

С. Н. Быковская · Е. В. Груntenко

**Т-
лимфоциты
в противоопухолевом
иммунитете**

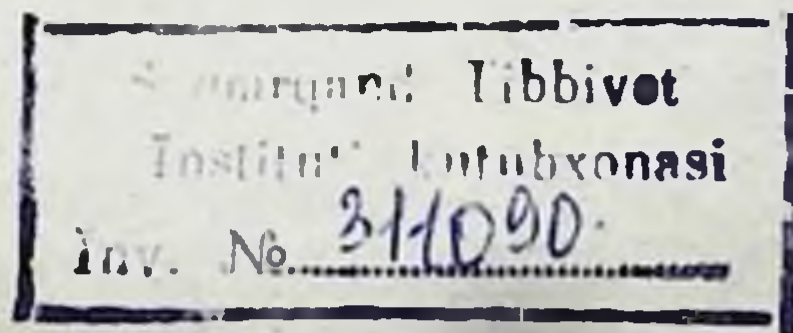
612.11
Б 952

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ
АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК СССР
ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

С. Н. БЫКОВСКАЯ, Е. В. ГРУНТЕНКО

Т-ЛИМФОЦИТЫ В ПРОТИВООПУХОЛЕВОМ ИММУНИТЕТЕ

Ответственный редактор
д-р мед. наук *М. О. Раушенбах*



ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
Новосибирск · 1982

**Быковская С. Н., Груnten-
ко Е. В. Т-лимфоциты в противоопухолевом
иммунитете.— Новосибирск: Наука, 1982.**

В монографии изложены сведения о свойствах и функции Т-лимфоцитов, механизме действия Т-киллеров, пролиферации и цитолитической активности этих клеток при иммунном ответе. Представлены данные о мембране киллеров, раскрыты иммунологические аспекты злокачественного роста.

Книга рассчитана на специалистов, занимающихся проблемами иммуноонкологии, клеточной иммунологии, цитологии, и врачей.

Табл. 14. Ил. 103. Библиогр. 772.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ВМГ — внутримембранные гранулы
КГ — комплекс Гольджи
КМ — клетка-мишень
ИЛ I, ИЛ II — интерлейкины I, II
Кон А — конканавалин А
ЛТ — лимфотоксин
ЛПС — липополисахарид
ТНФ — тринитрофенол
Т.Э.С. — телячья эмбриональная сыворотка
ФГА — фитогемагглютинин
Эр — эндоплазматический ретикулум
АЕФ (Allogeneic Effect Factor) — фактор аллогенного эффекта
BudR — бромдезоксипуридин
Ia (I-region associated) — антигены, ассоциированные с I-райо-
ном МНС
Ig — иммуноглобулины
MLC (mixed lymphocyte culture) — смешанная культура лимфо-
цитов
МНС — major histocompatibility complex
РТПХА — реакция трансплант против хозяина
SF (Suppressor Factor) — супрессорный фактор
TCGF (T-Cell Growth Factor) — фактор роста Т-клеток
TL — тимуслейкемический антиген
TSF — (T-Stimulating Factor) — фактор, стимулирующий Т-клетки

ВВЕДЕНИЕ

За прошедшие два десятилетия разработаны новые методы, с помощью которых выявлено участие клеточных систем, ответственных за распознавание и уничтожение опухолевых клеток, продемонстрирован мультикомпонентный ответ на опухоль. Кроме специфических антител и комплемента, деструкцию опухолевых клеток-мишеней *in vivo* и *in vitro* вызывают К-клетки, макрофаги, натуральные киллеры и цитолитические Т-лимфоциты (Т-киллеры).

Результатом модификации плазматической мембраны нормальной клетки в процессе неопластической трансформации является экспрессия новых антигенов и количественные или качественные изменения компонентов плазматической оболочки. Продemonстрировано реципрокное соотношение между антигенами гистосовместимости и опухолеспецифическими трансплантационными антигенами, которые могут представлять модифицированные антигены H-2. Таким образом, связь опухолевых антигенов с антигенами главного комплекса гистосовместимости объединяет две проблемы — изучение механизмов трансплантационного и исследование противоопухолевого иммунитета.

В ходе иммунного ответа на антигены, ассоциированные с главным комплексом гистосовместимости, образуются специфические Т-киллеры, которым принадлежит ведущая роль в отторжении нормального или опухолевого аллотрансплантата. *In vitro* продемонстрирована высокая цитолитическая активность Т-киллеров, выделенных из регионарных лимфоузлов и солидной опухоли человека по отношению к аутологичным опухолевым клеткам. Т-киллеры, полученные у экспериментальных животных, иммунизированных сингенными или аллогенными опухолевыми клетками, также вызывают их гибель. Однако механизм действия Т-киллеров пока неизвестен.

Монография представляет собой обзор и анализ литературных данных о субпопуляциях Т-лимфоцитов, принимающих участие в образовании клона специфических Т-киллеров, представлены современные концепции, объясняющие механизм действия Т-киллера на клетку-мишень, изложены собственные эксперименталь-

вые данные С. Н. Быковской, свидетельствующие о наличии секреторного аппарата в цитоплазме Т-киллеров. Предложена модель дифференцировки секреторного аппарата от стадии лимфобласта до вторичного малого Т-лимфоцита киллера, обладающего высоким литическим потенциалом, обсуждены механизмы секреции по аналогии с действием Т-киллера на клетку-мишень.

В большинстве описанных в гл. V экспериментов применено одно и то же воздействие на Т-систему иммунитета — хирургическое удаление тимуса. Проводится сопоставление результатов этого воздействия на возникновение и рост у лабораторных животных опухолей молочной железы. Аргументировано представление о том, что на характер взаимоотношений между лимфойдной системой организма и злокачественной опухолью влияет генотип опухоленосителя, этиология новообразования и особенности экспериментальной системы, использованной для индукции опухоли.

Ряд вопросов современной иммунологии детально освещен в некоторых монографиях и обзорах советских авторов. Глубокий анализ современных данных по регуляции и контролю иммунного ответа на молекулярно-генетическом, клеточном и медиаторном уровнях дан в книге Р. В. Петрова и др. (1981). Проблемы иммунологической толерантности детально рассмотрены в монографии Л. Н. Фонталина и Л. А. Певницкого (1978), механизмов иммунологического распознавания — в книге Б. Д. Брондза и О. В. Рохлина (1978), патологии иммунной системы при опухолевом росте — в работе Р. М. Хайтова (1978). Специальные работы посвящены изучению механизмов иммунного ответа у человека [Войтенок, 1980], иммунологической компетентности больных со злокачественными новообразованиями [Городилова и др., 1978], механизмов реакции трансплантат против хозяина [Говалло, 1977], клеточных основ кроветворения [Чертков, Фриденштейн, 1977]. Оригинальный подход в описании процессов защиты организма от антигенных вторжений предложен и разработан Г. И. Марчуком (1980). Используя метод математического моделирования, автор приходит к серии важнейших биологических следствий, применимых в инфекционной иммунологии.

Главы I—IV написаны С. Н. Быковской, главы V—VII — Е. В. Грунтенко, который благодарен С. А. Архипову за помощь в работе над материалом по натуральным киллерам.

специфичностями, контролируемые Ly-генами, которые вовлекаются в первичное иммунологическое распознавание. Система Ly-антигенов состоит из продуктов двух аллелей в каждом из трех локусов: Ly-1, Ly-2, 3 и Ly-5 [Boyse e. a., 1971]. Наибольшее количество Ly-антигенов обнаруживается на тимоцитах, значительно меньшее — на клетках лимфатических узлов (60—70% содержания в тимоцитах) и около 50% в клетках селезенки [Boyse e. a., 1968].

Зрелые Т-лимфоциты, заселяющие селезенку и лимфоузлы, имеют Θ-антиген и различные характеристики Ly-фенотипа. Кантор и Бойз [Cantor, Boyse, 1975a] выделили три субкласса клеток, имеющих различные сочетания Ly-антигена: в первые дни после рождения большая часть селезеночных клеток несет антигенные детерминанты Ly-1, 2, 3⁺; вскоре после рождения появляются клетки с маркерами Ly-1⁺ или Ly-2, 3⁺. Лимфатические клетки, имеющие фенотип Ly-1, 2, 3⁺, составляют более 50% Т-лимфоцитов селезенки взрослых мышей и, как предполагается, являются предшественниками субпопуляций лимфоцитов Ly-1⁺ и Ly-2,3⁺ [Wu e. a., 1975].

Однако последующие исследования оказались в противоречии с этими данными. Т-киллеры, классифицированные как Ly-2, 3, в некоторых случаях можно было лизировать сывороткой анти-Ly-1 и комплементом [Beverly e. a., 1976; Nakayama e. a., 1979]. Иммунофлюоресцентное исследование тимуса [Mathieson e. a., 1979] и периферических лимфоидных органов [Ledbetter, Herzenberg, 1979] показало, что гораздо большее число лимфоидных клеток экспрессируют антиген Ly-1, чем это было обнаружено при использовании цитотоксического теста.

Используя технику моноклональных антител и метод количественной иммунофлюоресценции, Ледбеттер с сотрудниками [Ledbetter e. a., 1980] показали, что все периферические Т-клетки имеют антиген Ly-1. В основном плотность антигена Ly-1 низкая, но значительно варьирует у разных типов Т-клеток. Незрелые кортизончувствительные тимоциты имеют самый низкий уровень Ly-1, тогда как зрелые кортизонрезистентные тимоциты и периферические Т-клетки имеют в 4 раза больше антигена Ly-1 [Mathieson e. a., 1979].

Напротив, плотность антигена Thy-1 в Т-клетках снижается по мере их созревания в тимусе и миграции на периферию [Fathman e. a., 1975; Ledbetter e. a., 1980]. Клетки Ly-2,3 представляют примерно 85% тимоцитов, и только 35% лимфоцитов селезенки и лимфатических узлов обнаруживают низкое содержание Ly-1 и высокое содержание антигена Thy-1 [Ledbetter e. a., 1980]. Авторы нашли небольшую популяцию клеток, имеющих значительные количества антигена Ly-1. Гистологически клетки этого фенотипа обнаруживались в герминальных центрах селезенки и лимфатических узлов. Содержание клеток Ly-1 в селезенке составляло примерно 2%.

Ледбеттер с сотрудниками описали также поверхностные антигены Т-клеток человека Leu-1, Leu-2a Leu-2b, которые гомологичны Ly-антигенам мыши и функционально соответствуют субпопуляциям мышинных Т-лимфоцитов [Ledbetter e. a., 1981]. Leu-1, подобно антигену Ly-1, обнаруживается на всех тимocyтах и в больших количествах — на Т-хелперах. Антигены Leu-2a и Leu-2b найдены только на супрессорах и цитолитических Т-лимфоцитах человека и схожи с мышинными антигенами Ly-2 и Ly-3.

Существует несколько модельных систем для изучения механизмов иммунологического распознавания, кооперации и дифференцировки субпопуляций Т-лимфоцитов. Наиболее изученной моделью является смешанная культура лимфоцитов двух доноров, которая позволяет проследить *in vitro* все этапы ответа Т-клеток в реакции на антигены, лимитированные главным комплексом гистосовместимости.

СМЕШАННАЯ КУЛЬТУРА ЛИМФОЦИТОВ (MLC)

Лимфоциты двух несимпатичных доноров, смешанные *in vitro* в соответствующей среде, в течение нескольких дней культивирования подвергаются серии изменений, соответствующих изменениям, наблюдаемым при стимуляции лимфоцитов неспецифическими митогенами, такими, как фитогемагглютинин или конканавалин А. Эти изменения характеризуются увеличением протеинового синтеза, за которым следуют нарастание синтеза ДНК, пролиферация и бласттрансформация [Rosenberg e. a., 1972].

Смешанная культура лимфоцитов получена Бахом и Хиршхорном [Bach, Hirschhorn, 1964], а также Цеппеллини с сотрудниками [Cerpellini e. a., 1965] и соответствует *in vitro* фазе распознавания в реакции отторжения нормального и опухолевого трансплантата. Лимфоциты, стимулированные в MLC, способны через несколько дней культивирования лизировать *in vitro* соответствующие по H-2-антигенам клетки-мишени, что адекватно эффекторной фазе трансплантационной реакции.

В смеси двух типов несимпатичных лимфоцитов пролиферируют обе популяции клеток — так называемая двунаправленная реакция, в которой реагирующие лимфоциты одновременно являются стимуляторами [Bach, Hirschhorn, 1964]. Для экспериментальных исследований обычно используется однонаправленная MLC, при которой в стимулирующей клеточной популяции синтез ДНК ингибирован обработкой митомицином С [Bach, Voynow, 1966] или облучением [Kasakura, Lowenstein, 1965]. Некоторые авторы стимулируют реагирующие родительские клетки лимфоцитами гибрида F₁ [Sörensen, 1972]. Объектом распознавания для Т-лимфоцитов являются продукты HLA-комплекса человека и H-2-комплекса мышей. Каждый комплекс генов контролирует три класса продуктов [Klein, 1979]. Первый класс молекул представ-

ляют антигены HLA—A—A, B, C у человека и антигены H-2K, D, L у мыши. Это гликопротеины с молекулярной массой 45 000d, определяемые на поверхности ядерных клеток и обладающие так называемой «частной специфичностью». Вторым класс молекул представляют антигены HLA-DR человека, эквивалентные Ia-антигенам мышей, и третий класс продуктов — это компоненты комплемента C₂, C₃ и Bf [Klein, 1979].

Для активации пролиферативной активности необходимы различия по I-району, который, в свою очередь, подразделяется на 5 субрайонов: I-A, I-B, I-J, I-E, I-C и контролирует синтез антигенных детерминант, стимулирующих активацию синтеза ДНК в Т-лимфоцитах при первичном иммунологическом распознавании [Meo e. a., 1973]. Ia-антигены присутствуют на В-клетках и макрофагах [Sachs, Cone, 1973] и в очень небольшом количестве на Т-клетках [Hämmerling e. a., 1976; Fathman e. a., 1975]. Клетки, несущие Ia-антигены, индуцируют пролиферативный ответ в MLC, но слабый, хотя и специфический цитолитический эффект по отношению к КМ [Nabholz e. a., 1975; Wagner e. a., 1975]. Антигены, кодируемые районами H-2K и H-2D, индуцируют слабый пролиферативный ответ, но гораздо более сильный цитолитический эффект [Schendel e. a., 1973]. Предварительная обработка стимулирующих селезеночных клеток сывороткой анти-Ia и комплементом значительно редуцирует пролиферативный ответ в MLC [Cantor, Boyse, 1977]. И наоборот, пролиферативный и цитолитический ответ значительно усиливается в присутствии Ia-стимулирующих клеток [Cantor, Boyse, 1975b; Wagner e. a., 1976].

Изучение конгенных линий мышей с точечными мутациями по К- или D-району продемонстрировало значительную индукцию Т-киллеров в отсутствии различий по Ia-району [Forman, Klein, 1975a; б; Melief e. a., 1975]. Возникло предположение, что на Ia- и SD-районы реагируют разные субпопуляции лимфоцитов, кооперирующихся в MLC [Cohen, Howe, 1973; Häyry, Andersson, 1974]. Как отмечено позднее, созревание предшественников Т-киллеров (клеток с Ly-1, 2, 3 антигенами) [Bohmer e. a., 1980] усиливается добавлением популяции клеток с Ly-1⁺ антигеном. Эта амплификация в MLC снимается при удалении Ia⁺-клеток из стимулирующей популяции [Cantor, Boyse, 1975a]. Таким образом, распознавания детерминант районов H-2K или H-2D Ly-1, 2, 3⁺ клетками достаточно для генерации цитолитической активности, которая может быть усилена Ly-1⁺-хелперными клетками, отвечающими на антигены, кодируемые I-районом.

Мертвые лимфоциты или клеточные фрагменты не могут служить стимуляторами в MLC [Sörensen, 1972]. Стимулирующая способность подавляется ультрафиолетовым облучением [Lafferty e. a., 1980], ингибиторами синтеза РНК и белка [Wagner, 1973].

По данным Минами с сотрудниками [Minami e. a., 1980], потенциальными стимуляторными клетками в MLC являются фагоцитирующие клетки, тогда как Т- и В-лимфоциты не способны сти-

мулировать ответ в MLC. При использовании нескольких инбредных и рекомбинантных линий мышей, конгенных по разным субрайонам главного локуса гистосовместимости, было показано, что клетки, обогащенные макрофагами, способны индуцировать MLC при различиях по K, D, IA и IE-локусам. И обогащенные, и обедненные макрофагами селезеночные клетки продуцировали слабый цитолитический ответ, если стимуляторы и отвечающие клетки отличались по локусам I-J, I-C, S или G, тогда как стимуляция MLR, индуцированная различиями по K- или D-районам, зависит от стимуляторных клеток, экспрессирующих Ia-антигены.

T-лимфоциты, как было показано, способны пролиферировать также в ответ на стимуляцию аутологичными или сингенными клетками. Тимоциты новорожденных мышей отвечают на обработанные митомицином клетки сингенной селезенки взрослых животных [Howe e. a., 1973], клетки лимфатических узлов взрослых мышей реагируют на обработанные митомицином сингенные или аллогенные клетки селезенки [Ponzio e. a., 1975; Finke e. a., 1976]. Такая аутореактивность отмечалась между субпопуляциями лимфоцитов периферической крови человека [Opelz e. a., 1975; Kunitz e. a., 1976]. Известна также способность T-лимфоцитов отвечать *in vitro* на сингенные опухолевые клетки и лимфобластоидные линии [Lerman e. a., 1979; Boyer, Fahey, 1976; Opelz e. a., 1977].

Как и в аллогенной MLC, отвечающими клетками в аутологичной системе являются T-лимфоциты. Однако вопрос о происхождении стимулирующих клеток до сих пор не решен. Кунитц с сотрудниками [Kunitz e. a., 1976] показали, что основными стимуляторными клетками являются ноль-клетки и что удаление моноцитов усиливает способность ноль-клеток к стимуляции. По данным других исследователей, наибольшей стимулирующей активностью обладают B-лимфоциты, меньшей — моноциты, а ноль-клетки — незначительной [Sakane e. a., 1979].

Смит [Smith, 1978] показал, что главными стимуляторами являются B-клетки и что моноциты не способны стимулировать аутологичные T-клетки.

Заслуживают внимания результаты Берла с сотрудниками [Beagle e. a., 1980]. Авторы получили обогащенные популяции T- и B-лимфоцитов, моноцитов и ноль-клеток из периферической крови человека. Все типы клеток использовали как отвечающие и стимулирующие в аутологичной MLC. Наибольшую пролиферацию индуцировали моноциты и более слабую — ноль-клетки. B- и T-лимфоциты практически не стимулировали пролиферативной реакции. Мононуклеарные клетки, обедненные моноцитами, не способны стимулировать MLC, но добавление возрастающего количества моноцитов приводило к подъему стимуляции.

