствительности на различные антигены, а также других тестов in vitro и клиническим течением болезни.

Предполагается, что все современные методы терапии злокачественных опухолей используются с целью уничтожения в организме больного максимального количества опухолевых клеток. Однако хорошо известно, что ни в эксперименте, ни тем более в клинике не удалось подобрать такие дозы цитостатиков, которые бы разрушили все опухолевые клетки, не изменив при этом их антигенной структуры и состояния иммунного ответа организма-опухоленосителя. В то же время в результате многочисленных исследований установлено, что оставшиеся после проведенного лечения опухолевые клетки могут различными способами влиять на свой рост как посредством антигенов клеточной поверхности, измененной в процессе химиотерапии, так и продукцией факторов, способных воздействовать на эффекторные иммунные механизмы, усиливая активность клеток-супрессоров и т. д. Поэтому радикальное хирургическое удаление опухоли иногда ведет к длительному или даже полному выздоровлению. В случае отсутствия опухолевых клеток в кровотоке исчезают и блокирующие противоопухолевый иммунитет факторы. Если же после оперативного удаления бластомы сохраняется какое-то количество опухолевых клеток, то блокирующие факторы не исчезают и возможен рецидив неопластического процесса, который также может возникнуть за счет механизмов иммуностимуляции опухолевого роста.

Лекарственная терапия онкологических больных все более широко используется как самостоятельно, так и сочетанно с другими методами воздействия на опухолевый процесс. С ее помощью при некоторых формах злокачественных новообразований удается получить весьма значительные результаты, а в некоторых случаях — полное излечение больного. Однако исход неопластического процесса зависит не только от прямого воздействия химиопрепаратов или лучевой энергии на опухолевую клетку, но и от их влияния на иммунологическую реактивность организма.

Изучение роли *Т*- и *В*-клеточных систем иммунитета у животных—носителей опухолей приблизило нас от эмпирического под-

бора цитостатиков к более рациональному выбору оптимальных доз и ритмов введения противоопухолевых лекарственных средств с учетом каждого конкретного случая неопластического процесса. Более того, экспериментальное исследование иммунного ответа опухолевых животных, получавших пред- и послеоперационную химиотерапию, выявило чрезвычайно важный для клиники факт, свидетельствующий о том, что применение максимально переносимых доз цитостатиков после операции нецелесообразно. Можно полагать, что это связано не с иммунодепрессивным действием цитостатика, а с его иммуномоделирующим эффектом. Учитывая тот факт, что большинство исследователей изучало действие цитостатиков при введении их до перевивки опухоли, нам представляется, что такая постановка экспериментов исключает возможность объективно оценивать состояние специфического противоопухолевого иммунитета, так как не позволяет ответить на вопрос: усиливается или ослабляется специфический противоопухолевый иммунитет под действием этих цитостатиков.

Экспериментальные исследования С. П. Гордиенко и В. М. Бергольц (1973, 1974), направленные на изучение влияния низких и высоких доз ЦФ на рост саркомы, индуцированной метилхолантреном, убедительно показали, что низкие дозы препарата оказывали лучший терапевтический эффект, чем высокие. Авторы полагают, что низкие дозы ЦФ способны стимулировать специфический иммунный ответ хозяина на опухолевый антиген, в то время как высокие — оказывают иммуномоделирующее действие. Это проявляется на первом этапе иммунодепрессией, а впоследствии — стимулирующим действием на иммуногенез.

Итак, можно полагать, что усиление роста и метастазирования опухоли происходит не в период иммунодепрессии, вызванной высокими дозами цитостатиков, а в период восстановленного или даже усиленного иммуногенеза, так как известно, что в каждом цитостатике заложен иммуностимулирующий эффект.

Таким образом, описаны два варианта действия противоопухолевых лекарственных средств на противоопухолевый иммунитет: синергизм или антагонизм их действия, а также их способность снимать или снижать противоопухолевый или трансплантационный иммунитет. Эти различия в экспериментальных исследованиях, возможно, связаны с неодинаковым действием цитостатиков на фазы иммунного ответа. Установлено, что индуктивная фаза иммуногенеза более чувствительна, чем продуктивная, а организм-опухоленоситель находится именно в последней.

Известно, что цитостатики в зависимости от дозы и ритма введения могут значительно изменять иммунологический статус. С. П. Гордиенко, К. В. Боцманов (1973) и С. П. Гордиенко, В. М. Бергольц (1974) обнаружили, что, меняя ритм введения ЦФ, можно значительно улучшить терапевтический эффект. Причем было установлено, что реализация противоопухолевого эффекта происходит за счет потери сывороткой опухоленосителя имму-

ностимулирующего эффекта и приобретения при этом цитотоксического действия. Эти эксперименты убеждают, что положительный противоопухолевый эффект может быть получен, если учитывать состояние специфической противоопухолевой резистентности.

В то же время была установлена целесообразность использования предоперационной химиотерапии, так как при этом не происходило снижения противоопухолевой резистентности. Этот факт, возможно, связан с тем, что ЦФ, являясь цитостатиком, способствует некротизации значительной массы опухолевой ткани. Альтерация и некротизация неопластических клеток усиливает их антигенные свойства, тем самым активируя иммунологические реакции организма против опухоли.

Одним из методов терапии онкологических больных является иммунотерапия, основная цель которой — восстановление и стимуляция физиологических иммунных механизмов, которые могут быть направлены на элиминацию малигнизированных клеток. Однако следует отметить, что ее результаты довольно скромны. Это связано с отсутствием на сегодняшний день четкой характеристики опухолевых антигенов, особенно человека, их локализации, иммуногенности, антигенности, перекрестной реактивности с нормальными компонентами тканей, а также взаимодействия с иммунокомпетентной системой организма. Кроме того, наши знания эффекторных механизмов *Т*- и *В*-лимфоцитов и их популяций макрофагов все еще явно недостаточны. Тем не менее многочисленные экспериментальные и относительно редкие клинические данные свидетельствуют о том, что адъюванты оказывают многостороннее стимулирующее влияние на иммунную реактивность организма. В то же время в определенных условиях они могут оказывать супрессивный эффект. Этот факт чрезвычайно важен, так как адъюванты используются, как правило, в сочетании с химиотерапией, а это может потенцировать иммунодепрессивное действие цитостатиков.

В настоящее время не вызывает сомнений, что иммунные механизмы, активированные иммунотерапией, могут не только подавлять опухолевый рост, но и усиливать его, защищая малигнизированные клетки от цитотоксических воздействий.

Развитие клинической химиотерапии опухолевых заболеваний в первую очередь связано с созданием новых, более активных противоопухолевых препаратов. В связи с этим в последние годы большое внимание уделяется поискам новых противоопухолевых средств из морских организмов. Анализ тенденций развития морской фармакологии дает основание надеяться, что в ближайшем будущем будут созданы высокоэффективные противоопухолевые средства. Не исключено обнаружение принципиально новых путей торможения злокачественного роста. А это в свою очередь даст возможность использовать найденные принципы противоопухолевого действия БАВ гидробионтов для целенаправленного создания синтетических лекарственных препаратов.

CONCLUSIONS

Experimental material presented in the book convincingly bears the evidence that the neoplastic conversion of cells is a complicated, multistage macromolecular process, which is always accompanied by antigenic transformation. In spite of the significant successes, achieved in studying the antigenic structure of tumor cells, the role of antigenic reconstruction in the immune answer has not been specified till now. It is not clear whether the selective advantages of transformed cells are conditioned by the expression on plasmatic membrane antigenes, reflecting essentially the mechanism of cellular tumor conversion, or they are „accompanying products" of oncogenesis. It is important to emphasize that each tumor is practically individual along its main immunologic characteristics — immunogenety and immunosensivity. The exception is malignant viral neoplasms only at the expense of strong TSTA- or TSSA-antigenes, but even they carry individual antigenic determinants on surface membranes. Therefore, interrelations between neoplastically transformed cells and the immunocompetent system of organism are mainly individual and that is why, naturally, various effects on organism, conditioning suppression of stimulation of the immune answer, have different influence on blastoma process. The analysis of a large volume of experimental and clinical material on antigenic changes of target-tissues in carcinogenesis dynamix showed that such an approach could not establish the role of occurring protein. shifts in this process. Therefore, the elaboration of new methodical ways and theoretical bases in this direction is very urgent.

During the last years the Virological laboratory of the Moscow Cancer Research Institute named after P. A. Herzen suggested and then experimentally grounded a new conception of viral carcinogenesis (on the mouse system CBA+DNA-containing tumor-bearing virus SA7 (C8)), according to which at least two antigenes groups, recognized in the autosystem and specific in relation to immunostimulation and immunoinhibition of tumor, are expressed on the plasmatic membranes of transformed cells (A. I. Ageenko, V. S. Yerkhov, 1977, 1978, 1979; A. I. Ageenko,

1978). The fundamental difference of the postulated conception lies in the fact, that viral carcinogenesis is treated as a consequence of the interaction of neoplastically transformed cells, carrying on surface membranes stagespecific embryonic antigenes with appearing clons of immunocompetent cells, conditioning the enhancement of their proliferative activity by affecting these antigenes. At the same time one should take into consideration the presence of antigenes tumor cells both for immunocytolysis and immunostimulation. It is assumed, that in case of the progressive growth of transformed cells the target size for immunostimulation of their growth is much greater than for the immunodestruction of tumor cells. Therefore, blocking of the tumor growth is treated as a particular case of the immunologic tumor-organism interrelations. Hence, according to the conception the immune answer to neoplastic cells consists of two interacting components: stimulating and suppressing tumor growth. Under such an approach the discrepancies, accuring when discussing the theory of immunologic inspection Burnet (1971), may be satisfactory explained. Besides, one should pay attention to the fact that the suggested conception treats autoimmunity as one of the carcinogenesis chains, i. e. the appearance of lymphocytes clons, immuned to definite antigenes, associated with tumor, and this creates an additional proliferative stimulus. From these positions the mechanism of immunostimulation is postulated as a common regulator of tissue growth in organism and regenerating, in particular. Thus, proceeding from this, the given conception may probably have a wider range and carcinogenesis may be treated as a particular case of physiological autological cellular proliferation immune control disturbance.

Thus, one cannot exclude the fact, that immunostimulation is a mechanism, starting carcinogenesis, and then playing, probably, a significant part in the progress of tumors. Otherwise, rapid reproduction of transformed cells takes place when an antigene (antigenes), causing their growth stimulation, appears on their surface. Virus induced polypeptides seem to play the part of such antigenes in various combinations with embryonic proteins. It is manifested that immunostimulation may be conditioned by immune T-cells, committed to embryonic antigenes, associated with tumor (A. I. Ageenko, V. S. Yerkhov, 1979). Fractionation made it possible to establish that W325-T-lymphocytes cause stimulation of tumor growth, while W325-T-lymphocytes exercise rapid regression of transformed cells (Fernandez-Cruz e. a., 1980). Recently it was discovered, that macrophages possess a stimulating effect of various syngenic tumors growth (Gabizon e. a., 1980).

Thus, taking into consideration the above mentioned facts, it may be assumed that carcinogenesis is a system with positive feed-back connections, part of which is, undoubtedly, of immunologic nature.

The successes achieved in the investigation of immunity functions in carcinogenesis also include the establishment of correlations between the sensivity (or resistance) to carcinogenesis of various mice strains and their ability to be affected by immunodepression under the influence of RND- and DNA-containing tumorbearing viruses (A. I. Ageenko, V. S. Yerkhov, 1974; V. S. Yerkhov, A. I. Ageenko, 1974; Kummer, 1976). It is manifested that the gene determining sensivity to oncogenesis, induced by monkeys adenovirus SA7 (C8), is inherited as a recessive single-factor feature. Therefore, the systematic effect of tumorbearing virus is probably determined genetically.

It is important to note that the tumorbearing virus, initially transformating cells, actively participates in their progression both at the expense of epigenomous mechanisms regulation and as a modulator of an immune answer to transplantation tumor antigene by way of immunodepression, stimulation of the production of blocking complexes antigene-antibody and others, i. e. factors accelerating oncogenesis. At the same time immunodepression, being a common universal quality of all carcinogenesis agents, in relation to TSTA is one of mechanism limitting the specific antitumor immunity.

The second component of the immune answer to tumor exercises the functions of immunologic inspection, which is a multifactor defence system. The first chain of this complicated mechanism is natural resistance, an important role in which belongs to macrophages, monocytes and lymphoid cells not carrying the typical T- and B-lymphocytes markers and not belonging to macrophage-monocyte cells. The common distinctive feature of these cells is the presence of Fc-receptor on surface membranes and their ability to produce cytotoxic effect without preliminary sensibilisation. Though according to the mechanism of lytic effect these lymphocytes may be divided into two main types: K- and NK-cells. K-lymphocytes exercise complement-independent cytotoxic effect, lysing the target-cells, covered by specific antibodies. At the same time Fc-receptor of K-lymphocyte gets into connection with antibody Fc-fragment of IGG class on the surface of target-cells. NK-cells promote the cytolysis of target-cells with the help of Fc-receptors or as a result of direct contact with target-cells, using for this purpose their special receptors to lysed cells.

It is considered that natural cell-killers and K-lymphocytes condition the most early control of tumor appearance, eliminating any mutated or neoplastically transformed cells. Otherwise, they seem to be the first cells attacking any solitary changed cells in organism.

Besides the lymphoid cells described, there exists a population of T-lymphocytes, which do not also require sensibilisation for revealing cytotoxic effect in relation to transformed cells. These T-lymphocytes especially efficaciously destroy rapidly reproducing

non-syngenous cells-precursors: osteoblasts, stem blood-forming cells, antibody-producer precursors and so on (Petrov e. a., 1981).

Evidently, simultaneously or a little later (necessary is a definite quantity of TSTA- or other antigenes, functioning as transplantation ones, for example C-type retrovirus itself or its structural proteins gp70, gp 85 tsE, p 30 and so on) mechanisms of specific antitumor immunity join in, providing the manufacture of two types of effector cells: sensibilized T-killers and B-lymphocytes producing specific antibodies. The appearance of specific antibodies even in small quantities stimulates the conditions necessary for killer effect of K-lymphocytes. These and other experimental facts give an opportunity to assume that both systems (of natural resistance and specific antitumor immunity) do not only supplement but also depend on each other. At the same time there are many vague points in interrelations of these two systems of immunologic inspection, the problems of common and local mechanisms of their efficacy have not been investigated up to the mark. Their properties, membrane structures of natural cells-killers and K-lymphocytes have not been sufficiently studied either and the problems of the identity of these lymphoid cells and their nature have not been practically revealed. It is clear that the study of this extremely important in the all-biological meaning problem will promote on the one hand the elaboration of efficacious methods of therapy, including cancer immunotherapy and immunoprophylaxis, and on the other hand will greatly contribute to understanding the structure and functions of organism's immunocompetent system.

Thus, inspite of the significant progress in the field of studying etiology and pathogenesis of neoplastic process, the problem of malignant tumors therapy still remains unsolved. One of the possible reasons for not sufficient efficacy of the selected treatment method of blastoma process must be the absence of the objective criterium of estimation of oncologic patient immunologic status. Besides, it is not always clear to what degree the distant results of ray, chemical or combined treatment of many neoplasms are better (or worse) than one surgical intervention. At the same time it is absolutely evident that all the employed methods of tumor therapy are active factors affecting the immune answer of tumor-carrier-organism.

The analysis of a large number of works studying the immunologic status of animals and patients with various forms of progressively growing malignant neoplasms makes it possible to assume that the immune system of tumor-carrier is sufficiently preserved and functionally directed mainly to the defence of neoplastic cells (immunostimulation, blocking factor, T-suppressor and so on) and not of master-organism. Proceeding from these positions the data of many investigations on allegedly non-existant correlation between skin reaction of delayed hypersensibility on various

antigenes and also other tests in vitro, and clinical course of a disease become explicable.

It is assumed that all the modern therapy methods of malignant tumors are employed for the purpose of destroying the maximum quantity of tumor cells in patient's organism. Though it is well-known that neither in experiment nor in clinic one failed to select such doses of cytostatics which would destroy all tumor cells without changing their antigene structure and the condition of the tumor-carrier-organism immune answer. At the same time as a result of numerous investigations it was established that tumor cells remained after the conducted treatment could in different ways affect their growth both by means of cellular surface antigenes modified in the process of chemotherapy and by the manufacture of factors capable of affecting the factor immune mechanisms enhancing the activity of suppressor-cells and soon. That is why radical surgical ablation leads sometimes to lingering or even complete recovery. In case of the absence of tumor cells in blood stream factors blocking the antitumor immunity also disappear. If after the surgical ablation of blastoma some quantity of tumor cells is preserved then the blocking factors do not disappear and the relapse of neoplastic process is possible, which is also possible at the expense of mechanisms of tumor growth immunostimulation.

Medical therapy of oncologic patients is used wider and wider both independently and in combination with other methods affecting tumor process. With its help in some forms of malignant neoplasms highly significant results are achieved and sometimes — complete patient's recovery. Though the outcome of neoplastic process depends not only on the direct effect of a chemodrug or ray energy on tumor cell, but also on their influence upon the immunologic reactivity of organism.

The study of the role of T- and B-cellular immunity systems of tumor-carrier animals brought us from the emperic selection of cytostatics nearer to a more rational selection of optimum doses and rhythms of introducing antitumor medicine with regard to each concrete case of neopastic process. And what is more the experimental investigation of the immune answer of tumor animals getting pre- and postoperational chemotherapy revealed an extremely important for clinic fact, testifying that the use of maximally endurable cytostatic doses is inexpedient. It may be assumed that this is connected not with immunodepressive effect of a cytostatic, but with its immunomodelling effect. Taking into consideration the fact that most investigators studied cytostatics effect when they were introduced before the transplantation of tumor such an arrangement of experiments seems to exclude the possibility of objectively estimating the condition of a specific antitumor immunity, as it prevents answering the question whether the specific anti-

tumor immunity is strengthened or weakened under the effect of these cytostatics.

The experimental investigations of S. P. Gordienko and V. M. Bergolts (1973, 1974), aimed at studying the influence of low and high CF doses on sarcoma growth induced by methylholanthrene showed convincingly that low doses of the preparation produce a better therapeutical effect than high ones. The authors assume that low CF doses are capable of stimulating a specific immune answer of the master to the tumor antigene while high doses produce immunomodelling effect. This manifests itself on the first stage in immunodepression and later on—in stimulating effect on immunogenesis.

Thus, it may be assumed that the enhancement of tumor growth and metastasizing takes place not in the period of immunodepression caused by cytostatic high doses, but in the period of reabilitated or even strengthened immunogenesis as it is known that each cytostatic possesses an immunostimulating effect.

Thus, two variants of antitumor medicine effect on antitumor immunity are described: synergism and antagonism of their effect and their ability to take off and lower antitumor or transplantation immunity. These differences in experimental investigations are connected, probably, with the unequal cytostatics effect on immune answer phases. It is established that the inductive phase of immunogenesis is more sensitive than the productive one and the tumor-carrier organism is in the latter.

It is known that depending on the dose and rhythm of introduction cytostatics may considerably change the immunologic status. S. P. Gordienko, K. V. Botsmanov (1973) and S. P. Gordienko, V. M. Bergolts (1974) discovered that by changing the rhythm of CF introduction therapeutical effect might be considerably improved. It was established that realisation of the antitumor effect takes place at the expense of a loss by tumor-carrier serum of immunostimulating effect and acquisition of cytotoxic effect. These experiments convince that the positive antitumor effect may be received if the condition of a specific antitumor resistance is taken into consideration.

At the same time the expediency of using preoperational chemotherapy was established, as the lowering of antitumor resistance did not take place. This is likely to be connected with the fact that CF, being a cytostatic, promotes necrotization of a considerable mass of tumor tissue. Alteration and necrotization of neoplastic cells strengthen their antigene qualities activating thus immunologic reactions of organism against tumor.

One of the methods of oncological patients therapy is immunotherapy, the primary purpose of which is to restore and stimulate physiological immune mechanisms, which may be aimed at the elimination of malignant cells. Though one should note that its results are rather modest. This is connected with the absence

of a well-outlined characteristic of tumor antigenes, especially of a human being, their localization, immunogenity, antigenity, cross reactivity with normal tissue components and also interaction with organism's immunocompetent system. Besides, our knowledge of T- and B-lymphocytes effector mechanisms and their population, macrophages is not up to the mark. Nevertheless, numerous experimental and relatively rare clinical data testify that adjuvants have a multiside stimulating influence on organism's immunoreactivity. At the same time under certain conditions they may have a suppressive effect. This fact is extremely important because adjuvants, as a rule, are used in combination with chemotherapy and this may potentiate the immunodepressive effect of cytostatics.

At present there is no doubt that the immune mechanisms activated by immunotherapy can not only suppress tumor growth, but also enhance it, defending malignant cells from cytotoxic effect.

Tumor diseases clinical chemotherapy development is connected first of all with the creation of new, more active drugs. In the last years much attention in this connection is paid to searching new antitumor medicine from sea organisms. The analysis of the tendencies of sea pharmacology development gives grounds to hope that highly effective antitumor medicine will be created in the near future. The possibility of discovering new, in essence, ways of holding malignant growth is not excluded. And this, in its turn, will yield an opportunity to use the found principles of antitumor effect of hydrobionts for the purposeful creation of synthetic medical drugs.

СПИСОК ОСНОВНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Агеенко А. И. Вирусный канцерогенез.— М., Медицина, 1969.

Агеенко А. И. Молекулярная биология и иммунология вирусного канцерогенеза.— М., Медицина, 1974.

Агеенко А. И. Молекулярно-биологические и иммунологические механизмы вирусного канцерогенеза.—В кн.: Онкология, т. 8. М., 1975, с. 5—72.

Агеенко А. И. Механизмы вирусного онкогенеза.— М., Медицина, 1978.

Агеенко А. И., Ерхов В. С. — Вопр. вирусол., 1976, № 6, с. 734—737.

Агеенко А. И., Ерхов В. С. — Вопр. онкол., 1977, № 8, с. 57—60.

Агеенко А. И., Ерхов В. С. Аутоиммунитет и канцерогенез.— В кн.: Иммунология и вирусный канцерогенез. М., 1978, с. 16—30.

Агеенко А. И., Ерхов В. С. — Экспер. онкол., 1979, № 1, с. 35—37.

Агеенко А. И., Ерхов В. С., Башкаев И. С. Роль эмбриональных антигенов при вирусном канцерогенезе.— В кн.: Вопросы онкоиммунологии. М., 1977, с. 19—34.

Агеенко А. И., Ягубов А. С., Виторган Ю. Е.— Бюлл. экспер. биол. и мед., 1977, № 8, с. 205—208.

Агеенко А. И., Ерхов В. С., Свиридова И. К.— Бюлл. экспер. биол. и мед., 1978, № 9, с. 356—358.

Арипова Т. У. Анализ действия метилхолантрена и индуцированного им канцерогенеза на отдельные этапы иммуногенеза.—Автореф. канд. дис.—М., 1978.

Астрахан В. И.— Вопр. онкол., 1962, № 8, с. 14—22.

Астрахан В. И., Монул Ф. А.— Вопр. онкол., 1967, № 4, с. 87—90.

Бабаева А. Г. Иммунологические механизмы регуляции восстановительных процессов.—М., Медицина, 1972.

Башкаев И. С., Агеенко А. И. Иммунологический анализ аденовирусного канцерогенеза.— В кн.: Иммунология и вирусный канцерогенез. М., 1978, с. 31—45.

Башкаев И. С., Агеенко А. И., Коган И. Я. — Вопр. онкол., 1972, № 7, с. 73—77.

Бергольц В. М.— Вопр. онкол., 1970, № 12, с. 82—93.

Бергольц В. М., Кисляк Н. С., Еремеев В. С. Иммунология и иммунотерапия лейкозов.— М., Медицина, 1978.

Бергольц В. М., Сухин Г. М., Московкина О. Я., Гордиенко С. П. Некоторые иммунологические аспекты экспериментальной терапии злокачественных новообразований.—В кн.: Труды I съезда онкологов РСФСР. Уфа, 1973, с. 484—488.

Березкин Д. П. — Вопр. онкол., 1964, № 2, с. 67—73.

Билынский Б. Т., Шпарик Я. В. — Вопр. онкол., 1980, № 7, с. 95—104.

Блохин Н. Н. Химиотерапия злокачественных опухолей.— М., Медицина, 1977.

Блохин Н. Н., Переводчикова Н. И. — Вестн. АМН СССР, 1967, № 5, с. 30—41.