Четкие результаты относительно происхождения стимулирующих клеток в сингенной MLC получены при изучении двух инбред-

ных линий морских свинок, имеющих различия только по I-району большого комплекса гистосовместимости. Ia-позитивными стимулирующими клетками оказались клетки перитонеального экссудата. Реакция специфически ингибировалась анти-Ia сывороткой к этим клеткам. Показано также существование двух Т-клеточных популяций, способных реагировать друг с другом или с родительскими клетками перитонеального экссудата в отсутствие экзогенного антигена. Таким образом, сингенная MLC может означать активацию Т-лимфоцитов, опосредованную через рецепторы к своим Ia-антигенам [Yamashita, Shevach, 1980]. Мышиные Т-киллеры распознают на клетках-мишенях чужеродные антигены H-2K, или H-2D.

Впервые Цинкернагель и Доерти [Zinkernagel, Doherty, 1974] обнаружили, что цитолитические Т-лимфоциты, специфичные к вирусу лимфоцитного хориоменингита, лизируют только собственные КМ, инфицированные вирусом [Doherty e. a., 1975]. В последующем другие исследователи получили аналогичные результаты. Всего изучено около 16 вирусов, патогенных для мышей. Этот феномен получил название «H-2-рестрикции». Обнаружены Т-киллеры, реактивные к аутологичным, химически измененным КМ [Shearer, 1974], а также Т-киллеры, специфичные к малым трансплантационным антигенам, таким как у-антиген, реакция на который также лимитирована антигенами H-2K или H-2D [Bevan, 1975; Simpson e. a., 1976].

Относительно механизма H-2 рестрикции было высказано два предположения. Т-киллеры могут иметь два рецептора: один, специфичный к вирусу, и другой, специфичный к своему H-2 гаплотипу. Во втором варианте вирус и H-2 антиген могут быть связаны в виде неоантигена, который вызывает стимуляцию Т-клеток. Таким образом, клетка-мишень несет на поверхности не только вирусный антиген, но и распознаваемые собственные К- или D-молекулы. Если опухолевые антигены находятся в пределах рестрикции МНС, Т-хелперы, ответственные за генерацию соответствующих Т-киллеров, распознают собственные антигены гистосовместимости, сцепленные с опухолевыми антигенами.

Гипотеза о связи H-антигенов с опухолевыми специфическими трансплантационными антигенами изложена еще Клейпом и Преном в середине шестидесятых годов [Klein, 1966; Prehn, 1967] и подтверждается последующими исследованиями их генетики и биохимии [Klein, 1979a].

Предполагаемый механизм неопластической трансформации объясняется соматической мутацией генов, кодирующих антигены гистосовместимости, и широко изучается на моделях опухолей, индуцированных метилхолантреном или другими канцерогенами [Ragmaní e. a., 1979].

Предшественники Т-киллеров реагируют на чужеродные антигены стимулирующих клеток только в том случае, если они ассоциированы с главным комплексом гистосовместимости.

Цитолитические Т-лимфоциты к H-2 антигенам, модифицированным комплексом вирусов саркомы Молони и саркоматозным вирусом, могут быть легко получены *in vivo* и *in vitro* [Levy, Lesclerk, 1977]. Т-киллеры могут быть получены также в результате рестимуляции иммунных селезеночных клеток опухолевыми клетками, имеющими антигены вируса лейкоза Молони [Plata e. a., 1975]. Активность таких киллеров направлена против комплекса вирусов, индуцировавших образование опухолевых клеток, сингенных эффекторным лимфоцитам по H-2K и H-2D локусу [Goward e. a., 1977; Plata e. a., 1976].

Фаза распознавания в MLC опосредуется несколькими популяциями клеток: Т-хелперами, которые реагируют на антигены, кодируемые генами I-района, макрофагами и предшественниками эффекторных Т-лимфоцитов, в частности Т-киллеров, отвечающих на антигены, лимитированные главным комплексом гистосовместимости. Целесообразно подробно охарактеризовать отдельные субпопуляции Т-лимфоцитов, участвующих в качестве эффекторов и регуляторов иммунного ответа.

Т-ХЕЛПЕРЫ

Функциональное тестирование лимфоцитов с определенным фенотипом осуществляется обработкой популяции клеток соответствующей анти-Ly сывороткой и комплементом, что позволяет удалить ненужные и отобрать требуемые субклассы лимфоцитов. Субпопуляция клеток, имеющих маркерные характеристики в цитотоксической реакции Ly-1⁺, 2, 3⁻, составляет 30% пула периферических Т-лимфоцитов [Simon, Eichmann, 1980]. Эти клетки обнаруживают хелперную активность, участвуют в реакции замедленной гиперчувствительности и лизируются анти-Ly-1, но не анти-Ly-2 сывороткой [Jandinski e. a., 1976; Huber e. a., 1976; Cantor e. a., 1976]. Антигены, с которыми преципитирует обычная анти-Ly-1 сыворотка, представляют собой гликопротеины с молекулярной массой 67 000d и 87 000d [Durda e. a., 1978]. Эти данные подтверждаются при использовании техники моноклональных антител [Ledbetter, Herzenberg, 1979]. Анализ иммунопреципитации показывает, что молекулярный вес и структура субъединиц поверхностной молекулы лимфоцита, определяющей его антигенную детерминанту, соответствуют сведениям, полученным при использовании обычных антител.

Кроме того, на поверхности Т-хелперов, участвующих в генерации Т-киллеров, недавно найден маркер Ly-7 [Pilarski e. a., 1980]. Лимфоциты, обработанные анти-Ly-7 сывороткой, не способны генерировать Т-киллеры [Shaw e. a., 1980]. Наличие антигенов, кодируемых генами Ia-района, спорно. В результате предварительной обработки клеток лимфоузла анти-Ia сывороткой и комплементом теряется способность таких лимфоцитов генери-

ровать Т-киллеры [Plate, 1976a, б]. Окумура с сотрудниками также опубликовали данные, указывающие на присутствие Ia-антигенов на поверхности Т-хелперов [Okumura e. a., 1976]. Однако Макдевитт с сотрудниками [McDevitt e. a., 1976] и Хеммерлинг с сотрудниками [Hämmerling e. a., 1976] не подтвердили эти результаты.

Помимо перечисленных выше антигенов, на поверхности Т-хелперов выявляется Fc-рецептор [Stout, Herzenberg, 1975]. Т-хелперы заселяют преимущественно лимфоузлы, являются высоко радиорезистентными, рециркулирующими, долгоживущими клетками [Cantor, Asofski, 1972] и чувствительны к обработке малыми дозами антилимфоцитарной сыворотки [Stobo e. a., 1973].

Т-хелперы реагируют на антигены главного комплекса гистосовместимости и в основном на продукты Ia-района. Например, отмечался слабый цитотоксический ответ в MLC при использовании стимулирующих клеток, экспрессирующих антигены, кодируемые только К- и D-районами МНС. Усиление эффекта наблюдалось, когда в систему добавляли посторонние клетки, кодируемые аллогенным I-районом [Bach e. a., 1973, 1977]. Показано, что при индукции аллореактивных Т-киллеров наблюдаются две различные реакции. Стимуляторные клетки, экспрессирующие антигены мпшеней для Т-киллеров, кодируются К- и D-районами МНС, тогда как антигены I-района распознают Т-хелперы, которые, в свою очередь, стимулируют обе субпопуляции Т-клеток [Wagner e. a., 1973; Cantor, Simpson, 1975].

Дифференцировка Т-клеток в аллореактивные Т-киллеры усиливалась добавлением в MLC лимфоцитов Ly-1. Усиления реакции не наблюдалось, если из стимулирующей популяции удаляли клетки, имеющие антигенные детерминанты Ia. Это означает, что усиление определяется клетками Ly-1 и является следствием селективного распознавания I-района.

Первичное антигенное распознавание выражается пролиферацией популяции антигенреактивных клеток. Т-хелперы, отделенные от предшественников эффекторных Т-лимфоцитов, обнаруживают способность к пролиферации, но не к генерации Т-киллеров [Stout e. a., 1976].

Клетки Ly-1 обнаруживают пролиферативный (но не цитотоксический) ответ, сравнимый по величине с ответом неразделенной популяции Т-клеток. Смесь популяций, содержащих клетки Ly-1 и Ly-2,3, продуцирует неполный пролиферативный и цитотоксический ответ. Цитолитическая активность, получаемая при смешении клеток Ly-1 и Ly-2, 3, варьирует и редко достигает уровня неразделенной популяции [Simon, Eichman, 1980].

Впервые в реакции «трансплантат против хозяина» *in vivo* [Cantor, Asofsky, 1972] и в последующем в смешанной культуре лимфоцитов двух доноров *in vitro* [Wagner e. a., 1973; Bach e. a., 1973] показано, что в развитии иммунного ответа, опосредованного Т-лимфоцитами, участвуют разные субпопуляции Т-клеток.

Аллогенные лимфоциты, обработанные ультрафиолетом, ультразвуком или глутаральдегидом, теряют свои стимулирующие свойства. Предполагается, что отсутствие их иммуногенности может быть связано с неспособностью таких аллоантигенов стимулировать Т-хелперные клетки Ly-1. Это предположение подтвердилось при использовании «двухкамерной» культуральной системы, где удалось получить Т-киллеры, культивируя реагирующие Т-клетки с неиммуногенными аллоантигенами в одной камере в присутствии отделенных миллипоровой мембраной и помещенных в другую камеру иммунизированных ранее *in vivo* сингенных облученных спленоцитов [Pilarski, 1977; Baum, Pilarski, 1978]. Как упоминалось выше, антигенспецифические Т-хелперные клетки экспрессируют фенотип Ly-1. Причем специфичность хелперного эффекта, обнаруженного в двухкамерной культуральной системе, заключается в том, что Т-хелперные клетки могут быть рестимулированы только тем антигеном, которым они были предварительно иммунизированы, тогда как действие выделяемого ими медиатора неспецифично. Авторы считают, что «помощь» осуществляется через непроницаемую для клеток мембрану неспецифическим растворимым медиатором, высвобождаемым Т-клетками Ly-1, и что в присутствии этого хелперного фактора предшественники Т-киллеров способны отвечать на неиммуногенные аллоантигены, в частности на фрагменты аллогенных мембран [Wagner e. a., 1980].

Чтобы объяснить взаимодействие двух субпопуляций Т-лимфоцитов при первичной аллогенной стимуляции, предложена двухсигнальная модель, в которой первый сигнал определяет стимулирующий аллоантиген, а второй представляет растворимый медиатор, выделяемый Т-клетками Ly-1 [Wagner e. a., 1973; Bach e. a., 1973; Cantor, Sympton, 1975]. Таким образом, дифференцировка антигенреактивных предшественников Т-киллеров и генерация киллеров зависит от наличия сигналов 1 и 2.

Функционирование растворимого медиатора в качестве второго сигнала при получении Т-киллеров подтверждено многочисленными экспериментальными данными. Впервые Альтман и Коэн [Altman, Cohen, 1975] показали, что выделенная из MLC надосадочная жидкость усиливает *in vitro* стимуляцию мышинных Т-лимфоцитов против аллогенных фибробластов. В последующем хелперный эффект растворимого фактора продемонстрирован при использовании в качестве стимуляторов некоторых линий опухолевых клеток [Lafferty e. a., 1980], лимфоцитов, обработанных глутаральдегидом или ультрафиолетом [Shaw e. a., 1978], или субоптимальных доз Кон А.

При использовании *in vitro* в качестве реагирующих клеток лимфоцитов, не способных генерировать Т-киллеры или обладающих слабой аллореактивностью, в частности спленоцитов бестимусных мышей или клеток тимуса, ответ в MLC значительно усиливалось добавление в систему облученных иммунных клеток.

содержащих сингенные Т-хелперы [Pilarski, 1977], супернатанты из MLC [Taswell e. a., 1979] или Т-клетки, активированные Кон А [Farrar e. a., 1978]. Чтобы выяснить, действительно ли генерация Т-киллеров из тимоцитов зависит от наличия растворимого фактора Т-хелперов, клетки тимуса культивировали в присутствии аллогенных стимуляторных клеток, сингенных спленоцитов, конъюгированных с тринитрофенолом (ТНФ), или сингенных клеток, покрытых вирусом Сендай. Действительно, индукция аллореактивных, или специфичных к ТНФ или вирусу Сендай Т-киллеров осуществлялась только в присутствии растворимого фактора Т-хелперов [Wagner e. a., 1979].

Эти данные подтверждаются экспериментами Лаланде с сотрудниками [Lalande e. a., 1980], которые стимулировали Т-клетки аллоантигеном и через 12 ч удаляли стимуляторные клетки, не пользуясь флюоресцентный клеточный сортер. На этой стадии Т-лимфоциты генерировали цитолитический ответ полной силы, если получали второй сигнал в виде растворимого медиатора Т-хелперов (супернатанта нормальных лимфоцитов, стимулированных Кон А).

Таким образом, в первичном ответе на аллоантигены специфичен только первый сигнал, и эффект второго возможен только после действия первого.

Напротив, для стимуляции вторичного ответа *in vitro* достаточно только второго сигнала. Так, например, перенос надосадочной жидкости из вторичной MLC человека [Uotila e. a., 1978] или мыши [Ryser e. a., 1978] в культуру цитолитически неактивных Т-клеток памяти индуцировал появление вторичных Т-киллеров, обладающих специфической цитолитической активностью.

Аналогичным действием обладает Кон А. Добавление митогена в культуру лимфоцитов, предварительно иммунизированных *in vivo*, индуцировало генерацию вторичных Т-киллеров, специфичных по отношению к аллоантигенам клеток-мишеней, использованных для иммунизации *in vivo* [Bonavida, 1977; Tartof, Fitch, 1977].

Интересно, что клетки памяти можно рестимулировать во вторичной MLC, используя в качестве стимуляторов лимфоциты, антигенные детерминанты которых различаются только по I-району MHC [Alter e. a., 1976].

Таким образом, твердо установлено, что Т-клетки Ly-1 выделяют растворимый медиатор, стимулирующий генерацию Т-киллеров.

При селективном изучении популяции лимфоидных клеток, участвующих в иммунном ответе *in vitro*, оказалось, что удаление пула прилипающих к стеклу или нейлону клеток отменяет реакцию. Неспецифические аксессуарные клетки также вовлечены в MLC. При использовании комбинаций селезеночных стимулирующих клеток и отвечающих клеток лимфоузлов удаление прилипающих клеток после обработки карбонильным железом в популя-

лии стимуляторов или реагирующих клеток не влияло на развитие MLC, тогда как удаление прилипающих клеток из обеих популяций полностью ингибировало реакцию. Такая обработка эффективна только в первые 24 ч культивирования, в последующем удаление прилипающих клеток оказывает незначительное действие на цитолитическую активность киллеров. Когда в качестве стимуляторов были использованы L-клетки или мастоцитома Р-815, потребность в аксессуарных клетках значительно снижалась [Davidson, 1977]. Митогенный эффект Кон А также осуществляется только в присутствии прилипающих клеток.

Эффект прилипающих аксессуарных клеток определяется действием фактора, активирующего лимфоциты [Gery, Handschumacher, 1974].

Результаты ряда независимых исследований показали, что факторы, выделенные у мыши и человека, обладают одинаковыми биологическими свойствами [Wood, 1979]. Факторы, полученные из супернатантов макрофагов человека и мыши или из культур опухолевых линий макрофагов, имеют молекулярную массу около 15 000d [Mize], 1979].

Предложено назвать эти факторы интерлейкинами [Aarden, 1979]. Факторы, выделяемые макрофагами и активирующие лимфоциты, были обозначены как интерлейкин I (ИЛ-I), а факторы, выделяемые активированными популяциями Т-хелперов, обозначены как интерлейкин II (ИЛ-II).

Взаимодействие этих факторов определяет кооперацию субпопуляций Т-лимфоцитов и аксессуарных клеток. Например, в культуре лимфоцитов, лишенных прилипающих клеток и стимулированных Кон А, добавление ИЛ-I усиливает продукцию ИЛ-II [Smith e. a., 1979]. Таким образом, Кон А действует в качестве митогена Т-клеток только в присутствии ИЛ-I.

Когда очищенные от прилипающих клеток спленоциты стимулировали в присутствии или в отсутствии ИЛ-I и ФГА, ИЛ-I сам по себе не вызывал продукции ИЛ-II, ФГА индуцировал минимальный выход ИЛ-II, тогда как комбинация ФГА и ИЛ-I полностью восстанавливала продукцию ИЛ-II [Smith, 1980]. Таким образом, для продукции ИЛ-II требуется два сигнала: связывание мембраны с лектином или антигеном и стимуляторный эффект ИЛ-I.

По мнению Смита с сотрудниками [Smith e. a., 1980], данные о том, что источник аксессуарных клеток — макрофаги, не окончательны. В препарате макрофагов может содержаться небольшая примесь В-лимфоцитов (3—10%), что достаточно для генерации MLC. Кроме того, В-клетки и макрофаги имеют общие поверхностные маркеры — Ia-молекулы и Fc-рецепторы.

Как правило, источником лимфокинов служит супернатант, получаемый из культур мышечных селезеночных клеток, стимулированных Кон А [Sjöberg e. a., 1972]. Супернатанты, обнаруживающие активность Т-хелперов в разных системах *in vitro*, объ-

едивенные в настоящее время общим названием ИЛ-II, сконцентрированы, очищены и подробно изучены. Описаны фактор, способствующий генерации Т-киллеров [KAF], [Orosz, Finke, 1978]; констимулятор [Paetkau e. a., 1976], фактор роста Т-клеток (TCGF) [Gillis e. a., 1978], фактор, заменяющий Т-клетки (TRF) [Watson e. a., 1979], фактор, стимулирующий тимоциты (TSF) [Di Sabato e. a., 1975]. Когда сконцентрированные супернатанты, полученные в культурах мышинных лимфоцитов, стимулированных Кон А, фракционировали методом гель-хроматографии на колонках с сефадексом G-100, оказалось, что фракции, обладающие биологической активностью, имеют молекулярную массу около 30 000—40 000d. Рехроматография пика активной фракции не изменяла профиль элюции [Watson e. a., 1979a—б]. При изучении активных фракций методом изоэлектрического фокусирования получено два больших пика. В области первого пика, имеющего изоэлектрическую точку 4,9, обнаруживаются факторы, которые усиливают рост Т-клеток в культуре, стимулируют митогенный ответ тимоцитов на Кон А или усиливают генерацию Т-киллеров в популяции тимоцитов или спленоцитов бестимусных мышей. В области второго пика с изоэлектрической точкой 4,9 обнаруживается активность фактора, заменяющего Т-лимфоциты (TRF), стимулирующего клетки селезенки бестимусных мышей. По мнению авторов, высокоочищенные фракции, имеющие одинаковый молекулярный вес, хотя и разделяются на два компонента при изоэлектрическом фокусировании, не имеют различий в биологической активности и, очевидно, представляют один класс молекул [Watson, Mochizuki, 1980]. Таким образом, перечисленные выше факторы, обладающие одинаковой биологической активностью и биохимическими свойствами, объединены теперь под общим названием интерлейкин-II.