Брондз Б. Д. Взаимодействие клеточных и гуморальных изоантител с клетками нормальных и опухолевых тканей.— В кн.: Вирусы, рак, иммунитет. М., 1965, с. 352—378.
Брондз Б. Д. — Успехи совр. биол., 1966, № 2, с. 257—283.
Брондз Б. Д., Рохлин О. В. Молекулярные и клеточные основы иммунологического распознавания.— М., Наука, 1978.
Буркин А. А., Ковалев И. Е., Сергеев П. В. — Ж. микробиол., 1970, № 8, с. 20—24.
Волегов А. И., Гордиенко С. П. — Пат. физиол., 1970, № 6, с. 74—75.
Гамбаров С. С., Петров Р. В., Хаитов Р. М. — Докл. АН СССР, 1975, № 244, с. 1195.
Гарин А. М., Астрахан В. И., Бычков М. Б. — Вопр. онкол., 1965, № 11, с. 3—9.
Говалло В. И. Иммунитет к трансплантатам и опухолям. — Киев, Вища школа, 1977.
Головистиков И. Н., Петров Р. В., Хаитов Р. М.— Докл. АН СССР, 1970, с. 1208—1210.
Гордиенко С. П. Противоопухолевый эффект и иммунный ответ организма-опухленосителя в зависимости от ритма введения циклофосфамида.— В кн.: Труды I съезда онкологов РСФСР. Уфа, 1973, с. 557—559.
Гордиенко С. П. Влияние некоторых методов экспериментальной терапии опухолей на иммунный ответ организма.— В кн.: Опухоль и организм. Киев, 1973, с. 91—94.
Гордиенко С. П., Агеенко А. И. — Бюлл. экспер. биол. и мед., 1971, № 10, с. 22—25.
Гордиенко С. П., Боцманов К. В. — Ж. экспер. хирургии и анестезиол., 1971, № 3, с. 50—52.
Гордиенко С. П., Бергольц В. М. — Вопр. онкол., 1973, № 11, с. 35—42.
Гордиенко С. П., Бергольц В. М. Влияние пред- и послеоперационной химиотерапии циклофосфамидом на иммунный ответ мышей-опухленосителей.— В кн.: Вопросы онкоиммунологии. М., 1977, с. 78—83.
Гордиенко С. П., Боцманов К. В., Бергольц В. М. — Бюлл. экспер. биол. и мед., 1974, № 7, с. 28—32.
Гордиенко С. П., Сухин Г. М., Бергольц В. М. Дифференцированный подход к анализу иммунного ответа и эффективности проводимого лечения у мышей СВА с вирусной саркомой SA7 (С8).—В кн.: Материалы Советско-Болгарского симпозиума по иммунологии опухолей, 1973, с. 28—30.
Городилова В. В. Иммунологический контроль в онкологической клинике. — В кн.: Теоретические и клинические аспекты иммунологии опухолей. Кемерово, 1975.
Городилова В. В. Изучение иммунологической компетентности у больных злокачественными новообразованиями.— В кн.: Иммунологический контроль у онкологических больных. Томск, 1978, с. 8—28.
Городилова В. В., Сергеева З. М., Слесарева Р. И. — Вопр. онкол., 1969, № 2, с. 3—6.
Грех И. Ф., Шац В. Я. — Общая онкология, 1969, с. 42—119.
Грунтенко Е. В. Иммунитет и возникновение злокачественных опухолей. — Новосибирск, Наука, 1977.
Дымарский Л. Ю. Рак молочной железы.— М., Медицина, 1980.
Зильбер Л. А. Вирусогенетическая теория возникновения опухолей.— М., Наука, 1968.
Зильбер Л. А., Ирлин И. С., Киселев Ф. Л. Эволюция вирусогенетической теории возникновения опухолей.—М., Наука, 1975.
Кавецкий Р. Е. Взаимодействие организма и опухоли.—Киев, Наукова думка, 1977.
Кипиани Р. Е., Махарадзе Д. А., Саканделидзе О. Г. БАВ морских организмов с цитостатической активностью. — В кн.: Биологически активные вещества гидробионтов — новый источник лекарств. Кишинев, 1979, с. 81—91.
Клименков А. А. Отдаленные результаты лечения злокачественных опухолей мягких тканей.— В кн.: Опухоли опорно-двигательного аппарата, вып. 3. М., 1971, с. 43—51.

Ковалев И. Е., Григорьян-Ковалева В. Л., Рубцова Е. Д. — Вопр. онкол., 1971, № 4, с. 55—58.
Кривошеин Ю. С. — Бюлл. экспер. биол., 1966, № 2, с. 79—82.
Лазарев Н. В. Казан. мед. ж., 1962, № 2, с. 6—11.
Лесков В. П., Халатян Н. А., Гущин И. С. — Иммунология, 1981, № 1, с. 17—26.
Майский И. Н., Суворова Г. В. — Бюлл. экспер. биол., 1957, № 9, с. 94—96.
Медуницын Н. В. — Успехи совр. биол., 1963, № 1, с. 77—79.
Михайлова А. А. — Мед. реф. ж., 1977, № 4, с. 19—24.
Нестеренко В. Г. — Успехи совр. биол., 1980, № 2, с. 211—220.
Переводчикова Н. И. Клиническая химиотерапия опухолевых заболеваний. — М., Медицина, 1976, с. 200.
Петров Р. В. Иммунология и иммуногенетика. — М., Медицина, 1976.
Петров Р. В., Хаитов Р. М. — Вестн. АМН СССР, 1977, № 10, с. 64—69.
Петров Р. В., Хаитов Р. М. — Успехи совр. биол., 1981, № 1, с. 8—28.
Петров Р. В., Хаитов Р. М., Пчелинцев С. Ю. — Иммунология, 1978, № 1, с. 68—70.
Петров Р. В., Хаитов Р. М., Манько В. М. Контроль и регуляция иммунного ответа. — Л., Медицина, 1981.
Петров Р. В., Халатян Н. А., Лесков В. П. — Успехи совр. биол., 1980, № 2, с. 193—210.
Пригожина Е. П., Ставровская А. А. — Вопр. онкол., 1964, № 10, с. 66—71.
Попов В. И., Нездатный М. М. — Пат. физиол., 1964, № 1, с. 37—39.
Пчелинцев С. Ю. Костномозговые супрессоры при аутоиммунной патологии и опухолевом росте. — Автореф. канд. дис.—М., 1980.
Радзиховская Р. М. — Бюлл. экспер. биол. и мед., 1958, № 5, с. 89—92.
Радзиховская Р. М. Некоторые закономерности противоопухолевого иммунитета.— М., Медицина, 1971.
Рогальский В. Я. Иммунологическое изучение опухолей толстого кишечника человека. — Автореф. канд. дис. — М., 1965.
Свет-Молдавский Г. Я. Спорные вопросы иммунологии опухолей. — В кн.: Иммунология опухолей. Киев, 1975, с. 222—224.
Сергеев П. В., Ковалев И. Е., Буркин А. А. — Вопр. онкол., 1970, № 10, с. 54—58.
Соловьев А. А. — Арх. биол. наук, 1938, № 3, с. 174—179.
Сыркин А. Б., Соленов В. Н. — Фармакол. и токсикол., 1969, № 6, с. 723—726.
Сыркин А. Б., Соленов В. Н., Бодягин Д. А. — Вестн. АМН СССР, 1971, № 3, с. 55—59.
Татаринов Ю. С. — Вопр. мед. химии, 1964, № 1, с. 90.
Тер-Григоров В. С., Шевелев Б. И., Московкина О. Я., Бергольц В. М.— Бюлл. экспер. биол. и мед., 1971, № 1, с. 61—64.
Трапезников Н. Н., Яворский В. В., Кадагидзе З. Г. — Вопр. онкол., 1977, № 18, с. 27—29.
Туманян М. М., Кишани Р. Е., Сакандемидзе О. Г. БАВ цитостатического действия кишечнополостных и иглокожих. — В кн.: Биологически активные вещества гидробионтов — новый источник лекарств. Кишинев, 1979, с. 180—193.
Уманский Ю. А. Иммунологическая реактивность при раке. — Киев, Здоров'я, 1974.
Фель В. Я. Нарушение цитодифференцировки при малигнизации и проблема иммунного надзора. — Л., Наука, 1977.
Фонталин Л. Н., Певницкий Л. А. Иммунологическая толерантность. — М., Медицина, 1978.
Фриденштейн А. Я., Гельфанд И. М. — Успехи совр. биол., 1963, № 3, с. 428—439.
Фролова Е. И., Залманзон Е. С., Георгиев Г. П. — Докл. АН СССР, 1977, № 5, с. 1226—1229.
Хаитов Р. М., Петров Р. В., Гамбаров С. С. — Вестн. АМН СССР, 1976, № 2, с. 8—14.
Холдин С. А. — Клин. мед., 1962, № 6, с. 16—20.

Хомченовский Е. И. Экспериментальная химиотерапия лейкозов. — М., Медицина, 1980, с. 239.
Шапот В. С. Биохимические аспекты опухолевого роста.— М., Медицина, 1975.
Шапот В. С., Шлянкевич М. А., Дризе О. Б. Изучение биохимической активности и биологической функции «ранних» белков онкогенных ДНК-содержащих вирусов. — В кн.: Вирусы рака и лейкоза. М., 1980, с. 38—40.
Шлянкевич М. А., Цукерман А. М., Дризе О. Б. — В кн.: Структура и функции клеточного ядра. Тезисы VI Всесоюзного симпозиума. Алма-Ата, 1977, с. 48.
Ягубов А. С., Агеенко А. И. — Вопр. онкол., 1975, № 7, с. 62—66.
Aisenberg A. C. — J. clin. Invest., 1962, v. 41, p. 1964—1970.
Aisenberg A. C. — Medicine, 1964, v. 43, p. 189—193.
Aisenberg A. C. — Cancer, 1966, v. 19, p. 385—394.
Aisenberg A. C., Davies C. — J. Exp. Med., 1968, v. 128, p. 35—46.
Aisenberg A. C., Bloch K. J., Long J. C. — Blood, 1973, v. 43, p. 417—421.
Akusjärvi G., Philipson L., Pettersson U. — Virology, 1978, v. 87, p. 276—286.
Alexander P. — Nature, 1972, v. 235, p. 137—140, p. 181.
Alexander P., Delorme E. J., Hamilton L. D. — Nature, 1967, v. 213, p. 569—572.
Ali I. U., Maunter V., Lanza R. — Cell, 1977, v. 11, p. 115—126.
Allisoh A. C. Macrophage activation and nonspecific immunity. — In: Int. Rev. Exp. Pathol. New York, 1978, v. 18, p. 303—346.
Almine J. C., Khoury G. — J. Virol., 1980, v. 33, p. 920—925.
Al-Saffar M., Wong P., Sardesai S. — Cancer, 1972, v. 26, p. 262—267.
Altman A., Rapp H. J. — J. Immunol., 1978, v. 121, p. 2244—2248.
Ambrose K. K., Anderson N. G., Goggin J. H. — Nature, 1971, v. 233, p. 194—195.
Amos D. B. — Progress in allergy, 1962, v. 6, p. 468—475.
Anderson J. L., Martin R. G. — J. Cell Physiol., 1976, v. 88, p. 65—76.
Anderson J. L., Martin R. G., Chang C. — Virology, 1977, v. 76, p. 420—424.
Anderson S. J., Naso R. B., Bowen J. M. — J. Virol.,1979, v. 32, p. 507—516.
Ankerst J. — Cancer Res., 1971, v. 31, p. 997—1002.
Ankerst J., Steele G., Sjögren H. O. — Cancer Res., 1974, v. 34, p. 1794—1800.
Aoki T., Boyse E. A., Old L. I. — Cancer Res., 1966, v. 26, p. 1415—1419.
Aoki T., Sibal L. R. — Cancer Res., 1976, v. 36, p. 591—597.
Aptekman P., Levis M., King H. A. — J. Immunol., 1946, v. 52, p. 77—83.
Arcement L. J., Karshin W. L., Naso R. B.— Virology, 1976, v. 69, p. 763—774.
Arcement L. J., Karshin W. L., Naso R. B. — Virology, 1977, v. 81, p. 284—297.
Asselbergs F. A., Salden M. H. L., Bloemendal H. — Eur. J. Biochem., 1980, v. 109, p. 395—403.
Axelrod N. — Virology, 1978, v. 87, p. 366—383.
Baird S., Raschke W., Weissman I. L. — Int. J. Cancer, 1977, v. 19, p. 403—413.
Baldwin R. W. — Adv. Cancer Res., 1973, v. 18, p. 1—120.
Baldwin R. W. — Neoantigens on carcinogen induced tumors. — In: Proceedings, 11th Int. cancer congress, v. I. Florence, 1974, p. 222—227.
Baldwin R. W., Pimm M. V. — Int. J. Cancer, 1973, v. 12, p. 420—426.
Baldwin R. W., Price M. R. — Ric. clin. lab., 1977, v. 7, p. 102—111.
Baldwin R. W., Robins R. A. Induction of tumor-immune response and their interaction with the developing tumor. — In: Contemp. Topics Mol. Immunol. New York—London, 1977, v. 6, p. 177—207.
Baldwin R. W., Price M. R., Robins R. A. — Nature, New Biol., 1972, v. 238, p. 185—190.
Baldwin R. W., Bowen M. I. G., Price M. R. — Brit. J. Cancer, 1973, v. 28, p. 16—21.
Bansal S. C., Sjögren H. O. — Nature, 1971, v. 233, p. 76—78.
Bansal S. C., Hargreaves R., Sjögren H. O. — Int. J. Cancer, 1972, v. 9, p. 97—102.
Bansal S. C., Hargreaves R., Sjögren H. O. — Nature, 1972, v. 238, p. 185—187.
Barada F. A., Kay H. D., Emmons R.— J. Immunol., 1980, v. 125, p. 865—870.
Barbacid M., Stephenson J. R., Aaronson S. A.—Nature, 1976, v. 262, p. 554—549.
Bartlett G. L., Zbar B. — J. Nat. Cancer Inst., 1973, v. 50, p. 1385—1390.
Baserga R., Soprano K., Rossini M. — IARC Sci. Publ., 1980, v. 27, p. 133—141.

Basten A., Craft S., Kenny D. F. — Vox sanguinis, 1975, v. 28, p. 257—261.
Batchelor K. I. — Cancer Res., 1968, v. 28, p. 1410—1414.
Bauer H., Kurth R., Rohrischneider L. — Cancer Res., 1976, v. 36, p. 598—602.
Beemon K., Hunter T. — J. Virol., 1978, v. 28, p. 551—566.
Beemon K., Hunter T., Sefton B. M.— J. Virol., 1979, v. 30, p. 190—200.
Beffs A., Sewall E. L., Tanguagy R. — J. biol., 1966, v. 26, p. 898—902.
Benjamin D. C.— J. Exp. Med.,1975, v. 141, p. 635—639.
Bennet B.— J. Immunol., 1965, v. 95, p. 656—662.
Bennett J. A., Mitchell M. S. — Biochem. Pharmacol., 1979, v. 28, p. 1947—1952.
Berczi I., Froese G. —Tissue Antigens, 1980, v. 16, p. 260—264.
Berenbaum M. C., Brown J. N. — Nature,1963, v. 200, p. 84—86.
Bergman W., Feeney R. J. — J. Am. Chem. Soc., 1950, v. 72, p.2809—2812.
Berman L. D. — Int. J. Cancer, 1972, v. 10, p. 326—330.
Berns A., Jaenusch R. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, p. 2448—2452.
Beth E., Cikes M., Schloen L. — Int. J. Cancer, 1977, v. 20, p. 551—559.
Bill G., Littlejohn K., Kelly G. — J. Surg. Oncol., 1971, v. 3, p. 569—579.
Billeter M. A., Coffin J. M., Joho R.— Ann. microbiol., 1976, v. 27, p. 5—6.
Birkenmeier E. H., Chin N., Radinowich M. F. — J. Virol., 1979, v. 29, p. 983—989.
Blinkoff R. S.— J. Immunol., 1966, v. 97, p. 736—739.
Bloom E. T.— J. Nat. Cancer Inst., 1970, v. 45, p. 443—453.
Боева М. Н., Городилова В. В. Иммунология на рака.— София, Медицина и физкултура, 1974.
Боева М. Н., Городилова В. В. Иммунология на туморния растеж.— София, Медицина и физкултура, 1979.
Bollag W.— Experimentia, 1955, v. 11, p. 227—232.
Bolognesi D. P., Frank H., Schafer W.— Science, 1978, v. 199, p. 183—186.
Bookout J. B., Levy C. C. — Virology, 1980, v. 101, p. 198—216.
Bosslet K., Schirrmacher V.— Immunobiology, 1980, v. 157, p. 205.
Brier A. M., Ghess L., Schlossman S. F. — Clin. Invest., 1975, v. 56, p. 1580—1584.
Brown I. N., Berenbaum M. C.— Nature, 1964, v. 201, p. 1340—1342.
Brugge J., Collett M., Erikson R. L. — J. Virol., 1979, v. 29, p. 1196—1203.
Bubenic J., Koldovsky P.— Folia Biol., 1965, v. 11, p. 181—196.
Bubenic J., Perlman P., Helmstein K. — Int. J. Cancer, 1970, v. 5, p. 310—319.
Buetti E., Diggelmann H.— Virology, 1980, v. 102, p. 251—261.
Bullough W. S., Laurence E. B. — Nature, 1968, v. 220, p. 134—138.
Bullough W. S., Laurence E. B., Inversen O. H. — Nature, 1967, v. 214, p. 578—580.
Burchenal I. H. — Postgrad, 1970, v. 48, p. 164—168.
Burge P. S., Prankerd T. A. I., Rihards I. D. M. — Lancet, 1975, v. 2, p. 621—624.
Burnet F. M. Immunological surveillance. — Oxford, Pergamon Press, 1970.
Burnette W. M., Holladay L. A., Mitchell W. M. — J. molec. Biol., 1976, v. 107, p. 131—143.
Burtin P. — Cancer, 1974, v. 34, p. 829—834.
Burtin P. — Bull. Cancer, 1975, v. 62, p. 431—435.
Burtin P. — Pathol. Biol., 1980, v. 28, p. 489—492.
Byrne M., Heppner G., Stolbach L. — J. Nat. Cancer Inst., 1973, v. 37, p. 3—12.
Cajean-Feroldi C., Chardonnet Y., Chantepie-Auray J.— Eur. J. Biochem., 1977. v. 74, p. 457—462.
Calder E. A., Urbaniak S. J., Irvine W. J. — Clin. Exp. Immunol., 1974, v. 18, p. 579—581.
Campbell A. C., McLennan J. C. M. — Lancet, 1976, v. 1, p. 856—857.
Campbell A. C., Hersey P., McLennan J. C. M.— Brit. Med. J., 1973, v. 2, p. 385—389.
Canaani E., Robbins K. C., Aaronson S. A. — Nature, 1979, v. 282, p. 378—383.
Cannon B., Bonnard P., Djen J. — Int. J. Cancer, 1977, v. 19, p. 487—497.
Cantor H. — Eur. J. Immunol., 1971, v. 1, p. 462—465.
Cantor H., Shen F. W., Boyse E. A. — J. Exp. Med., 1976, v. 143, p. 1391—1401.

Cantor H., Hugenberger J., Gershon R. K. — J. Exp. Med., 1978, v. 148, p. 871—874.
Caraux J., Thierry C., Serrou B.— Eur. J. Immunol., 1978, v. 8, p. 806—809.
Carbone G., Invernizzi G., Parmiani G.— Int. J. Cancer, 1978, v. 21, p. 85—93.
Carter P. W., Heibron J. M.— Proc. Roy. Soc., 1939, v. 128, p. 82—109.
Chang C., Luborsky S. W., Mora R. T. — Nature, 1977, v. 269, p. 438—440.
Chanley I. D., Ledden R.— J. Am. Chem. Sci., 1959, v. 81, p. 5180—5183.
Chard T.— Immunology, 1968, v. 14, p. 583—589.
Chepelinsky A. B., Seif R., Martin R. G. — J. Virol., 1980, v. 35, p. 184—193.
Chess L., Ewans R., Schlossman S. F. — J. Exp. Med., 1976, v. 144, p. 113—117.
Chiao J. W., Dowling M., Good R. A. — Clin. Exp. Immunol., 1978, v. 32. p. 498—501.
Chow L. T., Bayer H. W., Goodman H. M. Electron microscopic mapping of the attachment sites on SV 40 DNA during lytic infection.—In: Cold Spring Harbor symposium quantitative biology, v 39. New York, 1975, p. 109—117.
Cierreszko L. S., Sifford D. H. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1960, v. 90, p. 917—919.
Cline M. J.— J. Clin. Invest., 1973, v. 52, p. 2185—2192.
Clouyd M. V., Bolognesi D. P., Bigner D. D. — Cancer Res., 1977, v. 37, p. 922—938.
Cochen S. S. — Perspect. Biol. Med., 1963, v. 6, p. 215—227.
Cogen B. — Virology, 1978, v. 85, p. 222—230.
Coggin J. H., Adkinson L., Anderson N. G. — Cancer Res., 1980, v. 40. p. 1568—1573.
Cohen J. C., Varmus H. E. — J. Virol., 1980, v. 35, p. 298—305.
Cohen M. H., Chretien P. B., Ihde D.— J. A. M. A., 1979, v. 241, p. 1813—1815.
Collavo D., Parenti A., Bcasi G. — J. Nat. Cancer Inst., 1978, v. 61, p. 885—890.
Collins C. J., Bolio L. D., Denny T. P.— J. Virol., 1977, v. 21. p. 113—118.
Collins C. J., Green T. L., Parsons T.— J. Virol., 1980, v. 33, p. 760—768.
Cooper B. G.— Proc. Am. Ass. Cancer Res., 1969, v. 10, p. 15—21.
Cooper S. M., Hirsen D. J., Frion G. J. — Cell Immunol., 1977, v. 32, p. 135—137.
Costachel D., Saurdi G. — Oncol. radiol., 1971, v. 10, p. 221—232.
Crile G. C.— Brit. Med. J., 1970, v. 5733, p. 489—490.
Croce C. M. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, p. 315—318.
Cudmore J. T. P., Groesbeck H. P. — Cancer, 1964, v. 17, p. 230—232.
Culo F., Marusic M., Andreis I. — Period. biologorum., 1980, v. 82, p. 131—135.
Currie G. A., Bagshawa K. D. — Brit. Med. J., 1970, v. 1, 5695, p. 541—544.
Currie G. A., Basham C.— Brit. J. Cancer, 1972, v. 26, p. 427—431.
Curtis J. E., Hersh E. M., Freireich E. J. — Cancer Res., 1970, v. 30, p. 2921—2929.
D'Alisa R. M., Gershey E. L. — Nature, 1978, v. 274, p. 164—166.
Defendi V. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1963, v. 113, p. 12—21.
Deppert W. — J. Virol., 1979. v. 29, p. 576—586.
Deppert W. — Virology, 1980, v. 10, p. 497—501.
Deppert W., Hanke K., Heming R. — J. Virol., 1980, v. 35, p. 505—518.
De Vita V. T. — Cancer Chemother. Rep., 1971, v. 2, p. 23—27.
De Vita V. T., Young R. S.,Canelos G. P.— Cancer, 1975, v. 35, p. 98—110.
Dhar R., Reddy V. B., Weissman S. M.— J. Biol. Chem., 1978, v. 253, p. 612—620.
Dickson C., Atterwill M. — J. Virol., 1980, v. 35. p. 349—361.
Dijk H. Van, Volrmans G. A. G. M.— Immunostimulating properties of the cytostatic drug 6-thioguanine.— In: The Farmacology of immunoregulation, 1978, p. 301—304.
Di Lorenco J. A., Griswold D. E., Bareham C. R.—Cancer Res., 1974, v. 34, p. 124—129.
Dion A. S., Heine U. I., Korb J. — J. Virol., 1977, v. 22, p. 822—825.
Doherty P. C., Zinkernagel R. M. Modulation of viral infection by cell-mediated immunity.—In: Microbyology — 1977. Washington, 1977, p. 484—487.
Donner L., Turek L., Sherr C. J. — J. Virol., 1980, v. 35, p. 129—140.