Хотя биологическая активность ИЛ-II, полученного в культурах стимулированных лимфоцитов человека и крысы, идентична мышинному ИЛ-II, их молекулярные характеристики значительно различаются. Молекулярная масса активной фракции ИЛ-II человека и крысы, полученной методом гель-фильтрации, или ионообменной хроматографии, составляет 15 000d, точка изоэлектрического фокусирования человеческого ИЛ-II — 6,0—6,5, крысиного ИЛ-II — 5,4—5,5 [Gillis e. a., 1980].

Несмотря на то, что перечисленные выше факторы имеют разные биохимические свойства, они обладают одинаковой биологической активностью: человеческий или крысиный ИЛ-II оказывает стимулирующее действие в культуре мышинных лимфоцитов, или наоборот. Очевидно, на поверхности соответствующих клеток-мишеней существуют рецепторы, которые могут связываться с разнородной группой таких молекул.

Интерлейкин-II чувствителен к протеазам [Chen, Di Sabato, 1976; Shaw e. a., 1978a; Huber e. a., 1978], что указывает на присутствие протеинового компонента в составе фактора. ИЛ-II

не задерживается на колонке, покрытой анти-Ia сывороткой, его активность не снижается по сравнению с контрольным образцом [Shaw e. a., 1980]. Отсутствие Ia-антигенов на ИЛ-II соответствует его неспецифическому действию.

Появление ИЛ-II в супернатанте лимфоидных клеток, активированных Кон А, наблюдается уже через 2—4 ч инкубации, а через 8—10 ч культивирования обнаруживается максимальный ответ Т-клеток. Таким образом, продукция ИЛ-II отмечается перед началом синтеза ДНК и не зависит от клеточного деления [Gronvik, Andersson, 1980].

Высказано предположение, что предшественники эффекторных Т-лимфоцитов обладают поверхностными рецепторами, которые связываются с ИЛ-II [Smith e. a., 1979]. Авторы показали, что в присутствии Т-клеток, предварительно активированных аллоантигенами или лектинами, активность ИЛ-II падает, тогда как интактные Т-клетки или спленоциты, стимулированные В-митогеном, не абсорбируют ИЛ-II. Степень абсорбции зависит от времени инкубации и концентрации клеток. Например, спленоциты, активированные Кон А, абсорбировали ИЛ-II в течение 2 ч при 37°C при концентрации 1×10^8 клеток/мл. Лимфоциты, активированные аллоантигеном, абсорбировали ИЛ-II с такой же эффективностью. Активированные В-лимфоциты, фибробласты, клетки фибросаркомы и лейкемические линии не абсорбируют ИЛ-II. Специфичность абсорбции означает, что связывание ИЛ-II должно быть опосредовано рецептором, который появляется только на активированных Т-клетках. Фиксированные глютаральдегидом лимфоциты абсорбировали ИЛ-II с такой же эффективностью, как и не фиксированные, 70—80% активности ИЛ-II можно было восстановить нагреванием клеток в течение часа при 56°C, а это доказывает, что ИЛ-II действительно связывается, а не инактивируется ферментами. Аналогичные данные получили также другие авторы [Coutinho e. a., 1979, Watson, 1979]. Связывание ИЛ-II наблюдалось через 18 ч после стимуляции тимоцитов [Watson, Mochizuki, 1980]. Следовательно, можно предположить, что после взаимодействия с митогеном или антигеном Т-клетки — предшественники киллеров, супрессоров или хелперов — отвечают экспрессией рецептора к ИЛ-II. Таким образом, присутствие ИЛ-II достаточно, чтобы вызвать пролиферацию и дифференцировку активированных Т-клеток.

Суммируя вышесказанное, можно представить следующую двусигнальную модель активации Т-клеток: вследствие антигенного (или митогенного) стимула происходит активация популяции прилипающих клеток, которые высвобождают стимулирующий Т-хелперные клетки фактор ИЛ-I. Одновременно активируются рецепторы на поверхности Т-хелперов, будущих продуцентов ИЛ-II, и рецепторы к ИЛ-II на поверхности предшественников эффекторных Т-лимфоцитов. Т-хелперы воспринимают сигнал в виде ИЛ-I, продуцируют и выделяют ИЛ-II, который абсорбирует-

ся на поверхности предшественников Т-клеток киллеров, хелперов, медиаторов ГЗТ и супрессоров. Следствием такой абсорбции является пролиферация и последующая клональная экспансия Т-клеток.

Помимо ИЛ-II, характеризующегося неспецифическим активирующим Т-клетки действием, эффект которого возможен только после антигенного или митогенного стимула, описано несколько лимфокинов, обладающих специфической активностью [Armerding, Katz, 1974; Yoskowicz e. a., 1978; Delovitch, McDevitt, 1977].

Среди них наиболее интересен и изучен фактор аллогенного эффекта (АЕФ) [Armerding, Katz, 1974]. АЕФ получен *in vitro* во вторичной МЛС после первичной *in vivo* иммунизации тимодитов против антигенов облученных сингенных или полуаллогенных реципиентов.

АЕФ является гликопротеином с молекулярной массой около 45 000d и состоит из двух субъединиц: тяжелой (около 40 000d) и легкой (около 10—12 000d).

Важной особенностью АЕФ является наличие Ia-антигена и β_2 -детерминанты микроглобулина [Armerding e. a., 1975, Katz, 1977]. АЕФ усиливает ответ селезеночных клеток, культивируемых с клетками полусингенной Т-лимфомы [Altman e. a., 1979a], а также с клетками-стимуляторами, идентичными реагирующим клеткам по LD-антигенам [Plate, 1976a, б; Sorori e. a., 1977, 1978, Altman, Katz, 1980], и, что самое важное, индуцирует генерацию Т-киллеров без каких-либо стимуляторов [Altman e. a., 1979a, 1980a, б].

Клетками, которые активирует АЕФ, являются Т-лимфоциты [Altman e. a., 1979a, 1980a]. Способность Т-лимфоцитов генерировать киллеры почти полностью подавлялась анти-Ly-2 сывороткой и только частично — анти-Ly-1 сывороткой [Altman, Katz, 1980]. Эти данные свидетельствуют о способности АЕФ заменять хелперные клетки Ly-1.

Т-киллеры, индуцированные АЕФ, лизируют только сингенные клетки-мишени и отдают явное предпочтение клеткам-мишеням собственного H-2 гаплотипа. Авторы предполагают, что Т-киллеры, индуцированные АЕФ, распознают преимущественно антигенные специфичности, детерминируемые к концом H-2 комплекса. Добавление анти-H2 сыворотки в культуру КМ ингибирует лизис [Altman e. a., 1980б]. АЕФ является митогеном для нестимулированных лимфоцитов и индуцирует пролиферативный ответ такой же силы, как ФГА или Кон А [Altman e. a., 1980a], хотя пик митогенного ответа отмечается позже, на 4—5-е сут. Авторы [Altman, Katz, 1980] считают, что уникальные свойства АЕФ объясняются присутствием Ia-детерминант, которые обеспечивают митогенный эффект Т-клеток и индукцию Т-киллеров. Они высказывают предположение, что АЕФ, несущий Ia-антигены, стимулирует активацию и дифференцировку Т-клеток, реактивных к своим детерминантам H-2К. Такие Т-клетки, самореактивные к Ia,

индуцированные АЕГ, могут служить хелперами, облегчающими индукцию самореактивных Т-киллеров. Возможно, в иммунной системе развиваются присущие ей механизмы самораспознавания, которые являются ее неотъемлемой особенностью и служат средством нормальной клеточной кооперации.

Разработка методики лимитирующего разведения клеток, выделенных из MLC, позволила получить клоны различных субпопуляций эффекторных Т-лимфоцитов и, в частности, клоны Т-хелперов. Суть метода заключается в следующем: облученным реципиентам вводят сингенные тимоциты вместе с эритроцитами барана. Семь дней спустя спленоциты иммунизированных животных культивируют в присутствии эритроцитов барана и облученных сингенных перитонеальных клеток. Через разные интервалы времени в культуру вводят ИЛ-II, в присутствии которого в последующем лимфоциты пролиферируют уже без добавления антигена. Клетки клонируют методом лимитирующего разведения в присутствии ИЛ-II и таким образом получают клоны специфических В-хелперов [Bohmer e. a., 1980].

Эта методика позволяет определить количество клеток-предшественников, специфичных к данному антигену. Пропорции таких клеток, обнаруживающих хелперную активность к эритроцитам барана, составляла 1 : 4000 в популяции клеток мышинной селезенки, через 18 дней культивирования соотношение увеличивалось до 1 : 200 и через 30 дней — до 1 : 10—20 [Watson, 1979]. Таким образом, метод клонирования позволяет получить обогащенную популяцию Т-хелперов или других субклассов Т-лимфоцитов, что расширяет возможности их изучения.

Для роста клеточных линий необходимо постоянное присутствие ИЛ-II в культуральной среде. Кон А или ФГА не стимулируют пролиферацию таких клеток [Watson, Moshizuki, 1980]. Антигенспецифические хелперные факторы в супернатантах клонированных клеток Т-хелперов не обнаруживаются. Эти клетки секретируют неспецифический фактор, который стимулирует иммунный ответ В-клеток и к эритроцитам барана, и к эритроцитам цыпленка. Однако *in vivo* этот неспецифический эффект не наблюдается: когда хелперы, специфичные к эритроцитам барана, вводили вместе с эритроцитами барана и цыпленка бестимусным мышам, у животных индуцировались антитела только к эритроцитам барана [Bohmer e. a., 1980].

Функции и свойства Т-хелперных клеток могут быть изучены с помощью гибридом. Техника получения гибридом успешно развивается. Например, удалось получить клетки лимфомы, обладающие специфической хелперной активностью [Finn e. a., 1979].

Изучение механизмов кооперации и дифференцировки субпопуляций Т-лимфоцитов в иммунном ответе *in vitro* открывает возможности, с помощью которых может быть реализована корректировка дефектных вариантов иммунного ответа *in vivo*. ИЛ-I и

ИЛ-II, полученные *in vitro*, могут быть важным инструментом усиления иммунного ответа *in vivo*.

Например, можно индуцировать генерацию Т-киллеров против иммуногенов, обладающих слабой антигенностью, таких как вирус герпеса [Pfizenmaier *et al.*, 1977] или Ly-антигены [Rollinghoff, 1973]. Инъекция сингенных селезеночных клеток, конъюгированных с гаптенем вместе с ИЛ-II, индуцировала образование лимфоцитов, обладающих специфической цитолитической активностью [Wagner *et al.*, 1980]. Интересно, что при одновременном введении аллогенных лимфоцитов и ИЛ-II удалось получить специфические Т-киллеры у бестимусных мышей (Wagner *et al.*, 1980).

Исследование Т-хелперов, их функций и механизмов действия началось сравнительно недавно и в настоящее время является предметом интенсивного изучения. Можно надеяться, что изложенные выше данные в ближайшее время будут значительно расширены и дополнены.

Т-КИЛЛЕРЫ

Конечным этапом в цепи клеточных взаимодействий, связанных с индукцией иммунного ответа на антигены главного комплекса гистосовместимости, является генерация клона специфических Т-киллеров. Следует ожидать, что степень цитолитической активности генерированных лимфоцитов окажется в прямой зависимости от количества клеток-предшественников, способных к ответу на антигенный стимул.

Макдональд с сотрудниками [McDonald *et al.*, 1980; Ryser, McDonald, 1979a] проанализировали частоту предшественников Т-киллеров, используя лимитирующие количества отвечающих аллореактивных лимфоцитов в присутствии избытка облученных аллогенных стимулирующих клеток и оптимальной концентрации ИЛ-II. В лимфатических узлах нормальных мышей линии C57BL количество предшественников Т-киллеров составляло 1/68, в периферической крови 1/180 и в селезенке 1/399 клеток. Средняя частота предшественников в тимocyтах очень низкая — 1/1634, в костном мозге 1/1231 и в перитонеальном экссудате 1/1224 клетки.

По данным других авторов, частота предшественников Т-киллеров, реагирующих на антигены определенного H-2 гаплотипа, колеблется от 1/800 до 1/3000 для клеток лимфоузлов и в 1,5—3 раза ниже для клеток селезенки [Lindahl, Wilson, 1977; Teh *et al.*, 1977a, б].

Интересно, что в тимусе мышей, обработанных гидрокортизоном, количество предшественников возрастает в 17 раз и не изменяется при аналогичной обработке в селезенке, тогда как введение *in vivo* циклофосфамида селективно редуцирует частоту предшественников в селезенке и не влияет на клетки тимуса [Taswell *et al.*, 1979].

Изучение частоты предшественников Т-киллеров против H-2-рекомбинантных и мутантных аллоантигенов показало, что для неочищенных селезеночных клеток она колеблется от $1/678$ для гаплотипа H-2^b анти H-2^a до $1/1168$ для H-2^b анти H-2^k. Частота предшественников селезеночных клеток мышей C57BL(H-2^b) против трех независимо полученных мутантов (K^{Bg} , K^{Bh} и K^{sg2}) варьирует в пределах частоты, определяемой против двух полностью чужеродных гаплотипов (H-2^d, H-2^k) [Widmer, McDonald, 1980]. Таким образом, авторы показали, что лимитированные генетические и биохимические различия между мутантом и родительской линией являются результатом экспрессии аллоантигенов, распознаваемых предшественниками Т-киллеров на уровне чужеродного H-2-гаплотипа.

Частота предшественников Т-киллеров, реактивных против антигенов, ассоциированных с онкорнавирусами, очень невелика. В среднем для мышей C57BL она составляла $1/7388$ и для мышей BALB/c — $1/11594$ клеток при стимуляции *in vitro* клетками, инфицированными смесью мышинных саркоматозно-лейкемических вирусов. В некоторых случаях опухоли, индуцированные группой этих вирусов *in vivo*, подвергаются спонтанной регрессии. Лимфоциты таких животных, рестимулированные *in vitro* сингенными лимфомными клетками, индуцированными смесью тех же лейкозно-саркоматозных вирусов, обнаруживали высокий уровень специфической цитолитической активности [Plata e. a., 1975; Ryser e. a., 1979б]. Частота предшественников Т-киллеров в селезенках мышей после регрессии опухоли увеличивалась в 10—20 раз.

Выделив предшественники Т-киллеров из дезагрегированных опухолей, авторы обнаружили, что их количество в опухоли в 5—10 раз выше по сравнению с клетками селезенки или лимфоцитами периферической крови. Т-киллеры лизировали сингенные, но не аллогенные клетки-мишени, индуцированные группой лейкозно-саркоматозных вирусов, и только 7% лимфоцитов лизировали одинаково оба типа мишеней [Brunner e. a., 1980].

Для лимфоцитов, которые реагируют на клетки, инфицированные вирусом гриппа, частота предшественников Т-киллеров составляла 2×10^{-5} клеток [Komatsu e. a., 1978], тогда как для лимфоцитов, реагирующих на клетки, конъюгированные с ТНФ, частота предшественников составляла 4×10^{-5} клеток [Teh e. a., 1977а, в]. Важной особенностью этих клеток является способность специфически прикрепляться на поверхности соответствующих клеток-мишеней, что позволяет отделить их от Т-хелперов [Bach e. a., 1973; Cantor, Jandinski, 1974]. Неприкрепившиеся лимфоциты способны пролиферировать в MLC без генерации Т-киллеров [Bach e. a., 1973].

Предшественники Т-киллеров распознают антигены H-2K и H-2D главного локуса гистосовместимости и слабо реагируют на продукты I-района MHC. При иммунизации между линиями, различающимися только по I-району, Т-киллеры практически не

образуются, тогда как пролиферативная активность в MLC сохраняется [Bach e. a., 1973; Schendel, Bach, 1974]. Исключение составляет различие по субрайону I-A, где расположен третий locus гистосовместимости мышей (H-2A). При различии по субрайону I-A показано образование Т-киллеров *in vitro* [Nabholz e. a., 1975; Klein e. a., 1976]. Предшественники Т-киллеров периферической крови человека распознают HLA-A, B, C антигены, тогда как Т-хелперы реагируют на антигены HLA-D. Индукция Т-киллеров не происходит, если HLA-D антигены отсутствуют или инактивированы [Войтенок, 1980; Bach, 1978].

Впервые экспериментами Кантора и Бойза [Cantor, Boyse, 1975a] показано, что на поверхности предшественников Т-киллеров экспрессируются антигены Ly-2, 3. Далее эти авторы показали, что клетки Ly-1, 2, 3 играют существенную роль в генерации Т-киллеров против сингенных клеток-мишеней, конъюгированных с гаптемом [Cantor, Boyse, 1977a].

В последующем продемонстрировано, что генерацию Т-киллеров могут обеспечивать два типа лимфоцитов: клетки Ly-2,3 (особенно эффективно в присутствии субпопуляции Ly-1); неселектированная популяция лимфоцитов, что означает участие клеток Ly-1, 2, 3. Клетки Ly-1, 2, 3 необходимы при формировании цитолитического ответа на аллоантигены, различающиеся по К, D или I-районам, а также на сингенные клетки, модифицированные гаптемом [Simon, Eichman, 1980]. Далее селектированные клетки Ly-2, 3 и неселектированные Т-лимфоциты мышей конгенной линии, различающихся по Ly-2, 3 аллелям, смешивали, стимулировали *in vitro* и получали Т-киллеры. Чувствительность Т-киллеров к анти-Ly сыворотке против каждого из двух аллелей показала, что фактически все цитолитические эффекторные клетки генерировали из предшественников Ly-1, 2, 3. Клетки Ly-2, 3 также были способны продуцировать Т-киллеры против аллоантигенов, но не против сингенных клеток, модифицированных гаптемом. Авторы считают, что клетки Ly-2, 3 способны отвечать на аллоантигены, но не в присутствии субпопуляции клеток Ly-1, 2, 3 [Simon, Eichmann, 1980]. Таким образом, убедительно показано, что Т-клетки с маркерными характеристиками Ly-1, 2, 3 являются источником всех предшественников Т-киллеров.

Эти данные подтверждают также результаты других исследователей. Обработка клеток нормальной селезенки анти-Thy-1, 2 сывороткой и компонентом редуцирует частоту предшественников в 30 — 50 раз, а использование анти-Ly-1 и Ly-2 сывороток приводит к элиминации 86 и соответственно 98% клеток предшественников Т-киллеров [McDonald e. a., 1980]. По мнению авторов, эти клетки принадлежат к субпопуляции лимфоцитов, экспрессирующих и Ly-1, и Ly-2 антигены, что подтверждается также исследованиями Накаямы с сотрудниками [Nakayama e. a., 1979].

Фенотип аллореактивных Т-киллеров — Ly-2, 3, отличается от такового у клеток-предшественников [Kisielow e. a., 1975; Cantor, Boyse, 1975a]. Однако появились сообщения, которые поставили эти данные под сомнение. У реагирующих на аллоантигены линий мышей, имеющих антигены Ly-1, 1 вместо аллеля Ly-1, 2, реактивные цитолитические клетки чувствительны к обработке анти-Ly-1, 1 сывороткой и компонентом [Beverley e. a., 1976]. Высказано предположение, что по крайней мере у определенных линий мышей аллореактивные Т-киллеры могут экспрессировать Ly-1, 2, 3.

Накаяма с сотрудниками [Nakayama e. a., 1979] сообщили, что аллореактивные цитолитические Т-лимфоциты соответственно линии использованных мышей с количественной разницей экспрессируют все три Ly-маркера. В подтверждение этим данным при использовании иммуофлюоресцентного анализа Т-клеток показано, что экспрессия Ly-антигенов является скорее количественным, чем качественным различием [Mathieson e. a., 1979; Ledbetter, Herzenberg, 1979].

Однако цитотоксичность, генерированная в MLC между мутантами H-2^k, элиминировалась анти-Ly-2, но не анти-Ly-1 сывороткой и компонентом [Melief e. a., 1979]. В исследованиях Симона и Эйхмана [Simon, Eichman, 1980] все Т-киллеры (соответственно их реактивности на аллоантигены, малые H-антигены, к вирусу или гаптену) полностью удалялись анти-Ly-2 и анти-Ly-3 сывороткой, но не однократной обработкой анти-Ly-1 сывороткой и компонентом. Чувствительность к анти-Ly-1 сыворотке обнаруживалась только после второй обработки. Авторы полагают, что клетки-предшественники с маркерами Ly-1, 2, 3 дифференцируются в эффекторные цитолитические Т-лимфоциты, экспрессирующие Ly-2, 3 антигены, тогда как содержание антигена Ly-1 изменяется скорее количественно, чем качественно.

Кроме Θ -антигена и Ly-маркеров некоторое количество Т-киллеров имеют Ia-антигены [Plate e. a., 1976] и содержат рецепторы к Fc-фрагменту иммуноглобулина [Rubin, Hertel-Wulf, 1974; Slout e. a., 1976].

Следствием первичного антигенного распознавания является трансформация реагирующих лимфоцитов в бласты и нарастание синтеза ДНК, который определяется по включению ³H-тимидина. Использование техники тимидинового самоубийства (добавление в инкубационную среду больших доз ³H-тимидина с высокой удельной активностью) в течение второго — четвертого дней культивирования ингибирует генерацию киллеров в MLC, тогда как в первый и пятый день культивирования такая обработка неэффективна. Удаление предшественников методом адсорбции на соответствующем монослое и добавление лимфоцитов, подвергнутых тимидиновому самоубийству на второй день MLC, также ингибирует образование киллеров при сохранении пролиферативной реакции в MLC [McDonald e. a., 1973; Cantor, Jandinski, 1974]. Образова-

ния киллеров не происходит, если пролиферирующие клетки обработаны оксимочевинной [Nedrud e. a., 1975], бромдезоксипуридином и светом [Clark, Nedrud, 1974] или облучением [Teh e. a., 1977].

По данным разных авторов, предшественники киллеров делятся до 3—4 раз в течение пяти дней MLC [Lindahl, Wilson, 1977] и до 10 раз, по данным Те с сотрудниками [Teh e. a., 1977], но для генерации киллеров необходим как минимум один полный пролиферативный цикл [Nedrud e. a., 1975].

Методом лимитирующего разведения клеток, взятых из MLC, показано, что количество предшественников пролиферирующих Т-клеток примерно вдвое выше пролиферирующих предшественников Т-киллеров [Ryser, McDonald, 1979a].

Интересный аспект исследования Т-киллера представляет получение клонов этих клеток.

Клоны мышинных Т-киллеров можно получить после стимуляции *in vitro* клетками, различающимися по МНС [Nabholz e. a., 1978; Baker e. a., 1979; Glaserbrook, Fitch, 1979], малым антигенам гистосовместимости [Boehemer e. a., 1979], опухолеспецифическим антигенам [Baker e. a., 1979] или сингенным клеткам, сцепленными с гаптенем. Как правило, цитолитическая активность Y-специфических и гаптен-специфических линий рестриктирована по МНС иммунизирующих клеток [Michael, 1980].

Как упоминалось выше, для клонирования субпопуляций Т-лимфоцитов используется методика лимитирующего разведения. Клетки пятого дня MLC культивируют в мультилучных микропластинах в присутствии сингенных облученных прилипающих клеток и ИЛ-II. Эффективность клонирования колеблется в пределах 30—100% [Boehemer e. a., 1980]. Постоянное присутствие в культуральной среде ИЛ-II необходимо, так как клетки растут непрерывно. Удаление из среды ИЛ-II вызывает гибель клона. Стимуляция Кон А, ФГА или соответствующими стимуляторными клетками не замещают эффекта ИЛ-II [Nabholz e. a., 1980].

Цитолитическая активность различных клонов сильно варьирует. 50%-ный лизис КМ может быть получен при соотношении 0,3 : 1 [Glaserbrook, Fitch, 1979], 3 : 1 [Boehemer e. a., 1979], 20 : 1 [Schreiger e. a., 1980] или 100 : 1 [Baker e. a., 1979; Nabholz e. a., 1978]. Чтобы выяснить, чем объясняется низкая литическая активность некоторых клонов, клетки этих линий субклонировали. Как оказалось, более 95% субклонов обнаруживали ту же сравнительно низкую активность оригинального клона [Boehemer e. a., 1979]. Однако в определенных случаях при длительном культивировании некоторых клонов наблюдается снижение литической активности, которое при последующем субклонировании обнаружило появление негативных субклонов [Schreiger e. a., 1980]. Таким образом, при длительном культивировании определенных клонов возможна контаминация клетками, которые потеряли способность лизировать, и субклонирование с опреде-

ленными интервалами времени позволяет поддерживать линии со сравнительно постоянной функциональной активностью.

Через 1—2 мес культивирования в среде, содержащей ИЛ-II, различные линии Т-киллеров, которые исходно были стимулированы и культивированы параллельно, обнаруживают индивидуальные особенности, которые могут отражать определенную гетерогенность пула нормальных Т-киллеров, а также селективный рост различных типов клеток. Отмечаются гетерогенность морфологических характеристик и раннее проявление кариотипических аномалий [Nabholz e. a., 1978]. Кариотипический анализ выявил большое число хромосомных нарушений. Обнаружены линии с тетраплоидным набором хромосом. Большинство клеток имеют вид лимфобластов с многочисленными вакуолями в цитоплазме. Клетки имеют иррегулярную форму с выступающими отростками и характеризуются большой подвижностью на пластине и в жидком агаре [Gillis, Smith, 1977; McDonald e. a., 1980]. Как правило, большинство клонов Т-киллеров сохраняют свою специфичность по отношению к H-2-гаплотипу КМ, которым была стимулирована исходная культура в MLC. Однако некоторое количество клонов могут быть перекрестно реактивны и несколько процентов могут обладать гетеролитической активностью. Стабильность фенотипа таких клонов исследовалась после реклонирования. Как оказалось, после субклонирования индивидуальные клоны сохраняли свой фенотип [Taswell e. a., 1979].

По мере культивирования специфичность клонов Т-киллеров изменяется [Gillis, Smith, 1977; Nabholz e. a., 1978; Dennert, 1979]. Примерно через 3 мес после переноса в среду с ИЛ-II обнаруживались широкие колебания активности [Nabholz e. a., 1979]. При последовательном субклонировании одной из изучаемых линий (DA-7) авторы обнаружили резкие изменения специфичности. Сначала клетки исследуемого субклона лизировали только опухолевые КМ, к которым были исходно специфичны, затем обнаружили повышенную активность против некоторых «несоответствующих» линий. С одинаковой эффективностью они лизировали лимфобласты, стимулированные ЛПС, макрофаги, соответствующие, посторонние или сингенные КМ. Аналогичные результаты получены другими авторами [Baker e. a., 1979]. По данным Набхольца с сотрудниками [Nabholz e. a., 1979], скрининг нескольких сотен субклонов показал, что частота неактивных вариантов не превышает нескольких процентов.

Маркерные характеристики клонов Т-киллеров соответствуют фенотипу цитолитических Т-лимфоцитов. Антигены Ly-1 не найдены. Показана экспрессия Ly-2 и Ly-3 [Nabholz e. a., 1979]. Моноклональные крысиные анти-Ly-2 антитела [Ledbetter, Herzenberg, 1979] одинаково ингибируют цитолитический эффект нормальных Т-киллеров и клеточных линий В6. 1 и ВD-2, 118, тогда как анти-Ly-1 или анти Thy-1, 2 моноклональные антитела не оказывают ингибиторного эффекта [Nabholz e. a., 1980]. Авторы

предполагают, что молекула (ы), несущая антигенные детерминанты Ly-2 и Ly-3, может принимать участие в цепи событий, ведущих к цитоллизу КМ.

Аллоореактивные клоны Т-клеток являются успешным инструментом для изучения функции, механизма действия и специфичности нормальных Т-киллеров.

Недавно удалось получить гибридомы, индуцированные слиянием цитолитических Т-лимфоцитов и клеток лимфомы BW5147 [Kaufmann e. a., 1981]. Авторы получили четыре цитолитически активных гибридомы, которые были клонированы и субклонированы. Клоны гибридов, культивированные *in vitro* свыше 6 мес без какой-либо стимуляции (введения антигена, или интерлейкина), обнаруживают строгую специфическую цитолитическую противоопухолевую активность, что открывает новые перспективы в изучении механизма действия и природы рецепторов Т-киллеров.

Т-СУПРЕССОРЫ

Предшественники Т-клеток, характеризующихся супрессорной активностью, подобно предшественникам Т-киллеров, экспрессируют Ly-1, 2, 3-антигены, тогда как специфические супрессорные клетки имеют антигенные маркеры Ly-2, 3 [Simon, Eichman, 1980]. Когда в первый день MLC в культуру вносили облученные клетки, за три дня до этого стимулированные тем же аллоантигеном, специфическая супрессия Т-киллеров наблюдалась на четвертый день MLC. Было показано, что супрессивный эффект одинаково хорошо переносится неселектированными Т-клетками или эквивалентным количеством лимфоцитов, имеющих антигенные маркеры Ly-2, 3, но не Ly-1. Супрессия строго специфична и не может быть получена, если добавлены Т-клетки, стимулированные несоответствующим аллоантигеном.

Ly-фенотип неспецифических или естественных супрессорных клеток, участвующих в регуляции гуморального или клеточного иммунного ответа, идентичен таковому специфических Т-супрессоров [Jandinski e. a., 1976].

В отличие от Т-хелперов, Ia-детерминанты которых кодируются субрайоном I-A, супрессоры несут продукт субрайона I-J [Okumura e. a., 1976].

Как показали Брондз с сотрудниками [Брондз и др., 1981], специфические Т-супрессоры, иммунные к H-2-антигенам, несут два маркера — IJ и IC, представленные на одной клетке и выполняющие разные функции. Экранировка IC-продукта соответствующими антителами на поверхности Т-супрессора предотвращает супрессию, для развития которой необходима гомология по IC-району между Т-супрессором и реагирующим лимфоцитом.

Вместе с тем определенная часть неспецифических Т-супрессоров имеет рецепторы к Fc-фрагменту иммуноглобулина [Frid-

man e. a., 1977]. Т-клетки человека с рецептором к Fc-фрагменту IgG обозначены как T_{γ} и с рецептором к Fc-фрагменту IgM — как T_{μ} клетки [Moretta e. a., 1975]. Т-супрессоры человека или мыши можно индуцировать длительным культивированием в кондиционной среде [Masa e. a., 1979], получить через 48 ч культивирования после стимуляции *in vitro* большой дозой ФГА или Кон А [Birnbau, Swieck, 1978], на третий — четвертый день в MLC или стимуляцией *in vitro* малой дозой антигена при увеличении срока инкубации [Heijnen e. a., 1979]. Супрессоры рано (примерно на вторые сутки) возникают в MLC и *in vivo* после иммунизации мышей и крыс живыми клетками сингенными [Eggers, Wunderlich, 1976], аллогенными [Argyris, Horowitz, 1976], опухолевыми или лимфоидными [Rich, Rich, 1974; Cooley, 1978].

По-видимому, для генерации Т-супрессоров не нужна помощь клеток амплификаторов, так как эти клетки образуются в таких условиях культивирования, при которых Т-киллеры не обнаруживаются. Например, Т-супрессоры появляются при использовании незрелых (кортикальных) тимоцитов в качестве реагирующих клеток [Eisenthal e. a., 1977] в монокультуре [Hodes, Heathok, 1976] или при использовании клеток, убитых нагреванием в качестве стимуляторов [Sondel e. a., 1977].

Т-супрессоры подавляют пролиферацию В-лимфоцитов и препятствуют их дифференцировке в антителосинтезирующие клетки [Hayward e. a., 1978; Lipski e. a., 1978], ингибируют реакции клеточного иммунитета, подавляя образование Т—Т-хелперов [Gershon e. a., 1973]. Т-супрессоры ингибируют генерацию Т-киллеров *in vivo* и *in vitro* [Hodes, Heathok, 1976; Hirano, Nordin, 1976], а также появление эффекторов ГЗТ [Neta, Salvin, 1973].

Т-супрессоры представляют субпопуляцию короткоживущих тимусзависимых клеток [Брондз, Рохлин, 1978]. Тимэктомия взрослых животных приводит к избирательному угнетению образования Н-2-специфических Т-супрессоров. По мнению авторов, это объясняется тем, что предшественники Т-супрессоров являются короткоживущими Т-клетками, которые постоянно выселяются из тимуса взрослых животных или предшественники которых образуются в тимусе и потом заселяют селезенку.

Т-супрессоры обнаруживаются преимущественно в селезенке [Gershon e. a., 1974], показано, что эти клетки мигрируют в селезенку после их индукции адьювантом Фрейнда [Reinisch e. a., 1977].

Различаются специфические и неспецифические, или естественные, Т-супрессоры. Последние характеризуются высокой радиочувствительностью [Kishimoto e. a., 1979], инактивируются митомцином С [Moriya e. a., 1979] и гидрокортизоном *in vitro* и *in vivo* [Haynes, Fauci, 1979; Haynes e. a., 1979]. Однако в зависимости от условий индукции, природы ингибируемых клеток, степени иммунной специфичности Т-супрессоры неоднородны. Они могут быть резистентны или чувствительны к облучению, дей-

ствию митомицина С или гидрокортизона [Брондз, Рохлин, 1978].

Результатом избирательной инактивации Т-супрессоров является усиление пролиферативной и цитолитической активности в MLC [Wolos, Davey, 1979]. Неспецифические Т-супрессоры, обнаруживаемые в ранние сроки MLC, угнетают пролиферативный ответ в свежей MLC, стимулированной посторонними аллоантигенами [Hirshberg, Thorsby, 1977].

Действие неспецифических Т-супрессоров не лимитировано антигенами MHC Т-клеток, функцию которых они угнетают, тогда как действие специфических Т-супрессоров распространяется только на Т-клетки, которые экспрессируют детерминанты стимулирующего антигена.

Как показали Брондз с сотрудниками [Broncz et al., 1980], величина супрессии синтеза ДНК при различиях по всему гаплотипу H-2 составляет 60—65% независимо от иммунизирующей системы: d анти-b, b анти-d, a анти-b или K анти-d. Эта величина была одинаковой при использовании конгенных по H-2 и неконгенных линий мышей. Клетки мышей линии B6 и B10, идентичные по H-2 комплексу, но различающиеся минорными H-антигенами, оказались взаимозаменяемыми при индукции и реализации Т-супрессоров.

При изучении вопроса о том, продукты каких именно участков MHC индуцируют образование Т-супрессоров и реагируют с ними, было установлено, что только различия по К-концу комплекса H-2 индуцируют такую же степень супрессии, как и по всему комплексу H-2. При различиях только по D-концу величина индекса ингибции снижается вдвое. Различий только по I-району (IJ + IE + IC) и S-району также оказалось достаточно для индукции 40—45%-ной супрессии, несмотря на идентичность районов K/D и субрайонов IA/IB. Таким образом, продукты каждого из районов K, I и D, а также отдельных субрайонов I-района индуцируют образование специфических Т-супрессоров. Продукты локуса MLC не индуцировали образование специфических Т-супрессоров. Вторым условием для реализации активности Т-супрессоров является их совпадение с реагирующими лимфоцитами по субрайону I—С-комплекса H-2 (интеракционная рестрикция функции супрессоров).

С помощью метода адсорбции специфических Т-супрессоров на монослое клеток-мишеней различных гаплотипов и последующей элюции проназой на поверхности таких клеток обнаружены рецепторы, специфичные к антигенам H-2. Такой метод позволяет избирательно удалять из популяции и концентрировать Т-супрессоры, иммунные к определенному антигену H-2. С помощью этого метода установлено, что Т-супрессоры, иммунные к комплексу H-2, представляют собой набор клонов, специфичных к отдельным продуктам этого комплекса, в том числе к отдельным детерминантам антигенов H-2 [Брондз и др., 1979].

Специфические Т-супрессоры способны индуцировать неспецифическую супрессию, но при условии, что соответствующий и посторонний антигены локализованы на одном стимуляторе [Брондз и др., 1980].

Высказано предположение, что в иммунном ответе, где взаимодействуют субпопуляции Т-лимфоцитов, В-клеток и макрофагов, растворимые медиаторы являются факторами, действующими как сигналы между клетками, которые их продуцируют, и отвечающими клетками, которые имеют соответствующие рецепторы для таких сигналов [Katz, 1977]. Растворимые иммунорегуляторные факторы могут быть индуцированы стимуляцией гетерологичными антигенами, аллоантигенами или митогенами *in vivo* и *in vitro*.

Иммунорегуляторные факторы, продуцируемые соответствующими Т-супрессорами, подразделяются на антигенспецифические и неспецифические. Неспецифические факторы могут быть продуцированы в ответ на специфические антигенные стимулы, аллоантигены или митогены.

Растворимый супрессорный фактор иммунного ответа — типичный представитель группы неспецифических супрессорных факторов [Pierce, Tadkuma, 1976], продуцируется клетками селезенки, экспрессирующими Ly-2, 3-антигены, стимулированными Кон А. Это гликопротеин с молекулярной массой 48—67 000 d, который подавляет *in vitro* функцию В-клеток [Gresser, 1977].