Dostalova O., Schön E., Kubelka V. — Neoplasma, 1970, v. 17, p. 231—240.
Doubrow S., Roux M., Chatelin C. — Rev. Immunol., 1960, v. 24, p. 424—429.
Dougherty R. M.— J. Gen. Virol., 1976, v. 33, p. 61—70.
Driessens J., Vanlerenberghe J., Clay A. — J. biol., 1965, v. 159, p. 1676—1677.
Druckrey H., Hamperl H., Herken H. — Z. Kreisl.-Forsch., 1939, Bd. 48, S. 451—467.
Druckrey H., Stenhaff D., Nacayma M. — Dtsch. Med. Wschr., 1963, Bd. 14, S. 715—721.
Dulbecco R. — Science, 1976, v. 192, p. 437—440.
Dunphy J. E.— New Engl. J. Med., 1953, v. 249, p. 17—25.
Dutton R. W., Mischell R. J.— Fed. Proc., 1967, v. 25, p. 1723—1726.
Dijkema R., Dekker B. M. M., Feltz M. J. M. — J. Virol., 1979, v. 32, p. 943—950.
Eccels S., Alexander P.— Nature, 1975, v. 257, p. 52—56.
Eckhart W. — Virology, 1969, v. 38, p. 120—125.
Eckhart W.— Virology, 1977, v. 77, p. 589—594.
Edwards S. A., Fan Hung.— J. Virol., 1980, v. 35, p. 41—51.
Elder J. H., Lerner R. A., Rowe W. P.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, p. 4676—4680.
Ellis J., Kidd I. — Cancer Res., 1952, v. 12, p. 259—268.
Eremin O., Coombs R. R., Ashby J.— Immunology, 1980, v. 41, p. 367—378.
Ernberg I., Klein G., Lundin L. — Nature, 1977, v. 266, p. 269—271.
Escudero N. J. M., Rodrigo S. L., Saavedra L. — Rev. Esp. enfer. apar. digest., 1980, v. 58, p. 267—274.
Evans R., Alexander P. — Nature, 1972, v. 236, p. 168—170.
Everson T. C. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, v. 114, p. 721—736.
Famulari N. G., Buchhagen D. L., Fleissner E.— J. Virol., 1976, v. 20, p. 501—508.
Fass L., Herberman R. B., Lieger I. L.— New Engl. J. Med., 1970, v. 282, p. 776—781.
Fauve R. M., Hevin B., Jacob H.— Proc. Nat. Acad. Sci., 1974, v. 71, p. 4052—4057.
Ferdinand F., Brown M., Khoury G.— Virology, 1977, v. 78, p. 150—161.
Fernandez-Cruz E., Woda B. A., Feldman J. D. — J. Exp. Med., 1980, v. 152, p. 823—841.
Fisher B., Fisher E. — Science, 1966, v. 152, p. 1397—1398.
Flint S. J., Sharp P. A. — J. molec. Biol., 1976, v. 23, p. 44—52.
Fluck M. M., Benjamin T. L. — Virology, 1979, v. 96, p. 205—228.
Foley E. — Cancer Res., 1953, v. 13, p. 835—848.
Foulds L. — J. Nat. Cancer Inst., 1956, v. 17, p. 701—802.
Frankel A. E., Fischinger P. J. — J. Virol., 1977, v. 21, p. 153—160.
Frankel A. E., Neubauer R. L., Fischinger P. J. — J. Virol., 1976, v. 18, p. 481—490.
Freedman L. R., Cerrottini J. C., Brunner K. T. — J. Immunol., 1972, v. 109, p. 1371—1378.
Frei E. — Cancer, 1965, v. 18, p. 1580—1584.
Freves A. J., Carnaul K., Trainin M. — Eur. J. Immunol., 1977, v. 4, p. 722—727.
Friedman R. M., Buckler C., Baron C. — Fed. Proc., 1961, v. 20, p. 258—262.
Friess S. L., Standaert F. J. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1980, v. 90, p. 893—901.
Frinchieri G., Santoli D., Koprowski H. — Transplant. Proc., 1977, v. 9, p. 881—884.
Fritz D., Kern D. H., Humme J. A. — Int. J. Cancer, 1976, v. 17, p. 138—146.
Frölund S. S., Natuig J. B. — Transplant. Rev., 1973, v. 16, p. 114—117.
Fujimato S., Green M. I., Sehon A. H. — J. Immunol., 1976, v. 116, p. 800—806.
Fujinaga K., Sekikawa M., Green M. Analysis of multiple viral genome fragments in adenovirus Y-transformed hamster cells. — In: Cold Spring Harbor symposium quantitative biology, v. 39, New York, 1975, p. 633—636.
Fujinaga K., Ojima S., Vano S. — Proc. Jap. Acad., 1977, v. 53, p. 152—155.
Gabizon A., Trainin N. — Brit. J. Cancer, 1980, v. 42, p. 551—558.
Gabizon A., Lelbovich S. J., Goldman R. — J. Nat. Cancer Inst., 1980, v. 65, p. 913—920.

Gakoubkowa J., Schluper A., Kolar M.— Neoplasma, 1967, v. 14, p. 305—312.
Galehouse D. M., Duesberg P. H. — Virology, 1976, v. 70, p. 97—104.
Gallis B. M., Eisenman R. N., Diggelmann H. — Virology, 1976, v. 74, p. 302—313.
Gately M. K., Wechter W. J., Martz E. — J. Immunol., 1980,v. 125, p. 783—792.
Gatti R. A., Good R. A.— Cancer, 1971, v. 28, p. 89—93.
Gaudray P., Clertant P., Cuzin F. — Eur. J. Biochem., 1980, v. 109, p. 553—560.
Geder L., Kreider J., Rapp F. — J. Nat. Cancer Inst., 1977, v. 58, p. 1003—1009.
Gelfand E. W., Morris S. A., Resch K. — J. Immunol., 1975, v. 114, p. 919—921.
German A. — Microbia, 1978, v. 4, p. 3—23.
Gershon R. K., Metzler C. M. — In: The immunopathology of lymphoreticular neoplasms. New York, 1978, v. 4, p. 3—23.
Gershon R. K., Carter R. L., Kondo K. — Nature, 1967, v. 213, p. 674—677.
Gerschwin M. E. — Cancer Immunol. Immunother., 1980, v. 8. p. 1—2.
Gerson J. M., Holden H. T., Herberman R. B. — J. Nat. Cancer Inst., 1978, v. 65, p. 905—907.
Giovarelli M., Comoglio P. M., Forni G. — Brit. J. Cancer, 1976, v. 34, p. 233—238.
Girardi A. J., Reppucci P., Dierlam P. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, v. 68, p. 1748—1752; 1973, v. 70, p. 183—186.
Glaureat A. M., Dinoli J. T. — Nature, 1962, v. 196, p. 952—955.
Glimcher L., Shen F. W., Cantor H. — J. Exp. Med., 1977, v. 145, p. 1—3.
Gluzman Y., Oren M., Winocour E. — J. Virol., 1977, v. 22, p. 256—261.
Glyn G. P., Bianko A. R., Goldin A. — Nature, 1963, v. 198, p. 1003—1004.
Gohnson R. K., Goldin A. — Cancer Treat. Rep., 1975, v. 2, p. 1—31.
Göing H., Gunter G. — Int. Arch. Allergy, 1970, v. 38, p. 420—426.
Gold P., Shuster J. — Cancer Res., 1980, v. 40, p. 2973—2976.
Gold P., Krupey J., Ansari H. — J. Nat. Cancer Inst., 1970, v. 45, p. 219—226.
Goldfeder A.— Proc. Soc. exp. Biol., 1945, v. 59, p. 104—115.
Goldin A. — Oncology, 1980, v. 37, p. 3—8.
Gorer P. — Adv. Immunol., 1961, v. 1, p. 345—349.
Goroczynski R. — J. Immunol., 1974, v. 112, p. 1826—1829.
Gottlieb J. A. — Cancer Chemother. Rep., 1974, v. 58, p. 265—270.
Grace J. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, v. 114, p. 736—741.
Gradjenett D. P. — J. Virol., 1976, v. 17, p. 950—961; v. 20, p. 348—350.
Graessmann A., Graessmann M. — FEBS Letters, 1976, v. 61, p. 81—84.
Graessmann A., Graessmann M., Tjian R. — J. Virol., 1980, v. 33, p. 1182—1191.
Graf R., Marzoli G. P. — Bruns, 1961, v. 202, p. 242—252.
Graham F. L., Abrahams P. J., Mulder C. Studies on in vitro transformation by DNA fragments of human adenoviruses and simian virus 40.— In: Cold Spring Harbor simposium quantitative biology, v. 39. New York, 1975, p. 637—650.
Green M., Wold W. S. M., Cartas M. A. — Virology, 1979, v. 97, p. 275—286.
Green D. M. — Brit. J. Exp. Path., 1958, v. 39, p. 192—198.
Greenfield R. S., Flyer D. C., Tevethia S. S.— Virology, 1980, v. 104, p. 312—322.
Greenspan E. M. — J. Mt. Sinai hosp., 1968, v. 35, p. 52—57.
Griffin J. D., Spangler G., Livingston D. M. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 2610—2614.
Griscelli C., Revillard J. P., Beteul H. — Biomedicine, 1973, v. 18, p. 220—227.
Grohman P., Holmes F., Filips R. — Int. J. Cancer, 1978, v. 22, p. 528—534.
Gross L.— Cancer Res., 1943, v. 3, p. 326—331.
Gupta P., Johnson J. C., August J. T. — Arch. Biochem. Biophys., 1975, v. 168, p. 652—656.
Gurascova V., Tkadiecek L., Drasie V. — J. biol., 1964, v. 11, p. 591—598.
Gurney E., Harrison R. O., Fenno J. — J. Virol., 1980, v. 34, p. 752—763.
Gutierrez G. F.,— Laboratorio, 1978, v. 66, p. 401—404.

Gutterman I. U., Hersh E. M., Freireich E. J. — J. Nat. Cancer Inst., 1973, v. 37, p. 153—160.
Habel K. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1961, v. 106, p. 722—231.
Habel K., Eddy B. E. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1963, v. 113, p. 1—12.
Haeqert D. G. — J. Immunol. Meth., 1978, v. 22, p. 73—75.
Hall J. G. Lymphocyte transfusions and the adoptive immunotherapy of Cancer. — In: Collog. int. centre nat. rech. sci. Paris, 1970, v. 185, p. 139—144.
Haller O. A., Gidlund M., Kurnick J. T. — J. Immunol., 1978, v. 8, p. 207—210.
Hand R., Tamm I. — J. Mol. Biol., 1974, v. 82, p. 175—178.
Harewood K., Ahmed M. — J. Gen. Virol., 1977, v. 36, p. 227—235.
Haseltine W. A., Maxam A. M., Gilbert W. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, p. 989—993.
Hauptman S. P., Kansu E., Serno M. — J. Exp. Med., 1979, v. 149, p. 158—161.
Hayami M., Ignjativic J., Bauer H.— Int. J. Cancer, 1977, v. 20, p. 729—737.
Hayman M. J., Vogt P. K. — Virology, 1976, v. 73, p. 372—380.
Hellström I., Hellström K. E., Bill A. H.— Int. J. Cancer, 1968, v. 6, p. 172—188.
Hellström I., Hellström K. E. — Adv. Cancer Res., 1969, v. 12, p. 167—178.
Hellström I., Hellström K. E. — Int. J. Cancer, 1970, v. 5, p. 195—201.
Hellström I., Hellström K. E., Sjögren H. O. — Int. J. Cancer, 1971, v. 8, p. 185—190.
Hellström I., Warner G. A., Hellström K. E. — Int. J. Cancer, 1973, v. 11, p. 280—286.
Hellström J., Hellström K. E., Warner G. A. — Int. J. Cancer, 1973, v. 12, p. 348—361.
Hellström K., Hellström G. — Adv. Immunol., 1974, v. 18, p. 209—220.
Hellström I., Hellström K. E. — Int. J. Cancer, 1975, v. 15, p. 1—16, p. 30—38.
Hengst J. D., Moeur M. B., Drays O. — Cancer Res., 1980, v. 40, p. 2135—2141.
Heppner G. H. — Int. J. Cancer, 1969, v. 4, p. 608—612.
Heppner G. H., Kopp I. S. — Int. J. Cancer, 1971, v. 7, p. 26—32.
Herch E. M., Oppenheim J. J. — New Engl. J. Med., 1965, v. 273, p. 1006—1012.
Herch E. M., Carbone P. P., Wong V. G. — Cancer Res., 1965, v. 25, p. 997—1001.
Hershey P. — Austral. a. New Zel. J. Med., 1979, v. 9, p. 464—472.
Hibbs J. B., Lambert L. H., Renington J. S. — Science, 1972, v. 177, p. 998—1000.
Hieschberg H., Thorsby E., Rolstad B. — Nature, 1975, v. 255, p. 62—63.
Hill M., Hillova J., Goubin G. — Bull. Cancer, 1975, v. 62, p. 183—194.
Hirai H., Alpert E. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1975, v. 259, p. 1—412.
Hirai T., Yamamoto H., Hamaoka T. — J. Immunol., 1980, v. 124, p. 2765—2771.
Hirch I., Roubal J., Vonka V. — Intervirology, 1976, v. 7, p. 155—175.
Hirsch H., Bittner J., Cole H.—Cancer Res., 1958, v. 18, p. 344—351.
Hirszfeld L., Halber W. — Z. Immunitats, 1932, Bd. 75, S. 193.
Hiscott J. B., Defendi V. — J. Virol., 1979, v. 30, p. 590—599.
Hizi A., Leis J. P., Joklik W. K. — J. Biol. Chem., 1977, v. 252, p. 2281—2295.
Hokland P., Hokland M., Heron I. — Int. Arch. Allergy, 1978, v. 57, p. 514—517.
Holder W. D., Peer G. W., Bolognesi D. P. — Cancer Res., 1976, v. 36, p. 3217—3224.
Hopkins N., Schindler J., Hynes R. — J. Virol., 1977, v. 21, p. 309—318.
Hormitz D. A., Lobo P. I.— J. Clin. Invest., 1975, v. 56, p. 1464—1467.
Hormitz D. A., Greaves M. F., Deteiz P. — J. Immunol., 1978, v. 121, p. 678—701.
Houyr L. W., Condie R. M., Good R. A. — Blood, 1962, v. 20, p. 114—117.
Huber S. A., Bigi G., Lucas Z. J. — Cancer Res., 1980, v. 40, p. 3477—3483.
Hugnes L. E., Mackay W. O. — Brit. Med. J., 1965, v. 5474, p. 1346—1348.
Humphreys S. R., Karrer K. — Cancer Chemother. Rep., 1970, v. 54, p. 379—392.
Hunter E., Hayman M. J., Vogt P. K. — Virology, 1976, v. 69, p. 35—49.
Hwang S., Kucherlapati R. — Virology, 1980, v. 105, p. 196—204.
Hyman R. W. — Virology, 1980, v. 105, p. 254—255.
Hynes R. O. — Biochem. Biophys. Acta, 1976, v. 458, p. 73—107.
Israel M. A., Martin M. A., Pollack R. — J. Virol., 1980, v. 35, p. 252—255.

Isturiz M. A., Gardoni R. L. — Cell. Immunol., 1977, v. 31, p. 332—335.
Ito Y. — Virology, 1979, v. 98, p. 261—266.
Ito Y., Brocklehurst J. R., Dulbecco R. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, p. 4666—4669.
Jegawa M., Sugano S., Yamaguchi N. — J. Virol., 1980, v. 35, p. 320—330.
Joeda E., Arrand J. R., Griffin B. E. — Nature, 1980, v. 285, p. 165—167.
Kalmar L., Lang I., Gergely P. — Acta med. Acad. Sci. Hung., 1978, v. 35, p. 35—38.
Karjalainen H. E., Laaksonen A. M., Mantyjärvi R. A. — J. Gen. Virol., 1978, v. 41, p. 171—174.
Kaplan J. — Cancer Treat. Rep., 1978, v. 62, p. 1757—1759.
Kappler J. W., Marrack P. C. — Cell Immunol., 1975, v. 18, p. 9—20.
Karrer K., Humphreys S. R., Goldin A. — Int. J. Cancer, 1967, v. 2, p. 213—223.
Kataoka T., Ogihara K., Sakurai Y. — Cancer Res., 1980, v. 40, p. 3839—3845.
Katz K. — Z. Kreisl.-Forsch., 1951, Bd. 57, S. 288—338.
Katz S. J., Parker D., Turk I. L. — Nature, 1974, v. 251, p. 550—553.
Kay S., Frable W., Hume D.— Cancer, 1970, v. 26, p. 1048—1052.
Keller R. — J. Exp. Med., 1973, v. 138, p. 625—631.
Kennel S. J. — J. Virol., 1977, v. 22, p. 168—174.
Kerckhaert J. A. M., Vanderberg G. J., Villers J. M. — Ann. Immunol. (Inst. Pasteur), 1974, v. 1256, p. 415—419.
Kerr I. M., Olshevsky U., Baltimore D. — J. Virol., 1976, v. 18, p. 627—635.
Ketcham A. S., Wexler H., Mantel N. — J. Nat. Cancer Inst., 1961, v. 27, p. 1311—1321.
Ketcham A. S., Wexler H., Minton J. P. — J. A. M. A., 1966, v. 198, p. 157—164.
Khaitov R. M., Petrov R. V., Gambarov S. S. — Cell.Immunol., 1976, v. 22,p. 1—3.
Khoury G., Carter B. J., Ferdinand F. — J. Virol., 1976, v. 17, p. 832—840.
Kimura G., Dulbecco R. — Virology, 1973, v. 52, p. 529—531.
Kinsey D. L. — J. A. M. A., 1961, v. 178, p. 734—735.
Kirchner H., Chused T. M., Herberman R. B. — J. Exp. Med., Immunol., 1976, v. 22, p. 1—3.
Klein G.— Bull. Cancer, 1976, v. 63, p. 399—410.
Klein G. — J. Nat. Cancer Inst., 1977, v. 58, p. 383—386.
Klein E., Klein G. — J. Nat. Cancer Inst., 1964, v. 32, p. 547—552.
Klein G., Sjögren H. O., Klein E. — Cancer Res., 1960, v. 20, p. 1561—1572.
Klein G., Sjögren H. O., Klein E. — Cancer Res., 1962, v. 22, p. 955—962.
Kleiström P. — Cancer Treat. Rep., 1980, v. 64, p. 65—72.
Knight R. A., Ganguly A., Gallo R. C., T-cell function in myelogenous leukemia.— In: Mod. Trends Hum. leuk. 3. Berlin, 1979, p. 381—384.
Koch M., Sabin A. B. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1963, v. 113, p. 4—18.
Kohno M., Tanaka H. — J. Virol., 1977, v. 22, p. 273—280.
Koldovsky P.— Folia Biol., 1961, v. 7, p. 115—123.
Koren H. S., Williams M. S. — J. Immunol., 1978, v. 121, p. 1956—1959.
Krakower J. M., Barbacid M., Aaronson S. A. — J. Virol., 1977, v. 22, p. 331—339; v. 24, p. 1—7.
Krant M. J., Manskopf G., Brandrup C. S.— Cancer, 1968, v. 21, p. 623—631.
Krementz E. T., Mausell P. N., Hornung N. O. — Cancer, 1974, v. 33, p. 394—401.
Krueger J. G., Wang E., Goldberg A. R. — Virology, 1980, v. 101, p. 25—40.
Kryceve C., Vigier P., Barlati S. — Int. J. Cancer, 1976, v. 17, p. 331—339;
Krzyzek R., Lau A. F., Faras A. J. — J. Virol., 1979, v. 29, p. 507—516.
Kulburn D. G., Smith J. B., Goroczynsky R. M. — Eur. J. Immunol., 1974, v. 4, p. 784—788.
Kurth R., Bosch V., Bolognesi D. P. — Virology, 1977, v. 78, p. 511—521.
Langbeheim H., Shih T., Scolmick E. M. — Virology, 1980, v. 106, p. 292—300.
Lagrange P. H., Mackaness G. B., Miller T. E. — J. Exp. Med., 1974, v. 139, p. 1529—1532.
Laurentaci G., Tato F. B. — Minerva med., 1980, v. 71, p. 9689—9697.
Leamnson R. N., Shander M. H. M., Halpern M. S. — Virology, 1977, v. 76, p. 437—439.
Ledbetter J., Nowinski R. C., Emery S. — J. Virol., 1977, v. 22, p. 65—73.

Ledinko N., Schaenfell J., Soorma O. — J. Virol., 1979, v. 29, p. 250—260.
Lee K., Mak S. — J. Virol., 1977, v. 24, p. 408—411.
Leis J., Hurwitz J., Joklik W. R. The avian myeloblastosis virus RNA — dependent DNA polymerase. — In: Biol. Tumor Viruses. Corvallis, 1976, p. 77—106.
Leis J. P., Scheible P., Smith R. E. — J. Virol., 1980, v. 35, p. 722—732.
Leither J., Bourke A. R. — Cancer Res., 1962, v. 22, p. 2—6.
Lemay P. — Bull. Inst. Pasteur, 1978, v. 76, p. 133—162.
Lenk R., Storch T., Maizel J. V. — Virology, 1980, v. 105, p. 19—34.
Levin A. S., Byers V. S., Fudenberg H. H. — J. Clin. Invest., 1975, v. 55, p. 487—499.
Levin R. — New Sci., 1973, v. 57, p. 417—421.
Levy E. M., Silverman S., Schmid K. — Cell Immunol., 1978, v. 40, p. 222—225.
Levy J. G., Whitney R. B., Smith A. G. — Brit. J. Cancer, 1974, v. 30, p. 289—294.
Levy J. P. — Progress in immunol., 1974, v. 3, p. 249—258.
Lewis M. K., Cole W. R. — J. A. M. A., 1958, v. 77, p. 621—626.
Linke H. K., Tony H., Gernot W. — J. Virol., 1979, v. 29, p. 390—394.
Linzer D. I., Maltzman W., Levine A. — Virology, 1979, v. 98, p. 308—318.
Lloyd R. E., Jones S. E., Salmon S. E. — Cancer Treat. Rep., 1976, v. 60, p. 77—82.
Lo-Bulgio A. F., Neidhart I. A. — Med. Clin. N. Am., 1976, v. 7, p. 159—165.
Lo-Bulgio A. F., Neidhart J. A., Hilberg R. W. — Cell. Immunol., 1973, v. 7, p. 159—165.
Lockwood M. P., Rothschild H., Wilson M. — Nature, 1977, v. 266, p. 720—721.
Londher M. V., Morini J. C., Font M. T. — Experientia, 1968, v. 24, p. 598—599.
Long C. W., Berzinski R., Gilden R. V. — Inst. J. Cancer, 1977, v. 19, p. 843—850.
Looney W. B., Ritenour E. R., Hopkins H. A. — Cancer Res., 1980, v. 40, p. 2179—2183.
Lopez D. M., Sigel M. M., Herbert L. — Res. J. Reticuloendothel. Soc., 1977, v. 22, p. 437—443.
Litzova E., Savary C. — Biomedicine, 1977, v. 27, p. 341—345.
Luborsky S. W., Chang C., Mora P. T. — Biochem. Biophys. Res. Commun., 1976, v. 71, p. 990—993.
Luigi L., Griffiths M., Fried M. — Virology, 1980, v. 101, p. 217—232.
Luka J., Siegert W., Klein G. — J. Virol., 1977, v. 22, p. 1—8.
Maguire H. J., Maibach H. C. — Int. Arch. Allergy, 1966, v. 29, p. 3—10.
Mahy B. W. — Nature, 1977, v. 268, p. 398—399.
Maibach H. J., Epstein W. L. — Int. Arch. Allergy, 1965, v. 27, p. 83—89.
Mann K., Hunter T. — J. Virol., 1979, v. 29, p. 232—241.
Marquardt P., Bru A., Biraque G. — J. Radiol. Electrol., 1961, v. 42, p. 343—345.
Marquardt H., Gilden R. V., Oroszlan S. — Biochemistry, 1977, v. 16, p. 710—717.
Martin R. G., Chan J. V., Avila J. The semiautonomeous replicon: a molecular model for the oncogenicity of SVYO. — In: Cold Spring Harbor symposium quantitative biology, v. 39. New York, 1975, p. 17—24.
Martin R. G., Setlow V. P., Edwards C. A. — J. Virol., 1979, v. 31, p. 596—607.
Mary B. M., Homas T. T., Folk W. R. — J. Virol., 1980, v. 33, p. 1215—1220.
Masucci M., Klein E., Argov S. — J. Immunol., 1980, v. 124, p. 2458—2463.
Mathe G., Schneider M., Schwarzenberg L. — Eur. J. Cancer, 1970, v. 6, p. 23—31.
Mathe G., Schwarzenberg L., De Vassal F.— Lancet, 1976, v. 12, p. 143—149.
Mathe G., Tubiana M. — The Natural history, diagnosis and treatment of Hodkin's disease. — Copenhagen, 1973, v. 1—2.
Matsuno T., Yamanouchi T. — Nature, 1961, v. 191, p. 75—76.
McBride R. A., Watanabe D. H., Schierman L. W. — Eur. J. Immunol., 1978, v. 8, p. 147—149.
McCormick F., Harlow E. — J. Virol., 1980, v. 34, p. 213—224.
McLennan I. C. M. — Adv. Biosci., 1974, v. 12, p. 87—90.
McLennan I. C. M. — J. Immunol., 1978, v. 121, p. 2542—2545.
Menon M., Stefani S. S. — Oncology, 1978, v. 35, p. 63—67.
Miao R., Dougherty R. M. — J. Gen. Virol., 1977, v. 35, p. 67—75.