Неспецифические факторы, полученные после однократной стимуляции аллоантигеном или митогеном *in vitro*, не содержат Ia-детерминант, тогда как иммунизация аллоантигенами *in vivo* и повторная стимуляция *in vitro* приводит к накоплению популяции Ia-позитивных Т-клеток. Результатом такой селекции является увеличение пропорции Ia-позитивных молекул в культуральной среде, содержащей медиаторы [Altman, Katz, 1980]. Неспецифический супрессорный фактор (СФ), подавляющий пролиферацию в MLC [Rich e. a., 1977, 1979], и фактор, связывающий иммуноглобулин (ИСФ) [Gisler, Fridman, 1976], содержат антигенные детерминанты, кодируемые районом I.

Высказано предположение, что при формировании иммунного ответа могут взаимодействовать антигенспецифические и неспецифические факторы. В результате стимуляции Т-клеток специфическим антигеном образуются и специфический, и неспецифический факторы [Tada e. a., 1977; Takatsu e. a., 1980; Taniguchi, Tokuhisa, 1980].

Антигенспецифические факторы могут быть получены только после стимуляции специфическим антигеном, могут быть селективно абсорбированы на колонках сефарозы, покрытых соответствующим антигеном, кодируются антигенными детерминантами I-района и имеют молекулярную массу 40 000—50 000 d [Altman, Katz, 1980]. Однако несмотря на то, что все антигенспецифические факторы имеют Ia-детерминанты, их действие проявляется, как правило, по отношению к аллогенным КМ, т. е. не рестриктировано

по МНС [Karr e. a., 1976; Kontianen, Feldman, 1977; Levy e. a., 1979].

Предполагается, что рестрикция по МНС отражает взаимодействия между детерминантами МНС самих факторов и акцепторов клеток-мишеней. Предварительная обработка КМ анти-IJ-антителами блокировала акцепторные участки лимитированного по МНС супрессорного фактора, специфичного к гемоцианину [Taniguchi, Tokuhisa, 1980].

При изучении Т-супрессорных клеток и их растворимых продуктов стало ясно, что ни сами клетки, ни их растворимые продукты не действуют прямо на антителопродуцирующие В-лимфоциты или эффекторские Т-клетки, но инициируют действие других клеток, среди которых имеются индукторы, акцепторы и эффекторы супрессии [Tada e. a., 1977; Eardley e. a., 1978]. Клетки-индукторы, секретирующие антигенспецифические факторы, обозначены T_{c_1} , клетки, эффекторы супрессии обозначены T_{c_2} [Tada e. a., 1977]. Добавление СФ, содержащего IJ, гемоцианину продуцируемого клетками T_{c_1} Lu — 2,3, в смесь В-лимфоцитов, стимулированных динитрофенолом и очищенных на нейлоновой вате Т-клеток, стимулированных гемоцианином, не подавляло вторичный ответ *in vitro* при стимуляции динитрофенолом и гемоцианином. Добавление небольшого количества стимулированных гемоцианином прилипающих к нейлоновой вате IJ Т-клеток с фенотипом Lu-1, 2, 3 восстанавливало супрессию. По-видимому, прилипающие к нейлоновой вате Т-клетки представляют собой акцепторы СФ, клетки T_{c_2} . В противоположность клеткам T_{c_1} , T_{c_2} не рестриктированы по МНС и могут подавлять ответ антител на тринитрофенол, связанный с несоответствующим носителем (овальбумином). Таким образом, стимуляция супрессорных клеток специфическим антигеном ведет к проявлению неспецифической супрессии [Tada e. a., 1977; Taniguchi, Tokuhisa, 1980]. Однако существуют данные о том, что клетки T_{c_2} специфически подавляют ответ антителозависимых В-лимфоцитов [Germain e. a., 1978].

Был продемонстрирован также двухэтапный механизм супрессии реакции на синтетические полипептиды [Germain, Benasergaf, 1978]. Активность антигенспецифического СФ в этих системах не рестриктирована по МНС.

Возможен перенос антигенспецифической супрессии на нормальных сингенных мышей: СФ, синтезируемый клетками T_{c_1} мышей BALB/c, способен индуцировать активность клеток T_{c_2} у мышей A/J [Germain e. a., 1979]. Опухолеспецифический СФ может индуцировать популяцию новых супрессорных клеток, очевидно T_{c_2} у нормальных мышей, что приводит к усилению роста опухоли у иммунизированных мышей [Perry e. a., 1978]. Недавно обнаружено существование двух различных антигенспецифических СФ, регулирующих ответ антител на один и тот

же гаптен. Как оказалось, эти СФ экспрессируют соответственно идиотипическую и антиидиотипическую детерминанты, имеют молекулярную массу 50—100 000 d и экспрессируют детерминанты МНС [Hirai, Nisonoff, 1980]. Эти данные позволяют предположить, что фактор СФ₂ секретируют клетки Т_{с2}, обладающие антиидиотипическими детерминантами. СФ может стимулировать также макрофаги, которые активируются после контакта с фактором [Larsson, Blomgren, 1979]. Предполагается, что активация макрофагов связана с усилением синтеза простагландина Е (ПГЕ₂), который подавляет пролиферацию Т-клеток, стимулируя синтез цАМФ [Ellner, Spagnuolo, 1979].

При тщательном анализе факторов, выделяемых из надосадочной жидкости стимулированных тем или иным способом лимфоидных клеток, оказалось, что они обнаруживают различную биологическую активность. Неочищенные препараты АЕФ и IBF могут содержать смесь супрессивной и стимуляторной активности и различаться только сравнительно большим количеством того или иного фактора. Увеличение пропорции супрессорного материала обнаруживает активность IBF, тогда как баланс в сторону стимуляторного материала определяет преимущественную активность АЕФ [Altman, Katz, 1980].

Активность супрессоров в иммунном ответе включается по принципу обратной связи. Т-хелперы посредством растворимого медиатора активируют Т-супрессоры, которые, в свою очередь, подавляют активность Т-хелперов [Eardley e. a., 1978].

В случае нарушения супрессии обратной связи при повышенной активности Т-хелперов появляется возможность возникновения аутоиммунного заболевания, и наоборот, результатом иммуносупрессии может быть возникновение опухоли.

Т-супрессоры способствуют росту сингенной саркомы, подавляя развитие естественного противоопухолевого иммунитета [Fujimoto e. a., 1976]. В сыворотке мышей-опухоленосителей обнаружены гуморальные медиаторы, возникающие в процессе роста сингенной опухоли и обладающие супрессорной активностью [McMaster e. a., 1977].

* *

*

Сложные взаимоотношения между субпопуляциями Т-лимфоцитов, их координация в иммунном ответе определяют его последующую реализацию. Иммунологическое распознавание, кооперации предшественников эффекторных лимфоцитов и Т-хелперов, генерация эффекторных клеток, реализация их действия и последующая супрессия определяют эффективность иммунологической реакции. Нарушение в каком-либо из звеньев этой цепи влечет за собой возникновение патологических состояний, связанных с аутоиммунными заболеваниями или, наоборот, с иммунодепрес-

сней. Возможность коррекции иммунологических реакций открывает перспективы в лечении заболеваний, связанных с нарушениями иммунной системы и, в частности, в лечении опухолевых заболеваний.

Конечным звеном в цепи событий, сопровождающих ответ иммунной системы на антиген, является образование эффекторных клеток. Это могут быть плазматические клетки, синтезирующие моноклиальные иммуноглобулины, эффекторы ГЗТ или Т-киллеры. Сфера деятельности Т-киллеров распространяется на удаление чужих клеток, или своих клеток с измененными аллоантигенами. Такими клетками в организме являются прежде всего клетки, зараженные вирусом, и опухолевые клетки. Механизм действия Т-киллера на трансплантированную или собственную с модифицированной поверхностью клетку-мишень неизвестен и в настоящее время интенсивно изучается. Показано, что цитолитическое действие Т-киллера осуществляется только при непосредственном контакте с клеткой-мишенью. Относительно механизма цитолитического действия Т-киллера высказывается ряд предположений, а также существуют многочисленные экспериментальные данные, которые будут подробно изложены и обсуждены в следующей главе.

Г л а в а II

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ Т-КИЛЛЕРОВ С СИНГЕННЫМИ И АЛЛОГЕННЫМИ ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ-МИШЕНЯМИ

На плазматической мембране цитолитических Т-лимфоцитов расположены генетически детерминированные рецепторы, посредством которых лимфоциты распознают соответствующую клетку-мишень и связываются с ее поверхностью. Впервые экспериментами Б. Д. Брондза продемонстрировано, что Т-киллеры, направленные против Н-2-антигенов, избирательно прикрепляются к монослою макрофагов, полученных от определенных линий мышей, тогда как неприкрепившиеся лимфоциты не способны лизировать клетки-мишени, использованные для адсорбции [Brondz, 1968]. Далее Б. Д. Брондз с сотрудниками показали, что адсорбция Т-киллеров на клетках-мишенях и их цитолитический эффект имеют одну и ту же иммунологическую специфичность. Большая часть лимфоцитов мышей линии А, иммунизированных клетками линии В, не адсорбируется на поверхности клеток-мишеней, С, D, Е и других, содержащих лишь отдельные «общие» специфичности иммунизирующего антигена Н-2. При использовании мышей рекомбинантных линий по отдельным субрайонам МНС установле-

но, что перекрестная реактивность Т-киллеров по отношению к клеткам-мишеням третьих линий возможна только в том случае, когда КМ имеют H-2 специфичности, аналогичные стимулирующим клеткам. В смеси двух посторонних линий клеток-мишеней, несущих H-2D или H-2K антигены стимулирующего комплекса, наблюдается 100%-ная адсорбция Т-киллеров и суммирование цитолитического эффекта [Broncz, Snegiröva, 1971].

Применение проназы для элюции лимфоцитов позволило получить популяцию клеток, в 6—8 раз обогащенную Т-киллерами, специфически реагирующими с определенными H-2-антигенами.

Предшественники Т-киллеров обладают слабой способностью адсорбироваться на поверхности клеток-мишеней [Bach e. a., 1973; Bonavida, Kedar, 1974]. Эта способность возникает в лимфоцитах по мере их дифференцировки в киллеры одновременно с нарастанием цитолитической активности [Kimura, Clark, 1974]. Рецепторы Т-киллеров распознают преимущественно частные специфичности комплекса H-2 или сцепленные с ними серологически молчащие детерминанты, содержащиеся в молекулах антигенов H-2K или H-2D, но не общие специфичности тех же молекул, определяемых серологически [Forman, Möller, 1974]. В собственном организме Т-киллеры реагируют с чужеродными антигенами только при условии их ассоциации с антигенами H-2K или H-2D собственных клеток-мишеней. Например, Т-киллеры, индуцированные вирусами саркомы и лейкоза Молони [Plata e. a., 1976], вирусом лейкоза Френд [Blank e. a., 1976], вирусом SV40 [Maki, Howe, 1976], реагируют с сингенными опухолевыми клетками-мишенями, несущими на своей поверхности вирусные детерминанты.

Вопрос об обязательном участии H-2-антигенов клеток-мишеней в стимуляции иммунного ответа, опосредованного Т-киллерами, подробно обсуждается в работе Б. Д. Брондза и О. В. Рохлина (1978). В ней изложены современные факты и концепции, касающиеся природы и формирования рецепторов Т-лимфоцитов. Высказывается предположение, что под действием антигена структура рецептора Т-лимфоцитов качественно изменяется и формируется в ходе их дифференцировки.

ЦИТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ Т-КИЛЛЕРОВ И КЛЕТОК-МИШЕНЕЙ

Еще в первых исследованиях при изучении взаимодействия иммунных лимфоцитов и клеток-мишеней, где клетки грудного протока, регионарных лимфоузлов или селезенки специфически иммунизированных животных добавляли к монослойным культурам КМ, через несколько часов инкубации можно было видеть лимфоциты, которые концентрировались вокруг и на поверхности этих клеток [Rosenau, 1963; Wilson, 1963]. В течение 6—10 ч

инкубации морфологический состав популяции клеток иммунных лимфатических узлов меняется: пропорция малых лимфоцитов уменьшается и возрастает пропорция средних и больших лимфоцитов, что сочетается с увеличением доли клеток, меченных ^3H -уридином и ^3H -тимидином. Эти изменения отсутствуют или слабо выражены в нормальных лимфоцитах, или в иммунных лимфоцитах, адсорбированных на «посторонних» клетках-мишенях [Брондз и др., 1972]. Мы описали цитоплазматические мостики, представляющие собой цитоплазму лимфоцита, вытянутую в сторону клетки-мишени (так называемая уропода). Цитоплазматические мостики характеризуются пиронинофилией и интенсивно метятся ^3H -уридином и ^3H -лейцином [Suga e. a., 1967]. При электронномикроскопическом исследовании на таких препаратах в зоне контакта уроподы лимфоцита с клеткой-мишенью видны многочисленные микроворсинки и цитоплазматические выросты, вдавливающиеся в цитоплазму клетки-мишени [Сура и др., 1970]. На ранних стадиях иммунного ответа и, в частности, при иммунизации *in vitro* эффекторными клетками являются большие пиронинофильные лимфоциты [Ginsburg, 1968; Berke e. a., 1969], тогда как на поздних стадиях преобладают малые и средние лимфоциты [Shortman e. a., 1972].

Использование клеток иммунной селезенки или лимфоузлов для морфологических исследований неэффективно, так как процент Т-киллеров в популяции таких клеток невысок. Удобную модель представляют лимфоциты перитонеального экссудата мышей, внутрибрюшинно иммунизированных опухолевыми клетками. После отторжения опухолевого аллотрансплантата в перитонеальном экссудате содержится значительное количество Т-киллеров, обладающих высокой цитолитической активностью. В перитонеальном экссудате иммунизированных опухолевыми клетками мышей описано два типа Т-клеток. Темные клетки с большим количеством рибосом, плотной сетью филаментов и сравнительно большим количеством вакуолей, митохондрий, эндоплазматического ретикулума и гранул. Темные лимфоциты составляют меньшую популяцию клеток на 11-й день после введения опухоли. В бледных клетках меньше рибосом: слабо развит эндоплазматический ретикулум, меньше гранул по сравнению с темными клетками [Matter, 1974]. Представлены данные, доказывающие, что бледные клетки являются цитотоксическими, тогда как цитологическая активность темных клеток минимальна [Matter, Simpson, 1976]. Такие лимфоциты, смешанные с соответствующими опухолевыми клетками, образуют с ними прочные конъюгаты [Berke e. a., 1972]. Конъюгаты состоят главным образом из пар клеток, хотя иногда один, два или более лимфоцитов могут быть адсорбированы на одной клетке-мишени, или две-три клетки-мишени могут быть сцеплены с одним лимфоцитом [Zagury e. a., 1975].

Интересные наблюдения литического процесса получены при использовании фазово-контрастной микроскопии отдельных конъю-

готов лимфоцит — клетка-мишень, помещенных в платы Тера-саки и инкубированных при 37°C. В некоторых конъюгатах лизис КМ наступал через несколько минут, тогда как другим клеткам потребовалось около 2 ч. Лизировалась большая часть КМ, следовательно, конъюгаты образуют именно Т-киллеры. Когда отдельные лимфоциты, убившие свою КМ, помещали в контакт с новой клеткой-мишенью, лимфоциты связывались с новыми КМ и лизировали их. В некоторых случаях такой рециклинг наблюдался до 3—9 раз [Zagury e. a., 1975]. Последовательный киллинг на монослое аллогенных клеток-мишеней продемонстрирован также с использованием цейтраферной микрокиносъемки. Подвижный активный лимфоцит вступает в интимный контакт с девятью или более клетками-мишенями. Однако не все клетки-мишени после этого погибают. Какой-либо связи между продолжительностью взаимодействия Т-киллера и клеток-мишеней с количеством контактов и последующей их гибелью не замечено [Rothstein e. a., 1978].

Т-киллеры перитонеального экссудата, выделенные на 11-й день после внутрибрюшинной иммунизации аллогенными опухолевыми клетками, представляют собой однородную популяцию малых лимфоцитов. Ядро обычно имеет вырезку, заметно большое ядрышко. Ядро окружает узкий ободок цитоплазмы с гроздьями рибосом, но фактически без гладкого эндоплазматического ретикулума. Аппарат Гольджи хорошо развит и часто расположен вблизи вырезки ядра. Видны также темные лизосомоподобные гранулы, ограниченные однослойной мембраной. Использование непрямого иммунопероксидазного метода обнаруживает Θ -антиген на лимфоцитах, обработанных анти- Θ сывороткой. Ультраструктура Т-киллеров при контакте с клеткой-мишенью не изменяется, слияние мембран в зоне контакта не обнаруживается [Zagury e. a., 1975].

В зоне контакта Т-киллера и клетки-мишени выявляется активность кислой фосфатазы [Thiernesse e. a., 1977], а при использовании метода криоскалывания показано слияние внутрицитоплазматических пузырьков с мембраной Т-лимфоцита и выход во внеклеточное пространство. По мнению авторов, эти пузырьки соответствуют описанным ранее лизосомам, тестируемым по активности кислой фосфатазы. В межклеточном пространстве наблюдаются отпечатки безмембранного материала, которые, как предполагают авторы, являются следствием экзоцитоза [Nicolas, Zagury, 1980].

Увеличение ареала цитоплазматических вакуолей и субклеточной локализации активности кислой фосфатазы в процессе взаимодействия цитолитических Т-лимфобластов, полученных в MLC, и клеток-мишеней убедительно свидетельствуют о наличии активности кислой фосфатазы в цитоплазме Т-киллеров [Poulsen, Nielsen, 1979].

Мы наблюдали усиление активности кислой фосфатазы через час после начала взаимодействия иммунных лимфоцитов селезенки, адсорбированных на поверхности клеток-мишеней. Активность кислой фосфатазы в цитоплазме клеток-мишеней парастала через 3—6 ч взаимодействия. Через 3 ч взаимодействия в лимфоцитах и в клетках-мишенях обнаруживается также нарастание активности дегидрогеназ сукцината и дегидрооротата [Быковская и др., 1975].

Напротив, Гримм с сотрудниками [Grimm e. a., 1979a] не увидели каких-либо органелл в цитоплазме лимфоцита, ориентированной в зону контакта с клеткой-мишенью. Обнаруживаются только рибосомы, тогда как аппарат Гольджи, митохондрии и лизосомы если и видны, то на расстоянии от ядра и плазматической мембраны. Другие авторы также не обнаружили каких-либо признаков секреции в цитоплазме лимфоцитов [Kalina, Berke, 1976; Sanderson, Glauret, 1977; Ryser e. a., 1977]. При изучении механизма взаимодействия Т-киллера и клетки-мишени неизбежно появляются вопросы о возникновении внутрицитоплазматических связей о переносе какого-либо вещества из лимфоцита в клетку-мишень, о повреждении мембраны клетки-мишени как причине ее последующей гибели.

Нами ранее были описаны цитоплазматические мостики и переход меченной ^3H -уридином РНК и ДНК-содержащего материала из иммунного лимфоцита в цитоплазму клетки-мишени [Suga e. a., 1967]. В последующем исследована судьба ДНК-содержащего материала, обнаруживаемого в цитоплазме клеток-мишеней. Импульсная метка ^3H -уридином не выявила активности в области ДНК-содержащих гранул [Сура и др., 1970]. Через предполагаемые внутриклеточные контакты был также показан переход материала, меченного флюоресцеином [Sellin e. a., 1971]. Однако позднее Сандерсон [Sanderson, 1976] не подтвердил эти данные. Электронно-микроскопическое изучение конъюгатов, образованных Т-киллерами, выделенными из перитонеального экссудата, выявило периодические субструктуры, возникающие в узких областях контакта между мембранами лимфоцита и клетки-мишени. Попытки проследить переход меченного ^{51}Cr материала из цитоплазмы лимфоцита в клетку-мишень оказались безуспешными [Kalina, Berke, 1975]. Использование лантаниевой метки, заполнившей щелевидное пространство между лимфоцитом и клеткой-мишенью, позволило увидеть септы, которые на таких препаратах оставались светлыми [Grimm e. a., 1979a, b].

Описаны многочисленные цитоплазматические отростки, посредством которых лимфоцит контактирует с мембраной клетки-мишени [Koren e. a., 1973; Viberfeld, Johansson, 1975]. Некоторые отростки проникают глубоко внутрь цитоплазмы клетки-мишени, почти достигая ядра, но не пенетрируют ее мембрану [Sanderson, Glauret, 1977, 1979].

Факты о повреждении мембраны клетки-мишени неубедительны и скорее свидетельствуют о дефектах приготовления препаратов [Kogen e. a., 1973; Barber, Alter, 1978; Grimm e. a., 1979a]. Демонстрация гибели клетки-мишени в какой-то мере может объяснить механизм действия Т-киллера и поэтому привлекает внимание многих исследователей. Сандерсон [Sanderson, 1976], изучая механизм взаимодействия Т-киллеров и опухолевых клеток-мишеней [мастоцитома Р-815], сравнил картину лизиса клеток-мишеней, обработанных антителами и комплементом, или контактировавших с Т-киллерами. Через несколько минут после добавления литической дозы антител и комплемента ингибируется активность мембраны клетки-мишени, последняя теряет амебовидную форму и становится сферической. Изменения в клетках происходят относительно медленно, от 15 мин до 2 ч. Перед гибелью цитоплазма клеток приобретает гранулярный вид, клетки вспухают и разрываются. Т-киллер активно двигается вокруг и по поверхности клетки-мишени, прикрепляется к ней на несколько минут или более и отходит от внешне неизменной клетки. Контакт сам по себе не вызывает повреждения клетки-мишени, ее подвижность и морфология остаются нормальными. Видимые изменения начинаются с цейеза, активность мембраны прекращается, клетка округляется и распухает. Далее цейез сопровождается интенсивным выбросом темных пузырей цитоплазматического материала. Время между контактом лимфоцита и наступлением цейеза варьирует от нескольких минут до нескольких часов. Цейез продолжается около 5 мин, и обычно видно, как темные пузыри цитоплазмы отделяются от клетки. Эти изменения свидетельствуют о гибели клетки, наступившей в результате как бы взрыва, когда содержимое цитоплазмы выбрасывается, покидая неповрежденное ядро. Явления ядерного лизиса и распухания клетки наступают уже *post mortem* [Sanderson, 1976b].

Эти данные подтверждают Гримм с сотрудниками [Grimm e. a., 1979], использовавшие в аналогичном эксперименте метод цейтраферной киносъемки. Лимфоцит чрезвычайно подвижен, его форма часто меняется от круглой до овальной и удлиненной и опять круглой в течение нескольких минут. Он быстро движется вокруг клетки-мишени, поднимается на ее поверхность и опускается вниз, проецируя на мембране клетки-мишени свои цитоплазматические отростки. Интервалы времени от начала контакта лимфоцита с опухолевой клеткой до потери ее прозрачности варьируют от 15 мин до 2 ч. Чтобы убить одну клетку-мишень, достаточно ее контакта с одним лимфоцитом. Т-киллер способен убить одну за другой несколько клеток-мишеней, гибель которых начинается с цейеза.

Мате [Matter, 1979] в аналогичном эксперименте показал, что гибель КМ занимает от одной до нескольких минут и характеризуется пузырением клеточной мембраны, но не ее растворением. Предполагается, что цейез [Sanderson, Thomas, 1979] является

результатом изменения цитоскелетной системы клетки и что Т-киллеры вызывают физические изменения внутри КМ, но не на ее мембране.

Гибель клетки-мишени и появление многочисленных пузырей на ее поверхности эффектно продемонстрированы при использовании метода сканирующей электронной микроскопии [Ryser e. a., 1977]. Как показали Лиепинс с сотрудниками [Liepina e. a., 1977], при использовании сканирующего электронного микроскопа через 60—120 мин инкубации конъюгатов мишени округляются, на их поверхности появляются многочисленные пузыри, что соответствует выходу ^{51}Cr . На ультратонких срезах в цитоплазме клеток-мишеней обнаруживается гипертрофия митохондрий.

Вакуолизацию и дезорганизацию крист митохондрий и образование больших поверхностных пузырей и выростов цитоплазмы наблюдали также другие авторы [Rosicchiani e. a., 1979].

Обсуждая вышеизложенное, можно предположить, что появление пузырей и цитоплазматических выростов на поверхности погибающей клетки представляет собой клазматоз, описанный нами ранее [Сура и др., 1970]. По мере взаимодействия с иммунными лимфоцитами в цитоплазме клеток-мишеней увеличивается число лизосом, наблюдается выброс фрагментов собственной цитоплазмы, содержащих лизосомоподобные гранулы.

Изложенные выше цитологические данные свидетельствуют о том, что следствием гибели клетки-мишени является ее кратковременный или более длительный контакт с Т-киллером, хотя гибель мишени часто наступает значительно позже этого контакта. Данные о цитоплазматической организации лимфоцитов разноречивы и не создают впечатления о существовании структур, ответственных за синтез и выделение какого-либо специфического продукта. Вопрос об активном переносе какого-либо вещества из лимфоцита в клетку-мишень остается нерешенным, разрывы в мембране клеток-мишеней не доказательны. Гибель клетки-мишени происходит внезапно, цейез продолжается в течение нескольких минут. Эти данные не соответствуют предположению о том, что причиной гибели клетки-мишени является первичное повреждение ее мембраны, вызванное активной деятельностью лимфоцита [Koren e. a., 1973; Barber, Alter, 1978; Crimm e. a., 1979a, б].

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МЕХАНИЗМЕ ЦИТОЛИЗА КЛЕТОК-МИШЕНЕЙ

Конечным этапом гибели любой клетки является нарушение проницаемости ее мембраны, разбухание, наступившее вследствие нарушения осмотического давления, и лизис. Причиной гибели клетки могут быть агенты, повреждающие ее плазматическую

мембрану, или наоборот, события, связанные с изменениями лизосомальных мембран, вызвавших аутолиз клетки. Относительно механизма гибели клетки-мишени в процессе ее взаимодействия с Т-киллером существует несколько гипотез.

1. Предполагается, что в цитоплазме лимфоцита, вытянутой в сторону клетки-мишени (так называемая уропода), расположены рецепторы и высокозаряженные группы. В результате тесного соприкосновения мембран обеих клеток на конце уроподы лимфоцита увеличивается концентрация отрицательно заряженных ионов, что приводит к утечке внутриклеточного K^+ , наплыву Na^+ и воды и последующим локальным изменениям в мембране клетки-мишени («поцелуй смерти») [Berke, Amos, 1973b]. Эта теория коллоидно-осмотического разбухания и последующего разрыва мембраны клетки-мишени [Allison, Ferluga, 1976] подтверждается протективным эффектом высокомолекулярных декстранов [Henney, 1974].

2. В свою очередь Симан [Seeman, 1974] считает, что в результате плотной адгезии Т-киллера и клетки-мишени на мембране последней возникает тангенциальный пучок, который вызывает ее лизис аналогично лазерному пучку, индуцирующему лизис эритроцитов.

3. Гипотеза Фрайе и Фрайо объясняет действие лимфоцитов активацией фосфолипазы, связанной с мембраной, что приводит к образованию лизофосфатидилхолина (лизолецитина), сильного детергента, способного лизировать мембрану клетки-мишени.

Это предположение подтверждается данными об увеличении активности фосфолипазы в процессе цитолиза клеток-мишеней, опосредованного иммунными лимфоцитами [Koren e. a., 1971].

Однако, как оказалось, действие аналогов лецитина (фосфатидилхолиндиэстеарол и дипальмитол), а также ингибитора фосфолипазы А (ингибитор Розенталя) скорее может быть отнесено к стадии связывания лимфоцита и клетки-мишени [Berke, 1977]. Тем не менее Голстейн и Смит [Golstein, Smith, 1977] поддерживают гипотезу о действии связанных с мембранами эстераз. Их рассматривают в качестве возможных кандидатов на ведущую роль в сложной цитолитической системе, поскольку эффект может быть блокирован органофосфорными ингибиторами [Ferluga e. a., 1972] или фосфатидилхолином.

4. Предполагалось также, что мембраны эффекторных клеток при тесном контакте с клеткой-мишенью сами по себе способны ее лизировать [Ferluga, Allison, 1975]. Авторы показали, что очищенные фракции мембран лимфоцитов, стимулированных оксалоном, вызывают деструкцию клеток-мишеней. Однако впоследствии оказалось, что цитолитическим эффектом обладают фрагменты мембран, приготовленных из иммунных и неиммунных лимфоцитов, а также из нелимфоидных клеток [Kahn-Pegles, Golstein, 1978]. Более того, в определенных условиях даже опо-

средованного рецептором связывания лимфоцита недостаточно для экспрессии литического механизма [Kamat, Henney, 1976].

5. По мнению Б. Д. Брондза (1978), при контакте Т-киллера с соответствующей детерминантой клетки-мишени изменяется конформация его рецептора, что, в свою очередь, изменяет другой участок мембраны киллера, аллостерически связанный с рецептором, например ферментом. В последующем отмечается либо литическое действие экспрессированного фермента на прилегающий участок мембраны клетки-мишени, либо перемещение его на поверхность мишени и последующее локальное повреждение ее мембраны.

Это предположение основано на некоторых косвенных данных. При совместной инкубации двух популяций Т-киллеров, где клетки линии А иммунны к В и В иммунны к С, погибает вторая, распознаваемая популяция клеток, т. е. для лизиса клеток-мишеней не достаточно простого контакта с мембраной лимфоцита, необходимо соответствующее узнавание рецептора Т-киллера, контактирующего с антигенами клетки-мишени [Kuppers, Henney, 1977]. Аналогичный эффект вызывают лектины, покрывающие поверхность сингенной клетки-мишени. Контакт соответствующих рецепторов лимфоцита с Кон А или ФГА активирует литический потенциал киллеров [Rubens, Henney, 1977].

6. Наиболее вероятным кандидатом на роль цитолитического агента является лимфотоксин. Действие лимфотоксина неспецифично, однако в последнее время получен лимфотоксин, обладающий специфическим эффектом [Hiserodt e. a., 1979г]. Получить антисыворотки, отменяющие цитолитический эффект Т-киллеров, пока не удалось [Gately e. a., 1976], хотя есть данные о том, что антитела к лимфотоксину ингибируют лизис «посторонних» мишеней лимфоцитами, иммунными к белковому антигену в присутствии этого антигена в культуральной среде [Walker, Lukas, 1974].

Обсуждая механизм действия Т-киллера на клетку-мишень, прежде всего, очевидно, нельзя исходить из простой суммы фактов, свидетельствующих «за» или «против». Если какой-то известный ингибитор подавляет цитолиз, значит подавлен известный метаболический цикл. Однако метаболические процессы в живой клетке пересекаются и их активность прямо связана с клеточным циклом. Например, как показал Хенни [Henney, 1974], обработка лимфоцитов пактамицином и эметином ингибирует образование лимфотоксина и не влияет на цитолитический эффект лимфоцитов. Автор заключает, что эффект киллеров не связан с действием лимфотоксина. Однако синтез белков для наработки лимфотоксина в ходе иммунного ответа действительно нужен, но пактамицин не влияет на выход лимфотоксина из активированных зрелых лимфоцитов. Более того, четко показано, что ингибиторы белкового синтеза оказывают действие или в ходе дифференцировки Т-киллеров, или в популяции лимфоцитов, истощенных в течение

длительной активации на монослое клеток-мишеней, покрытых лектинами [Hiserodt e. a., 1979b].

Далее Хенни [Henney, 1974] сравнивает подавление цитолитического эффекта лимфоцитов и образование лимфотоксина в присутствии стимуляторов циклического АМФ, винбластина и колхицина. При этом показано действие ингибиторов на активность двух разных популяций лимфоцитов: лимфобластов, синтезирующих лимфотоксин, и Т-киллеров, выделенных из иммунной селезенки (где «работающими» клетками являются преимущественно малые лимфоциты). Как будет показано в гл. IV, механизм выхода секретлируемого продукта изменяется в ходе дифференцировки от стадии лимфобласта до малого лимфоцита и, следовательно, сделанные автором выводы неправомерны.

Наша концепция механизма действия Т-киллера на клетку-мишень, подтвержденная экспериментальными данными и многочисленными косвенными фактами, изложена в последующих главах настоящей работы. Коротко она сводится к следующему: в ходе иммунного ответа в цитоплазме лимфоцита в шероховатом ретикулуме синтезируется секрет, который поступает в гладкий ретикулум и, очевидно, заполняет трубчатые структуры и комплекс трубчатых структур в цитоплазме лимфобласта. На этой стадии выведение секрета осуществляется высокоразвитым вакуолярным аппаратом клетки. В последующем по мере созревания лимфоцита секрет депонируется в секреторных вакуолях. Контакт лимфоцита с клеткой-мишенью является стимулом, который активирует выход секрета (и одновременно выработку нового продукта) из цитоплазмы в межклеточное пространство, замкнутое мембранами лимфоцита, и клетки-мишени. Не исключено, что секрет может быть фиксирован на мембранах лимфоцита.

ТРИ СТАДИИ ЦИТОЛИЗА, ОПОСРЕДОВАННОГО Т-КИЛЛЕРАМИ

Впервые Эймос [Amos, 1962] предположил, что цитолиз клеток-мишеней, опосредованный иммунными лимфоцитами, состоит из двух этапов: стадии специфического распознавания и литической стадии, действие которой может быть неспецифическим. Специфическая адсорбция иммунных лимфоцитов на поверхности соответствующих клеток-мишеней показана одновременно с появлением модельной системы, адаптированной для изучения цитолитического действия *in vitro* иммунных лимфоцитов [Koprowski, Fernandes, 1962; Rosenau, 1963; Wilson, 1963, 1965]. В последующем Б. Д. Брондз [Brondz, 1968], а также другие авторы продемонстрировали строгую специфичность рецепторов иммунных лимфоцитов.

Однако существует различие между стадией адсорбции лимфоцитов и последующим цитолизом клеток-мишеней. Цитолитиче-

ский эффект адсорбированных лимфоцитов отменяется, если эти клетки предварительно прогреты при 43—45°C [Wagner, Rollinghoff, 1974; McDonald, 1977]. Экспозиция лимфоцитов в течение 10 мин при 44°C полностью ингибирует их литическую активность и почти не влияет на способность связываться с клеткой-мишенью [Fishelson, Berke, 1978]. Аналогичный эффект дает обработка Т-киллеров в течение 30 с 0,2%-ным формальдегидом при 0°C [Berke e. a., 1979]. В естественных условиях специфическую адсорбцию лимфоцитов, не обладающих цитолитическим действием, можно наблюдать в популяции клеток памяти, полученных в MLC и адсорбированных на поверхности соответствующих клеток-мишеней [Glaserbrook, 1978]. Эта диссоциация между связывающей и литической активностью лимфоцитов свидетельствует о существовании двух разных функций и, очевидно, разных структур, ответственных за адсорбцию и литический эффект Т-киллера.

Разработка и использование в соответствующих экспериментальных условиях ряда методических приемов позволили разграничить и подробно изучить три стадии взаимодействия Т-киллера и клетки-мишени: распознавание, или специфическое связывание; программирование для лизиса, или летальный удар; независимый лизис, или дезинтеграция клеток-мишеней [Martz, 1977; Golstein, Smith, 1977; Henney, 1977].

Стадия распознавания или специфического связывания. Эта стадия является начальным этапом, который запускает ряд процессов, ведущих к лизису клетки-мишени. На этом этапе результатом взаимодействия рецепторов Т-киллера с антигенными детерминантами клетки-мишени является адсорбция лимфоцитов на поверхности последней.

Существует несколько методических приемов, направленных на то, чтобы облегчить встречу киллера и клетки-мишени. Например, в результате короткого центрифугирования смеси двух типов клеток образуются стабильные конъюгаты, что обеспечивает быстрый лизис клеток-мишеней [Berke e. a., 1972]. Т-киллеры, взаимодействующие с клетками-мишенями в чашках Петри, предложено инкубировать на качающейся платформе [Canty, Wunderlich, 1970], причем после 30 мин качания продолжительный рокинг уже не является необходимым [Berke, Sullivan, 1973], а лимфоциты, добавленные к монослою мишеней, можно осадить коротким центрифугированием [Быковская и др., 1977].

Связывание наступает чрезвычайно быстро. По данным Мартца [Мартц, 1975], адгезия лимфоцитов наблюдалась в течение 0,25—1,9 мин при соотношении 10 лимфоцитов на одну клетку-мишень, и при соотношении 1,5 : 1, в течение 2 мин адсорбировался 31% популяции иммунных лимфоцитов. С течением времени инкубации адгезия лимфоцитов нарастает. В интервале от 2 до 20 мин адсорбировалось еще 20% лимфоцитов [Martz, 1975].

Берке с сотрудниками [Berke e. a., 1975] также наблюдали адгезию Т-киллеров в течение нескольких минут.

Клетка-мишень не является пассивным участником связывания. Показана полярная локализация поверхностных детерминант клетки-мишени, всегда ориентированных к месту связывания с Т-киллером. Агрегированные мембранные антигены образуют «шапочку» исключительно в месте конъюгации клетки-мишени с лимфоцитом [Berke, Fischelson, 1975]. Цитопласты клеток-мишеней, подвергнутых энуклеации посредством цитохалазина В, не обнаруживают кэппинга при обработке конканавалином А, тогда как кариопласты, сохранившие компоненты клеточной мембраны и остатки цитоплазмы, легко индуцируют кэппинг своих поверхностных антигенов [Berke, Fishelson, 1976]. При этом способность цитопластов лизироваться Т-киллерами значительно снижена [Berke, Fischelson, 1977]. Однако энуклеированные клетки мастоцитомы Р-815 в течение более длительного периода инкубации (4 ч) оказались более чувствительны к цитолитическому действию Т-киллеров [Siliciano, Henney, 1978].