Michel K., May E., Cassingena R. — J. Virol., 1979, v. 31, p. 472—483.
Mildred P. E. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1970, v. 133, p. 73—76.
Miller J. J., Cole L. J. — J. Exp. Med., 1967, v. 126, p. 109—125.
Miller H. C., Woodroof M .W., Gambacorta J. P. — Ann. Surg., 1962, v. 156, p. 852—856.
Minato N., Reid L., Cantor H. — J. Exp. Med., 1980, v. 152, p. 124—137.
Mitchel M. S., De Conti R. C. — Cancer, 1970, v. 26, p. 884—889.
Mitchison N., Dube O. — J. Exp. Med., 1965, v. 2, p. 179—183.
Mizutani S., Temin H. M. — J. Virol., 1976, v. 19, p. 610—619.
Modak M. J., Marcus S. L. — J. Biol., Chem., 1977, v. 252, p. 11—19.
Moelling K. — J. Virol., 1976, v. 18, p. 418—425.
Moelling K., Scott A., Owada M. — J. Virol., 1980, v. 33, p. 680—688.
Möller E. — J. Exp. Med., 1965, v. 122, p. 11—23.
Möller G. — J. Nat. Cancer Inst., 1963, v. 30, p. 1153—1161.
Montagua W., Dobson R. Carcinogenesis. Advances in biology of skin. — Oxford, 1966, p. 29—42.
Muchmore A. V., Decker J. M., Blaese R. M. — J. Immunol., 1977, v. 119, p. 1680—1683.
Mukai N., Kalter S. S., Cummins L. B. — Science, 1980, v. 210, p. 1023—1025.
Mukherji B. — J. Immunol. Meth., 1980, v. 37, p. 233—247.
Nakayama K. — Chirurg., 1962, v. 33, p. 14—18.
Naso R. E., Brown R. L. — Virology, 1977, v. 82, p. 247—251.
Nathan H. C., Bieber S., Elion G. B. — Proc. Soc. Exp. Biol., 1961, v. 107, p. 796—799.
Neidhart J. A., Schwartz R. S., Hurtubise P. E. — Cell Immunol., 1973, v. 9, p. 319—323.
Nerom J. T., Hellström J., Hellström K. E. — J. Immunol., 1976, v. 117, p. 1846—1852.
Ng Ah-Kan, Indiveri F., Ferrone S. — J. Immunol., 1980, v. 124, p. 2336—2340.
Nigrelli K. F. — Zoologica, 1952, v. 37, p. 89—90.
Nigrelli R. F., Zahe P. A. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1952, v. 81, p. 379—380.
Nigrelli R. F., Jacowska S. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1960, v. 90, p. 884—892.
Nigrelli R. F., Stempien M. F. — Fed. Proc., 1967, v. 26, p. 1197—1205.
Nigro N., Madoi E., Baroncelli P. G.— Minerva pediatr., 1970, v. 22, p. 1035—1044.
Nonoyama M., Tanaka A. Plasmid DNA as a possible state of Epstein-Barr virus genomes in nonproductive cells. — In: Cold Spring Harbor symposium quatitative biology, v. 39. New York, 1975, p. 807—810.
Noonan K. D., Wright P. J., Bouck N. — J. Virol., 1976, v. 18, p. 1134—1138.
Norbury K. C. — Cancer Res., 1977, v. 37, p. 1408—1415.
North R. J., Kirstein D. P., Tattle R. Z.—J. Exp. Med., 1976, v. 143, p. 559—573.
Nossal G. J. V. — Adv. Immunol., 1962, v. 2, p. 163—205.
Nusse R., Janssen H., Michalides R. — J. Virol., 1980, v. 35, p. 340—348.
O'Brien S., Boone C. W. — J. Gen. Virol., 1977, v. 35, p. 511—523.
Oberender H., Gartner L., Kunkel M. — Med. aktuell, 1980, Bd. 6, S. 167—168.
Oers M. H. J., Zeijlemaker W. P., Schellekens P. T. A. — Int. J. Cancer, 1977, v. 21, p. 204—207.
Ohno T., Spiegelman S. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, p. 2144—2148.
Okasinski G. F., Velicer L. F. — J. Virol., 1976, v. 20, p. 96—106.
Okasinski G. F., Velicer L. F. — J. Virol., 1977, v. 32, p. 74—85.
Old L. I., Boyse E. A. — Ann. Rev. Med., 1964, v. 15, p. 167—171.
Oliff A., Lame R., Scolnick E. — J. Virol., 1980, v. 35, p. 924—936.
Olivotto M., Boniford R. — Int. J. Cancer, 1974, v. 13, p. 478—488.
Oppermann H., Levinson A. D., Varmus H. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 1804—1808.
Oroszlan S., Copeland T., Smythers G. — Virology, 1977, v. 77, p. 413—417.
Osborn J. E., Robertson S. M., Padgett B. L. — J. Virol., 1976, v. 19, p. 675—684.
Ozaki V., Ohashi M., Kimura E. M. — J. Med. Virol., 1980, v. 5, p. 249—256.
Ozer H., Strelkanskas A. J., Callery R. T. — Eur. J. Immunol., 1979, v. 9, p. 112—115.

Padgett B. L., Walker D. L., Chon S. M. — J. infect. Dis., 1976, v. 133, p. 686—690.
Padgett B. L., Walker D. L., Varakis J. N. — Cancer Res., 1977, v. 37, p. 718—720.
Panet A. — Isr. J. Med. Sci., 1977, v. 13, p. 731—739.
Panet A., Kra Oz Z. A. — Virology, 1978, v. 89, p. 95—101.
Parish C. R. — Transplant. Rev., 1975, v. 25, p. 98—101.
Parker L. M., Griffiths C. I., Richman C. M.— Cancer, 1980, v. 46, p. 669—674.
Parks W. P., Scolnick E. M. — J. Virol., 1977, v. 22, p. 711—719.
Parks W. P., Hawk R. S., Scolnick E. M. — J. Virol., 1976, v. 18, p. 491—503.
Parrillo J. E., Fauci A. S. — Scand. J. Immunol., 1978, v. 8, p. 99—101.
Patterson W. B. — In: Biological interactions in normal and neoplastic growth. Boston, 1962, p. 247—252.
Paul W. E., Benacerraf B. — Science, 1977, v. 195, p. 1293—1300.
Pawson T., Martin G. S. — J. Virol., 1980, v. 34, p. 280—284.
Pawson T., Harvey R., Smith A. E. — Nature, 1977, v. 268, p. 416—420.
Peak C. J. — Cancer, 1971, v. 28, p. 1126—1128.
Pellis N. R., Macek C. M., Kahan B. D. — Int. J. Cancer, 1980, v. 26, p. 443—449.
Perbal B., Massoulzadegan M. — J. Virol., 1980, v. 33, p. 697—707.
Perlmann P., McLennan J. C. M. — Progress in Immunol., 1974, v. 11, p. 347—350.
Perry L. I., Greene M. I. — J. Immunol., 1980, v. 125, p. 738—748.
Petersen E. E. — Z. Hautkrankh., 1977, Bd., 52, S. 417—426.
Petrany G. J., Nousa K., Szollar J. — Folia biol., 1969, v. 15, p. 366—375.
Pettit G. R. Biosynthetic Products for Cancer Chemotherapy, 1977, v. 1.
Pettit G .R., Day J. F. — Nature, v. 227, p. 962—964.
Pettit G. R., Grass G. M. — Biosynthetic Products for Cancer Chemotherapy, 1978, v. 2.
Pettit G. G., Ode R. H. — Biosynthetic Products for Cancer Chemotherapy, 1979, v. 3.
Pilch Y. H., Fritze D., Kern D. H. — Med. Clin. N. Am., 1976, v. 60, p. 567—583.
Pöckl E., Wintersberger E. — J. Virol., 1980, v. 35, p. 8—19.
Porta G. D., Parmiani G. — Exp. Cell Biol., 1976, v. 44, p. 170—183.
Potter M. R., Moore M. — Clin. Exp. Immunol., 1978, v. 4, p. 78—86.
Prehn L. M. — J. Nat. Cancer Inst., 1976, v. 56, p. 833—838.
Prehn R. T. — Proc. Am. Ass. Cancer Res., 1959, v. 3, p. 51—62.
Prehn R. T. — J. Reticuloendothel. Soc., 1971, v. 10, p. 1—16.
Prehn R. T. — Science, 1972, v. 176, p. 170—173.
Prehn R. T. Oncogenesis and tumor immunology. — In: 18th scientific report. Philadelphia, 1973, p. 233—252.
Prehn R. T. — Transplant. Rev., 1976, v. 28, p. 34—42.
Prehn R. T. — Adv. Cancer Res., 1976, v. 23, p. 203—236.
Prehn R. T., Main J. M. — J. Nat. Cancer Inst., 1957, v. 18, p. 769—778.
Prehn R. T., Lappe M. A. — Transplant. Rev., 1971, v. 7, p. 26—29.
Proctor J. W., Palmer P., Rudenstam G. — J. Nat. Cancer Inst., 1974, v. 53, p. 579—580.
Proffitt M. R. Viruses as potential initiators of autoimmune phenomena and lymphoma. — In: Virus-Lymphocyte Interact. Implic. Disease. New York, 1979, p. 53—70.
Prozesky O. W., Harley E. H., Mew R. T.— S. Afr. Ganeek Bull., 1980, v. 24, p. 74—75.
Pusztai R. ,Taridi B., Béladi M. — J. Gen. Virol., 1978, v. 41, p. 433—436.
Qualtiere L. F., Pearson G. R. Epstein-Barr virus induced membrane antigens.— In: Abstrs. 79th Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol. Washington, 1979, p. 265.
Quinn R. J., Kashiwagi P.— J. Pharm. Sci., 1974, v. 63, p. 257—260.
Qureshi A. A. — Acta virol., 1980, v. 24, p. 232—254.
Ran M., Witz I. P. — Inst. J. Cancer, 1972, v. 9, p. 242—249.
Papp F., Colberg-Polev A. M. — Rev. microbiol., 1980, v. 11, p. 1—11.
Reddy V. B., Thimmappaya B., Dhar R. — Science, 1978, v. 200, p. 494—502.
Rehn E. Z. — Z. Kreisl-Forsch., 1940, Bd. 50, S. 15—19.