Поскольку клетки-мишени, обработанные низкими концентрациями глютаральдегида, или формальдегида, не способны включать меченые предшественники, но могут связываться и погибать при взаимодействии с Т-киллерами, по мнению большинства авторов, они не являются активными участниками реакции [Golstein e. a., 1972; Wekerle e. a., 1974; Stulting e. a., 1975]. Однако Шик и Берке [Schik, Berke, 1979] считают, что обработка формальдегидом может вести только к изменению селективной мембранной проницаемости и не влиять на распределение антигенных детерминант.

Повышенная чувствительность клеток-мишеней в G_1 -фазе митотического цикла также свидетельствует об участии клеток-мишеней в литическом акте [Sanderson, Thomas, 1976].

Необходимым условием связывания является доступность антигенных детерминант клетки-мишени для рецепторов лимфоцита. Поэтому любая обработка, в результате которой антигенные детерминанты становятся закрытыми или уничтожаются, отменяет связывание.

Клетки-мишени, обработанные высокими концентрациями папаина или проназы, становятся резистентными к действию Т-киллеров, тогда как обработка трипсином или нейраминидазой не оказывает протективного эффекта. Резистентность к лизису после обработки проназой или папаином отражает поверхностные изменения, связанные с деструкцией соответствующих антигенных детерминант клетки-мишени. Папаин или проназа в использованных концентрациях (5 мг/мл) удаляют примерно 80% поверхностных Н-2^b-антигенов клеток-мишеней, обработка трипсином приводит к потере 40% Н-2^b-антигенов, тогда как нейраминидаза не оказывает действия на количество поверхностных SD-антигенов. Интересно, что обработка низкими концентрациями проназы,

трипсина и нейраминидазы усиливает цитолиз, что объясняется обнажением антигенных детерминант клеток-мишеней [Todd, 1975]. Эти данные соответствуют сообщению Эдидин и Хепни [Edidin, Henney, 1973], получивших ингибцию лизиса клеток-мишеней, обработанных папаином. По данным Брондза [Brondz e. a., 1973], предварительная обработка клеток-мишеней нейраминидазой усиливает цитолиз на 48%. Эти данные согласуются с сообщением Бевана [Bevan, 1975], показавшего, что клетки с высоким содержанием H-2 антигенов являются лучшими мишенями для Т-киллеров.

Антигенные детерминанты клеток-мишеней могут быть не только уничтожены, но и замаскированы соответствующими антителами. Предварительная инкубация клеток-мишеней с антисывороткой без комплемента полностью ингибирует действие иммунных лимфоцитов [Todd e. a., 1973]. Добавление в культуральную среду декстрана также препятствует связыванию лимфоцитов и клеток-мишеней [Martz, 1975].

Как упоминалось выше, наличие соответствующих рецепторов является необходимым условием для адсорбции Т-киллеров. Обработка лимфоцитов трипсином предотвращает их цитолитический эффект на клетки-мишени. В однонаправленной системе, где лимфоциты линии А иммунны к лимфоцитам линии В, а В иммунны к С, трипсинизация клеток А анти-В ингибирует связывание на 86%, тогда как обработка В анти-С практически не эффективна (5% ингибции) [Fischelson, Berke, 1978]. Способностью адсорбироваться на поверхности клеток-мишеней обладают только живые, метаболически активные лимфоциты, которым требуются оптимальные температурные условия.

Как было показано, специфическое распознавание является феноменом, зависящим от температуры, и проявляется при 37°C. При 0°C Т-киллеры не связываются с клеткой-мишенью [Golstein e. a., 1971; Martz, 1976a; Berke e. a., 1975]. Ограниченное связывание может быть получено при 25°C, особенно после совместного центрифугирования лимфоцитов и клеток-мишеней [Berke, Sullivan, 1973]. Сформированные конъюгаты стабильны при низкой температуре и резистентны к механическому воздействию [Martz, 1975].

Предварительная обработка лимфоцитов в течение 10 мин при 44°C поражает цитолиз и не влияет на связывание, но после более длительной тепловой обработки в течение 20—30 мин при 44°C связывающая способность лимфоцитов нарушается [Fischelson, Berke, 1978]. Специфическое связывание может быть подавлено азидом натрия, цианидом, диметилсульфоксидом (DMSO), динитрофенолом, иодацетатом [Wekerle e. a., 1974; Berke, Gabison, 1975; Todd, 1975], фенолом, теофиллином [Golstein, 1977]. На участие системы микрофиламентов в процессе связывания указывает ингибиторный эффект цитохалазина В [Henney, Bubers, 1973]. Показано также, что для адсорбции лимфоцитов необходим

Ca^{2+} , так как добавление EDTA в культуральную среду ингибирует связывание [Stulting, Berke, 1973]. Однако для осуществления связывания достаточно наличия только Mg^{2+} [Stulting, Berke, 1973; Golstein, Smith, 1976; Plaut e. a., 1976], поскольку при избытке в среде Mg^{2+} EGTA эффективно связывает Ca^{2+} [Portzehl e. a., 1964]. Удалось показать, что для распознавания киллерам достаточно присутствия ионов магния в культуральной среде [Stulting, Berke, 1973].

Стадия специфического связывания может быть прервана с тем, чтобы отделить ее от следующего этапа — «летальный удар». Для этого существует несколько методических возможностей. Например, введение антисыворотки и комплемента к H-2 антигенам Т-киллеров прерывает начало цитолиза [Martz, Benacerraf, 1973]. Этот метод впервые позволил отделить зависимую и не зависимую от Т-киллера стадию цитолиза. Антисыворотка инактивирует лимфоциты в течение 30 мин. Если лимфоциты и клетки-мишени инкубировать вместе в течение часа, добавление антисыворотки и комплемента не влияет на последующий цитолиз. Предварительная экспозиция лимфоцитов в течение 10 мин при 45°C , как уже упоминалось, не влияет на связывание, но ингибирует цитолиз [Miller, Dunkley, 1974], и таким образом может быть использована как методический прием для разграничения первой и второй стадии [Wagner, Rollinghoff, 1974].

Добавление в культуральную среду высокомолекулярного декстрана предотвращает межклеточные контакты в суспензии лимфоцитов и клеток-мишеней. 10%-ный раствор декстрана прерывает образование связей между клетками, контакт между которыми облегчен центрифугированием [Martz, 1975]. И наконец, стадия связывания может быть остановлена введением EDTA или EGTA, следствием которого является диссоциация лимфоцитов и клеток-мишеней [Henney, Bubbers, 1973a]. Этот метод позволяет четко разграничить стадию связывания и последующий киллинг клетки-мишени.

Стадия «летальный удар». Клетка, обладающая литическим потенциалом, чувствительная к лизису со стороны другой такой же клетки. Однако сама она не лизируется, когда разрушает клетку-мишень. Очевидно, Т-киллер защищен от своего литического механизма, который может быть поляризован в сторону клетки-мишени. Изучение цитолитической реакции между двумя взаимно иммунными популяциями лимфоцитов (А анти-В и В анти-А) демонстрирует полярность лизиса и прямую зависимость между связывающим и литическим механизмом [Golstein, 1974]. Анализ индивидуальных конъюгатов А анти-В и В анти-А показал, что в такой системе имеет место скорее однонаправленный, чем взаимный лизис. Однонаправленное связывание может быть определено как тип взаимодействия «голова-хвост» вследствие полярного распределения рецепторов лимфоцита [Fischelson, Berke, 1978].

Добавление EDTA в культуральную среду непосредственно после образования конъюгатов разделяет Т-киллеры и клетки-мишени и предотвращает цитолиз. Однако добавление EDTA после инкубации конъюгатов в течение 6 мин при 37°C уже не предотвращает лизис клеток-мишеней. Таким образом, в течение нескольких минут клетки-мишени становятся «запрограммированными» к лизису, который обнаруживается в последующем в течение нескольких часов и не требует участия лимфоцитов [Martz, 1975].

По данным Макдональда [McDonald e. a., 1975], достаточно 30 с, чтобы вызвать лизис какой-то части клеток-мишеней. После взаимодействия клеток в конъюгатах в течение минуты при 37°C при последующей 6-часовой инкубации лизируется 50% диспергированных клеток-мишеней [Martz, 1975].

В последующем использование Ca^{2+} пульсового метода позволило четко отграничить стадию «летальный удар» [Golstein, Smith, 1976]. Т-киллеры и меченные ^{51}Cr клетки-мишени смешивают в безкальциевой среде в присутствии Mg^{2+} и центрифугируют. При этих условиях осуществляется специфическое связывание, но «программирование к лизису» не происходит. Добавление Ca^{2+} запускает стадию «летальный удар», которая может быть через несколько минут остановлена введением EDTA. Последующий выход ^{51}Cr свидетельствует об интенсивности взаимодействия. Добавление EDTA ингибирует не только стадию «летального удара», но и специфическую адгезию, так как связывает и Ca^{2+} и Mg^{2+} . В том случае, если в культуральную среду на стадии «летального удара» добавляется EGTA при избытке Mg^{2+} и затем EDTA, «летальный удар» может быть остановлен только удалением Ca^{2+} без диссоциации комплекса лимфоцит — клетка-мишень.

Эта оригинальная методика позволяет, воздействуя теми или иными методами на лимфоциты, изучить и попытаться понять механизм их цитологического эффекта.

Например, на стадии «летального удара» показана строгая зависимость от температуры. Цитолиз клеток-мишеней может быть получен только при 37°C, тогда как при 4° цитолиз полностью ингибирован [Golstein, Smith, 1977]. По данным Мартца [Martz, 1975], стадия «летального удара» примерно в 4 раза более зависима от температуры, чем стадия специфического связывания.

Азид натрия, DMSO, фенол, иодацетат, теofilлин, а также цитохалазин Б, колхицин и декстран, добавленные в культуральную среду за 10 мин до введения Ca^{2+} , ингибируют цитолиз. Эффект почти всех перечисленных выше ингибиторов обратим, кроме колхицина и иодацетата. Следует отметить, что все эти вещества ингибируют и стадию распознавания и «летальный удар»; таким образом, возможно воздействие на два участка цитолитического процесса в целом. Как известно, азид и фенол блокируют транспорт электронов, DMSO повреждает мембрану клетки, цитохала-

зин Б нарушает функцию микронитей, колхидин разрушает микротрубочки, а теофиллин индуцирует повышение уровня внутриклеточного циклического аденозинмонофосфата. Разнообразное действие перечисленных выше ингибиторов, по мнению Голстейна [Golstein, Smith, 1977], свидетельствует о существовании комплексного метаболического механизма.

Иодацетат, блокирующий фермент 3-фосфоглицеральдегид дегидрогеназу, ингибирует гликолиз и, как было показано Голстейном, стадию «летального удара». Другие авторы также подтверждают, что киллинг — энергозависимый процесс [Todd, 1975; McDonald, 1977]. Эти данные соответствуют также результатам, полученным другими авторами. Цитохалазин Б меньше чем за минуту почти полностью предотвращает образование адгезии, но не способен разорвать образовавшиеся конъюгаты или ингибировать программирование к лизису [Martz, 1977]. Эти факты, на первый взгляд, не согласуются с данными Голстейна и Смита [Golstein, Smith, 1977], но, видимо, речь идет о влиянии цитохалазина Б на Ca^{+2} -зависимые стадии.

При изучении действия локальных анестетиков показана обратимая ингибция киллинга (но не дезинтеграции) клеток-мишеней [Kemp, Berke, 1973]. Эффект лидокаина распространяется и на образование адгезии, и на стадию «летальный удар», и на акселерацию гибели клеток-мишеней [Martz, 1977].

Независимый лизис клеток-мишеней. Гибель клеток-мишеней после удаления лимфоцитов может быть прослежена в пределах нескольких часов и зависит в общем от способа иммунизации и соотношения лимфоцит : клетка-мишень. По данным Мартца и Бенацерафа [Martz, Benacerraf, 1975], при использовании лимфоцитов иммунной селезенки в соотношении 18—32 : 1, полупериод выхода ^{51}Cr из клеток-мишеней составлял 1,7 ч, а плато лизиса появлялось через 5—6 ч. По данным других авторов, клетки-мишени могут лизироваться от 5—10 мин до 2—3 ч при использовании иммунных лимфоцитов перитонеального экссудата [Zagury e. a., 1975; Sanderson, 1976].

Перед началом выхода ^{51}Cr определяется короткий лаг-период: менее 20 мин [Berke e. a., 1969; Berke e. a., 1972]. Удлинение лаг-периода можно объяснить низкими концентрациями цитолитических Т-лимфоцитов в суспензиях, или низкой чувствительностью системы [Martz, 1977]. В наших экспериментах цитоллиз клеток-мишеней обнаруживается через 30 мин инкубации, причем степень цитолиза прямо пропорциональна соотношению лимфоцит : клетка-мишень. В последующем такая зависимость исчезает. Через 90 мин при соотношении 5 : 1 лизируется около 20% и при соотношении 10 : 1 — 27% клеток-мишеней [Вуковская е. а., 1978].

Продолжительность периода инкубации варьирует в зависимости от чувствительности используемой системы. Нормальные или опухолевые лимфоидные клетки лизируются в течение нескольких минут или часов [Berke, Amos, 1973; Cerottini, Brunner,

1974; Martz, 1977], в то время как для монослоя фибробластов требуется значительно больше времени [Berke e. a., 1969].

Жизнеспособность клеток-мишеней может быть оценена по включению красителя, определением метаболической активности или по выходу в культуральную среду меченых внутриклеточных компонентов цитоплазмы. Общепринятым методом оценки лизиса клеток-мишеней является определение выхода радиоактивного ^{51}Cr в культуральную среду [Brunner e. a., 1968]. Молекулярная масса связанных с ^{51}Cr макромолекул составляет 2000—4000d, независимо от того, как был получен этот материал: при спонтанном выходе из интактных клеток, после действия Т-киллеров, действия антитела и комплемента, или после замораживания и оттаивания клеток [Kurth, Medley, 1975; Martz, 1976; Sanderson, 1976a]. По данным Хенни [Henney, 1973a,б], ^{51}Cr связывается с макромолекулами массой 80—125 тыс. d. Хромат натрия, проникающий в клетку, немедленно превращается в Cr^{3+} , который необратимо связывается с белками [Martz, 1976б]. Выходу столь крупных макромолекул должны соответствовать достаточно большие повреждения в мембране клетки-мишени. Специфический выход радиоактивного хрома коррелирует с другими методами оценки гибели клеток, например с потерей клонирующей способности и включением трипанового синего [Wigzell, 1965; Brunner e. a., 1966; Sullivan e. a., 1972]. В клетках, меченных лейцином ^{14}C , степень специфического выхода меченого материала соответствует выходу ^{51}Cr при взаимодействии клеток-мишеней с Т-киллерами [Sanderson, 1976a]. Высвобождению радиоактивного хрома из клетки предшествует выход электролитов или низкомолекулярных метаболитов, как было показано на клетках, обработанных антителами и комплементом [Burakoff e. a., 1975], а также на примере клеток-мишеней, контактировавших с Т-киллерами [Henney, 1973a; Martz, 1976a; Sanderson, 1976a].

Подробно изучен выход радиоактивного рубидия (^{86}Rb) из клеток-мишеней, взаимодействовавших с лимфоцитами. Реутилизация рубидия ограничена, однако его спонтанный выход из опухолевых клеток достигает 40% в течение часа. Выход радиоактивного рубидия соответствует пропорции клеток-мишеней, программированных к лизису [Henney, 1973a; Martz, 1976a]. На основании этих данных высказано предположение, что первоначальный выход низкомолекулярных компонентов приводит к осмотическому дисбалансу поврежденных клеток-мишеней, который провоцирует проникновение воды и разбухание клетки-мишени, ведущее к выведению высокомолекулярных компонентов цитоплазмы и лизису клетки-мишени [Henney, 1973б; Sanderson, 1976]. Существует предположение, что макромолекулы с возрастающей молекулярной массой формируют трансмембранные каналы все более увеличивающегося размера в повреждающихся клетках [Mayer, 1977]. Если допустить, что лизис клетки-мишени начинается с выхода низкомолекулярных веществ, за которым следует высвобождение

цитоплазматических компонентов с возрастающей молекулярной массой, выхода ^{51}Cr следовало бы ожидать через 10—15 мин после начала взаимодействия. Чтобы оценить по мере гибели клетки-мишени выход и распределение меченных ^{51}Cr макромолекул по весу, они были подвергнуты анализу методом гель-хроматографии. Как показывает профиль элюции, после 15, 30 и 90 мин взаимодействия не отмечается преимущественного выхода разного размера компонентов, меченных ^{51}Cr . В разное время от начала контакта с Т-киллерами высвобождаются меченные ^{51}Cr компоненты с малой молекулярной массой [Kurth, Medley, 1975; Martz, 1976; Sanderson, 1976].

Предполагается, что выход меченого рубидия осуществляется во время фазы цитозиса, которая морфологически соответствует времени программирования к лизису [Sanderson, 1981]. Очевидно, различия в природе, коэффициентах диффузии, включении меченого предшественника в разные компартменты клетки, из которых метка может высвободиться быстрее или медленнее, могут быть важной причиной раннего выхода ^{86}Rb .

Выход меченных ^{86}Rb или ^{51}Cr компонентов имеет строгую температурную зависимость [Martz e. a., 1974]. Поскольку выход меченых компонентов из клеток, обработанных антителами и компонентом, также ингибируется при низкой температуре [Martz, 1975], предполагается, что причиной гибели клеток-мишеней являются коллоидно-осмотические явления [Golstein, Smith, 1977], хотя при низкой температуре замедляются также любые ферментативные реакции. Высокомолекулярный декстран, добавленный в культуральную среду, является эффективным ингибитором высвобождения ^{51}Cr . Декстран с молекулярной массой 500 000 d снижает осмотический лизис клеток-мишеней [Henney, 1974; Ferluga, Allison, 1974; Burakoff e. a., 1975]. Специфический лизис предотвращается по крайней мере в течение 7 ч в среде, содержащей 10%-й декстран [Martz, 1975].

На основании этих фактов постулируется, что дезинтеграция клеток-мишеней не требует какого-либо активного метаболизма и является следствием осмотических изменений [Golstein, Smith, 1977]. Нельзя не возразить, что коллоидно-осмотические изменения являются следствием гибели любой клетки, конечным этапом процесса. Но причиной гибели клетки-мишени может быть как повреждение ее мембраны, так и активация собственных лизосомальных ферментов, результатом которой может быть аутолиз.

Отмечено, что при взаимодействии иммунных лимфоцитов и клеток-мишеней в цитоплазме последних нарастает активность кислой фосфатазы и дегидрогеназ сукцината и дегидрооротата [Быковская и др., 1975], а вещества, известные как стабилизаторы лизосомальных мембран, ингибируют деструкцию клеток-мишеней. Таким эффектом обладают преднизолон, хлорохин, трипан-блау [Брондз, 1978]. Ингибиторы стадии «специфического связы-

вания» и «летального удара» не оказывают действия на независимый лизис клеток-мишеней [Golstein, Smith, 1977; Martz, 1977].