Reif U. M., Winterhoff U., Doerfler W. — Eur. J. Biochem., 1977, v. 73, p. 313—325.
Reitz M. S., Gallo R. C., Gillespie D. H. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, p. 2113—2118.
Rice I. K., Papestephanou C. — Biol. Bull., 1970, v. 138, p. 334—343.
Richert N. D., Davies P. J., Gilbert J. — J. Virol., 1979, v. 31, p. 695—706.
Rigby P. G. — Nature, 1969, v. 221, p. 968—969.
Riggins R. S., Pilsh J. H. — Cancer Res., 1965, v. 24, p. 1994—1996.
Rijswijkvan R. E., Sybesma H. B., Kuipers S. T.— Neth. J. Med., 1976, v. 19, 201—208.
Robb J. A. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, p. 447—451.
Robb J. A. — J. Gen. Virol., 1979, v. 42, p. 405—408.
Robertson D. L., Baenziger N. L., Thach R. E. — J. Virol., 1975, v. 15, p. 407—410.
Robinson I. L., Christian C. L. — Nature, 1960, v. 187, p. 796—797.
Robinson J. E., Andiman W. A., Miller G. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, p. 749—753.
Roder J. C., Kiessling R. — Scand. J. Immunol., 1978, v. 8, p. 135—139.
Rose J. K., Haseltine W. A., Baltimore D. — J. Virol., 1976, v. 20, p. 324—329.
Rosen G., Tan C., Sanmaneechai A. — Cancer, 1975, v. 35, p. 936—941.
Rosenau W., Moon D. L. — J. Nat. Cancer Inst., 1961, v. 27, p. 471—483.
Ross S. R., Flint S. J., Levine A. J. — Virology, 1980, v. 100, p. 419—432.
Ryser J., Vassalli P. — J. Immunol., 1974, v. 113, p. 719—721.
Sachs L. — J. Nat. Cancer Inst., 1962, v. 29, p. 759—767.
Sahagan B., Haseline W. — J. Virol., 1980, v. 34, p. 390—401.
Sahiar K., Schwartz R. — J. Immunol., 1965, v. 95, p. 345—349.
Salden M. H. L., Bloemendal H. — Biochem. Biophys. Res. Commun., 1976, v. 68, p. 249—255.
Sambrook J. — Trends Biochem. Sci., 1977, v. 2, p. 152—154.
Saner G., Krieg P., Steffen M. Biological activity of a latent episomal papovavirus genome in primate cells. — In: 12th Meet. Eur. Tumor Virus Group SPA. Belgium, 1979, p. 4048.
Santoli D., Moretta L., Koprowski H. — Clin. Exp. Immunol., 1978, v. 33, p. 309—312.
Santoni A., Riccardi C., Barlozzari T. — Int. J. Cancer, 1980, v. 26, p. 837—843.
Santoni A., Riccardi C., Sorci V. — J. Immunol., 1980, v. 124, p. 2329—2335.
Santos G .W. — Fed. Proc., 1967, v. 26, p. 3—9.
Santos G, W., Owens H. — Nature, 1966, v. 209, p. 622—624.
Sarkar N. H., Taraschi N. E., Pamenti A. A. — Virology, 1967, v. 69, p. 677—690.
Savary C. A., Lotzova E. — J. Immunol., 1978, v. 120, p. 239—245.
Schatten W. E., Kramer W. — Cancer, 1958, v. 11, p. 455—459.
Schatten W. E., Kramer W. — Cancer, 1958, v. 46, p. 364—378.
Schmeer M. R. — Science, 1964, v. 144, p. 413—414.
Schmidt-Ullrich R., Thompson W. S., Wallach D. F. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, p. 5069—5071.
Schmitz F. J., Yanderach D. J. — J. C. S. Chem. Comm., 1974, p. 407—408.
Schneck S., Penn J. — Lancet, 1971, v. 174, p. 591—593.
Schneider M., Schwarcenberg L., Amiel I. — Presse med., 1970, v. 78, p. 1769—1774.
Schochetman G., Boehm-Traitt M., Schlom J. — J. Immunol., 1976, v. 117, p. 168—173.
Schwartz R. S., Dameshek W. — Nature, 1959, v. 183, p. 1682—1683.
Schwartz R., Stack J., Dameshek W. — Proc. Soc. exp. Biol. New York, 1958, v. 99, p. 164—167.
Schwartz R., Eisner A., Dameshek W. — J. Clin. Invest., 1969, v. 38, p. 1394—1398.
Schwarzenberg L., Mathe G. — Lancet, 1966, v. 2, p. 365—366.
Scif R. — J. Virol., 1980, v. 35, p. 479—487.
Sefton B. M., Hunter T., Beemon K. — J. Virol., 1979, v. 30, p. 311—318.
Seglawski W. S. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1976, v. 276, p. 411—416.

Seppala M., Ruoslahti E., Soikkeli S. — Ann. Med. exp. Biol., 1970, v. 48, p. 131—134.
Serny J., Proffit M. R., Essek M. — J. Nat. Cancer Inst., 1976, v. 56, p. 819—822.
Sloan G. M., Cole P., Wilson R. E. — Transplant. Proc., 1977, v. 9, p. 1129—1132.
Shealy D. J., Mosser A. G., Rueckert R. R. — J. Virol., 1980, v. 34, p. 431—437.
Sheffield J. B., Zacharchuk C. M., Taraschi N. — J. Virol., 1976, v. 19, p. 255—266.
Sheiness D., Fanshier L., Bishop J. M. — J. Virol., 1978, v. 28, p. 600—610.
Sheiness D., Bister K., Bishop J. M. — J. Virol., 1980, v. 33, p. 962—968.
Sheiness D., Varmus H., Bishop M. — J. Virol., 1980, v. 105, p. 415—424.
Sheppard J., Levine A., Burger M. M. — Science, 1971, v. 172, p. 1345—1346.
Sherr C. J., Maizel J., Ande W. G. — J. Virol., 1980, v. 34, p. 200—212.
Shih T. Y., Weeks M. O., Young H. A. — J. Virol., 1979, v. 31, p. 546—556.
Shore S. L., Romano T. J., Gordon D. R. — Cell. Immunol., 1977, v. 31, p. 55—58.
Simmons D. T., Martin M. A., Chang C. — J. Virol., 1980, v. 34, p. 650—657.
Sjögren H. O. — Virology, 1961, v. 15, p. 214—221.
Sjögren H. O. — J. Nat. Cancer Inst., 1964, v. 32, p. 661—672.
Sjögren H. O., Hellström I., Bansai S. C. — Proc. Nat. Acad. Sci., 1967, v. 63, p. 1372—1389.
Sjögren H. O., Minowada J., Ankest J. — J. Exp. Med., 1967, v. 125, p. 689—701.
Sjögren H. O., Hellström I., Hellström K. S. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, v. 68, p. 1372—1375.
Skipper H. E. — Cancer Res., 1969, v. 29, p. 2329—2344.
Skurzak H. M., Klein E. — J. Exp. Med., 1972, v. 135, p. 997—1002.
Small M. — J. Immunol., 1977, v. 118, p. 1517—1523.
Smith A., Smith R., Paucha E. — J. Virol., 1978, v. 28, p. 140—153.
Solovey A. C., Rapoport F. T. — Surg. Gynec. Obstet., 1965, v. 121, p. 756—760.
Soprano K. J., Rossini M., Croce C. — Virology, 1980, v. 102, p. 317—326.
Southam C. M. — Eur. J. Cancer, 1965, v. 1, p. 173—181.
Southam C. M. — Cancer Res., 1968, v. 28, p. 1433—1440.
Sparks F. C., O'Connel T. X., Lee Y. T. N. — Surg. Forum, 1973, v. 24, p. 118—123.
Spath F. — Wien. Klin. Wschr., 1964, Bd. 76, S. 77—79.
Stacey D. W. — J. Virol., 1979, v. 29, p. 949—956.
Stacey D. W., Hanafusa H. — Nature, 1978, v. 273, p. 779—782.
Stéhelin D. — Path. Biol., 1976, v. 24, p. 513—515.
Stéhelin D., Varmus H., Bishop J. M. — Virology, 1977, v. 76, p. 675—684.
Stern P., Gidlund M., Orn A. — Nature, 1980, v. 285, p. 341—342.
Sterzl J. — Folia microbiol., 1960, v. 5, p. 364—371.
Stewart T. H., Orizaga M. — Cancer, 1971, v. 28, p. 1472—1477.
Stobo J. D., Rosenthal A. S., Paul W. S. — J. Exp. Med., 1973, v. 138, p. 71—75.
Stjernsward J. — J. Nat. Cancer Inst., 1966, v. 36, p. 1189—1194.
Stoerk H. — Wien. Klin. Wschr., 1953, Bd. 65, N 36—37, S. 734—739.
Stoll E., Billeter M. A., Palmenberg A. — Experientia, 1977, v. 33, p. 801.
Strand B. C., Aurelian L. — Virology, 1976, v. 69, p. 438—452; v. 73, p. 244—258.
Strand M., August J. T. — Virology, 1977, v. 79, p. 129—143.
Strom T. B., Bear R. A., Gribik M. — All. Immunol., 1975, v. 20, p. 247—250.
Sullivan T. D., Ladue K. T. — Zoologica, 1955, v. 40, p. 49—52.
Sullivan T. D., Nigrelli R. F. — Proc. Am. Ass. Cancer Res., 1956, v. 2, p. 151—155.
Svet-Moldavsky G. J., Zinzar S. N., Spector N. M. — Nature, 1964, v. 202, p. 353—354; v. 204, p. 91—92.
Szenberg A., Cunningham A. J. — Nature, 1968, v. 217, p. 747—748.
Vilanava J., Rueda L. A. — Merc. med., 1964, v. 43, p. 7—17.
Weksler H., Minton J. P., Ketcham A. S. — Cancer, 1965, v. 18, p. 985—994.
Wood S. J., Holyoke E. D. — Cancer, 1954, v. 7, p. 437—443.
Zubrod C. G. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, v. 69, p. 1042—1045.
Zuppinger A. — Bull. Schweiz. Akad. med. Wiss., 1964, Bd. 20, S. 190—204.
Zur Hansen H. — Biochem. biophys. Acta, 1975, v. 417, p. 25—53.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение 3

ГЛАВА I. **Белки опухолеродных вирусов и антигены трансформированных ими клеток** 8

Молекулярно-биологические механизмы вирусного онкогенеза 9
ДНК-содержащие опухолеродные вирусы и канцерогенез . 24
Онкогены ретровирусов и неопластическая трансформация клеток 78

ГЛАВА II. **Антигенная трансформация в процессе неопластического перерождения клеток** 124

Антигены трансплантационного типа злокачественных новообразований, индуцированных химическими канцерогенами . . 124
Опухолеассоциированные антигены 127
Эмбриональные антигены опухолевых клеток 130
Экспрессия реверсивных антигенов в опухолевых клетках (гетерогенные антигены) 136

ГЛАВА III. **Иммунный ответ при опухолевом росте** 141

T- и *B*-системы иммунитета и бластоматозный процесс . . 145
Противоопухолевая активность макрофагов 158
Естественные киллеры и канцерогенез 160

ГЛАВА IV. **Канцерогенез и иммунологический гомеостазис** . . . 168

Антигенная трансформация и ее роль в канцерогенезе . . 169
Толерантность, аутоиммунные реакции и канцерогенез . . 171
Иммуностимуляция роста неопластически трансформированных клеток 174
Иммунодепрессия, иммунологический надзор и канцерогенез 179
Иммунологическая регуляция клеточной пролиферации . . 184

ГЛАВА V. **Современное состояние и критическая оценка терапии злокачественных опухолей** 187

ГЛАВА VI. **Иммунологический статус больных злокачественными новообразованиями и животных-носителей опухолей** 192

ГЛАВА VII. **Влияние антибластомных лекарственных средств на иммуногенез в норме и при опухолевом росте** 197

Трансплантационный иммунитет и гиперчувствительность замедленного типа 197
Гуморальный иммунный ответ 199
Иммуностимулирующий эффект цитостатиков 203
Противоопухолевая резистентность 205

ГЛАВА VIII. **Терапия экспериментальных опухолей и иммунный ответ организма** 210

Влияние различных доз антибластомных лекарственных средств на противоопухолевый эффект 210
Ритм введения антибластомных лекарственных средств и противоопухолевый эффект 225
Влияние хирургического лечения опухолей на иммунный ответ организма 231
Пред- и послеоперационная химиотерапия ЦФ 243

ГЛАВА IX. **Роль иммунотерапии в комплексном лечении солидных опухолей** 251

ГЛАВА X. **Канцеролитический эффект и перспективы практического применения биологически активных веществ гидробионтов** . 273

Заключение 280
Conclusions 287
Список основной литературы 294

161635

БИБЛИОТЕКА
Государственного
медицинского института
гор. Андижан

ADTI
AXB.-RESURS MARKAZI
№ 1991

Александр Иванович Агеенко
Семен Петрович Гордиенко
Омар Григорьевич Саканделидзе

ИММУНИТЕТ И ТЕРАПИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Утверждено к изданию Советом ЦОЛИУв Министерства здравоохранения СССР

ИБ 1926

Редактор *С. М. Карлова.* Мл. редакторы *Н. Г. Филипп, Д. Е. Григорян.* Художник *В. В. Макеев.* Художественный редактор *П. П. Власенко.* Технический редактор *Н. В. Попеску.* Корректоры *Н. И. Корчмарь, Р. Г. Евваленко*