* * *

Хотя до настоящего времени вопрос о действии цитолитических Т-лимфоцитов на клетку-мишень не решен, получены многочисленные факты, позволяющие сделать определенные предположения и выводы.

Известно, что Т-киллер не обладает дистанционным действием; необходим его тесный контакт с мембраной клетки-мишени. Исключительная подвижность лимфоцита, атакующего клетку-мишень в начальной фазе взаимодействия, свидетельствует о том, что выбор места контакта на мембране клетки-мишени (или на цитоплазматической наружной мембране самого лимфоцита) не случаен. Действительно, Т-киллеры адсорбируются только на поверхности тех клеток-мишеней, в ответ на стимуляцию аллоантигенами которых генерировал клон данных лимфоцитов, и частично адсорбируются на «посторонних» клетках-мишенях, несущих перекрестные антигенные детерминанты стимуляторов. Известно, что интактные спящие клетки вообще не могут быть мишенями.

Как было показано, стадия специфического связывания требует оптимальных температурных условий и подавляется ингибиторами дыхания и гликолиза, а действие цитохалазина В свидетельствует об участии системы микрофиламентов. Таким образом, только живые активно метаболизирующие лимфоциты способны адсорбироваться на клетках-мишенях. Необходимым условием связывания является как наличие специфического рецептора Т-лимфоцита, так и присутствие соответствующих антигенных детерминант на поверхности клетки-мишени. Предварительная обработка протеазами в высоких концентрациях или маскировка антителами предотвращают адгезию. Поскольку активность системы микронитей и микротрубочек зависит от концентрации Ca^{2+} в окружающей среде, связывание понов кальция с помощью EDTA разрушает образовавшиеся конъюгаты лимфоцит : клетка-мишень, что может быть использовано для диспергирования клеток и изучения механизмов цитолиза.

Г л а в а III

ПРОЛИФЕРАЦИЯ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ЭФФЕКТОРНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Обнаружение лимфокинов, секретируемых субпопуляциями эффекторных Т-лимфоцитов, является прямым доказательством секреторной природы этих клеток. Пока не разработаны методические подходы к выделению Т-супрессоров, или Т-хелпе-

ров, Т-киллеры являются наиболее подходящим объектом для изучения, так как обладают способностью специфически адсорбироваться на поверхности клеток-мишеней. Поскольку функциональная активность Т-киллеров легко определяется по цитолизу КМ, изучение ультраструктуры лимфоцитов, адсорбированных на поверхности клеток-мишеней, дает возможность получить ценную информацию о механизме секреции в цитоплазме Т-киллеров на разных этапах дифференцировки этих клеток.

Существует несколько модельных систем для получения Т-киллеров: использование клеток регионарных лимфоузлов, или селезенки аллоиммунизированного животного на пике иммунного ответа [Brondz, 1968; Rosenau, Moon, 1961], использование лимфоцитов перитонеального экссудата, очищенных от прилипающих клеток на 11—12-й день после внутрибрюшинной иммунизации мышью аллогенными опухолевыми клетками [Berke, Sullivan, 1972], а также однонаправленная смешанная культура лимфоцитов двух доноров (MLC) [Bach, Hirschhorn, 1964].

На разных стадиях иммунного ответа цитолитической активностью обладают преимущественно разные типы Т-киллеров: сначала лимфобласты и большие лимфоциты, а на поздних стадиях средние и малые лимфоциты [Andersson, 1973].

В смешанной культуре лимфоцитов цитолитическая активность достигает пика на 5—6-е сут после стимуляции, падает на 7—8-е сут, а «работающими» клетками являются лимфобласты и большие лимфоциты [Häuger e. a., 1972].

Среди очищенных от прилипающих клеток Т-лимфоцитов перитонеального экссудата на 11—12-й день иммунизации примерно 25—35% клеток образуют конъюгаты с опухолевыми клетками-мишенями и являются киллерами, которые представляют собой малые и средние Т-лимфоциты, обладающие высокой цитолитической активностью [Berke, 1979].

При анализе этих двух модельных систем обращает на себя внимание, что в MLC имеет место однократная аллоантигенная стимуляция облученными лимфоидными клетками, тогда как при иммунизации *in vivo* вводятся живые интактные клетки аллогенного трансплантата, способные долгое время персистировать в организме реципиента, что обеспечивает их рестимуляцию.

Например, аллогенные опухолевые клетки можно видеть в перитонеальном экссудате еще на 9—10-й день после их внутрибрюшинного введения [Berke, Amos, 1973; Andersson, 1973].

Таким образом, поскольку на ранних стадиях иммунного ответа «работающими» клетками являются лимфобласты и большие лимфоциты, которые, очевидно, при последующей рестимуляции *in vivo* дифференцируются в цитолитически активные средние и малые лимфоциты, мы попытались создать модель этого процесса *in vitro*, используя смешанную культуру лимфоцитов для изучения дифференцировки эффекторных Т-лимфоцитов от стадии лимфобласта до малого лимфоцита.

СРАВНЕНИЕ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ И ЦИТОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ В СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЕ ЛИМФОЦИТОВ ТИМУСА И СЕЛЕЗЕНКИ

Для изучения дифференцировки лимфобластов и больших лимфоцитов, т. е. ранней стадии иммунного ответа, мы использовали смешанную культуру лимфоцитов тимуса, что позволило получить популяцию эффекторных Т-лимфоцитов, практически лишенную В-клеток [Wagner, 1972]. Поскольку в тимусе определяется всего 5—6% зрелых клеток, способных отвечать на антигенную стимуляцию [Blomgren, Andersson, 1969], следовало ожидать получения более слабого эффекта при использовании тимоцитов в качестве

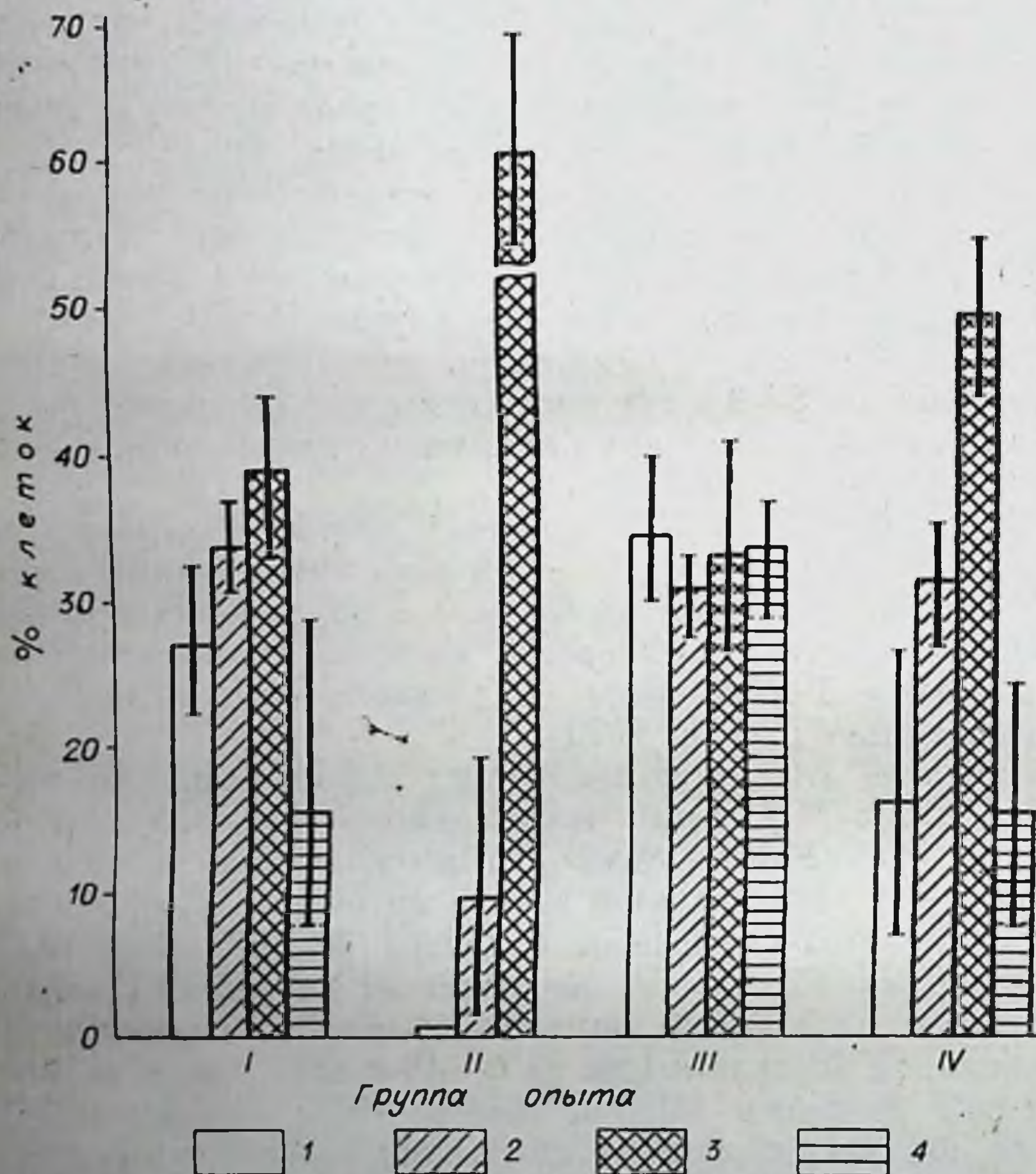


Рис. 1. Соотношение малых, средних и больших лимфоцитов, а также пропорция ДНК-синтезирующих клеток в смешанной культуре и в монокультуре лимфоцитов тимуса и селезенки. I — отвечающие клетки-timoциты; II — монокультура тимоцитов; III — отвечающие клетки-лимфоциты селезенки; IV — монокультура клеток селезенки; 1 — большие лимфоциты и бласты; 2 — средние лимфоциты; 3 — малые лимфоциты; 4 — лимфоциты, меченные ³H-тимидином. Усредненные данные пяти экспериментов.

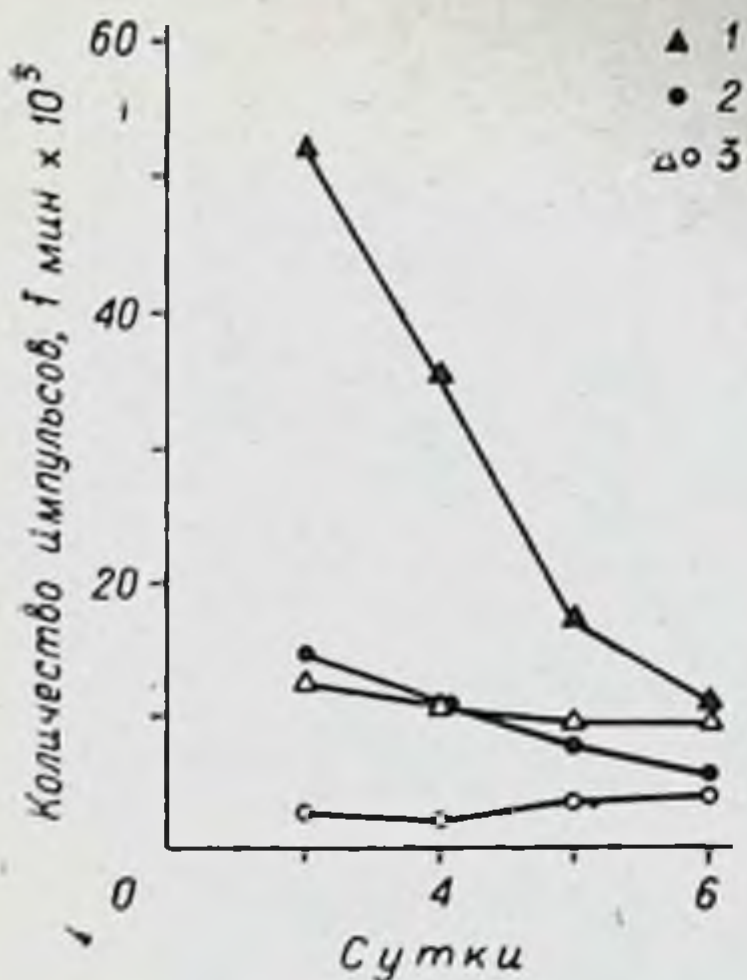


Рис. 2. Синтез ДНК в смешанной культуре и монокультуре лимфоцитов тимуса и селезенки.

1 — отвечающие клетки-лимфоциты селезенки; 2 — отвечающие клетки-тимоциты; 3 — монокультура клеток селезенки и тимуса. Усредненные данные трех экспериментов.

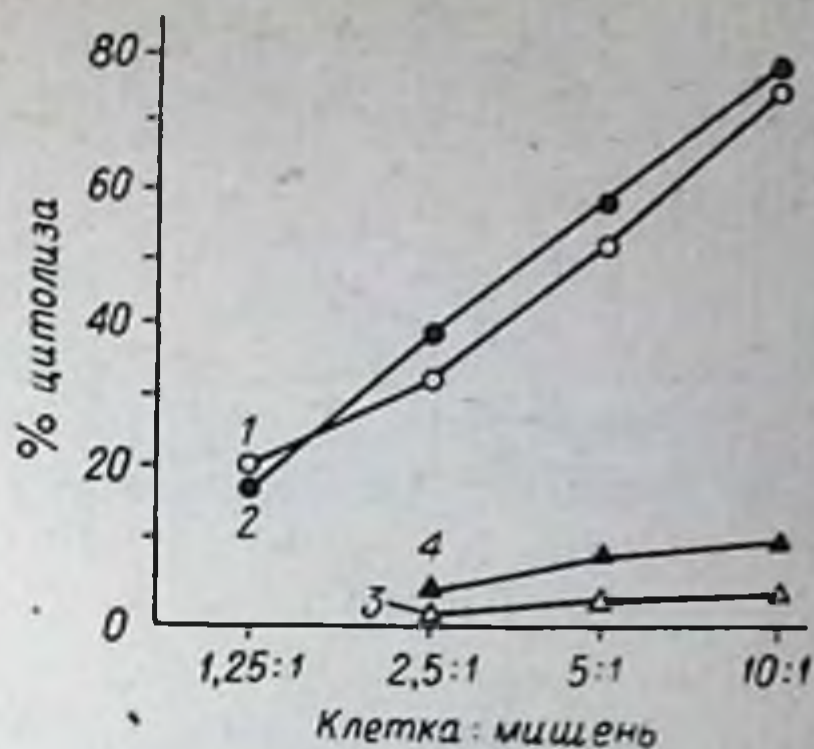


Рис. 3. Цитологическая активность стимулированных лимфоцитов тимуса и селезенки на 5-й день культивирования.

1 — отвечающие клетки-тимоциты; 2 — отвечающие клетки лимфоциты селезенки; 3 — монокультура тимоцитов; 4 — монокультура клеток селезенки. Усредненные данные пяти экспериментов.

реагирующих клеток. Поэтому мы провели сравнительную оценку пролиферативной и цитолитической активности лимфоцитов тимуса и селе-

зенки, полученных в MLC [Быковская и др., 1977].

В основной серии экспериментов в качестве реагирующих клеток использовали лимфоциты тимуса или селезенки мышей BALB/c (H-2^d) и в качестве стимулирующих — лимфоциты селезенки мышей СЗН (H-2^k). В качестве клеток-мишеней использовали монослойную культуру L-клеток (H-2^k).

На 4-е сут после стимуляции *in vitro* клеток тимуса количество живых лимфоцитов составляло 11—13% от исходного и при стимуляции клеток селезенки 50—60%. Пропорция бластов и больших лимфоцитов, определяемая фазово-контрастной микроскопией, составляла 23—35% в MLC с использованием клеток тимуса в качестве отвечающих и 33—38% в MLC с клетками селезенки. Пропорция средних лимфоцитов составляла соответственно 29—39 и 23—31%. Количество меченных ³H-тимидином лимфоцитов, по данным автордиографии, колебалось от 15 до 26% для стимулированных лимфоцитов тимуса и от 32 до 41% для стимулированных лимфоцитов селезенки. В монокультуре лимфоцитов тимуса содержание живых клеток составляло 3,3% от исходного и мечеными были 0,05% клеток, тогда как в монокультуре лимфоцитов селезенки живых клеток было 30—40% и были мечеными от 9 до 21% из них. Пропорция меченых лимфоцитов в монокультуре селезенки нарастала с увеличением времени культивирования (рис. 1).

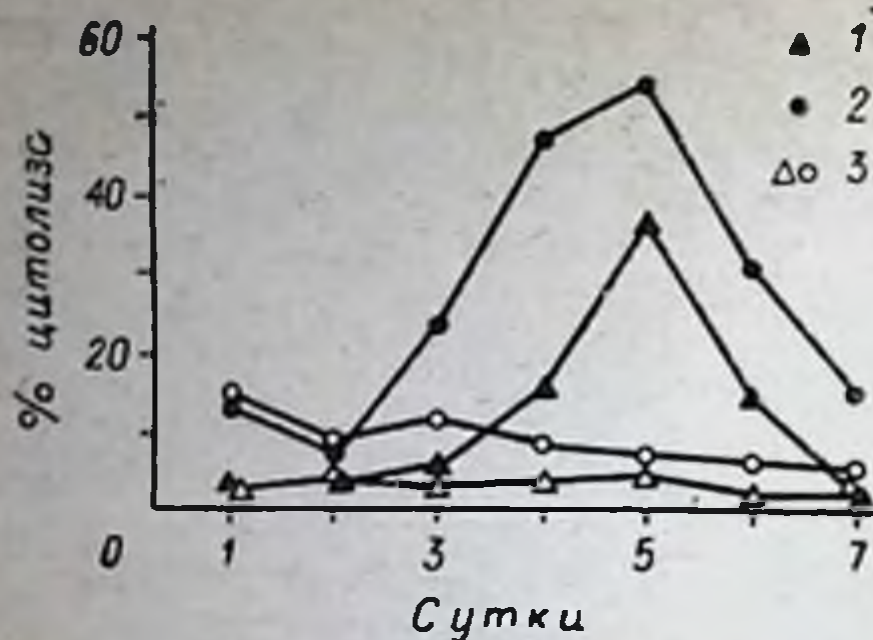


Рис. 4. Динамика цитолитической активности стимулированных лимфоцитов тимуса и селезенки.

1 — отвечающие клетки-лимфоциты тимуса; 2 — отвечающие клетки-лимфоциты селезенки; 3 — монокультура лимфоцитов тимуса и селезенки. В представленных экспериментах использовано соотношение лимфоцит:клетка-мишень 5 : 1. Представлены усредненные данные 3-х экспериментов.

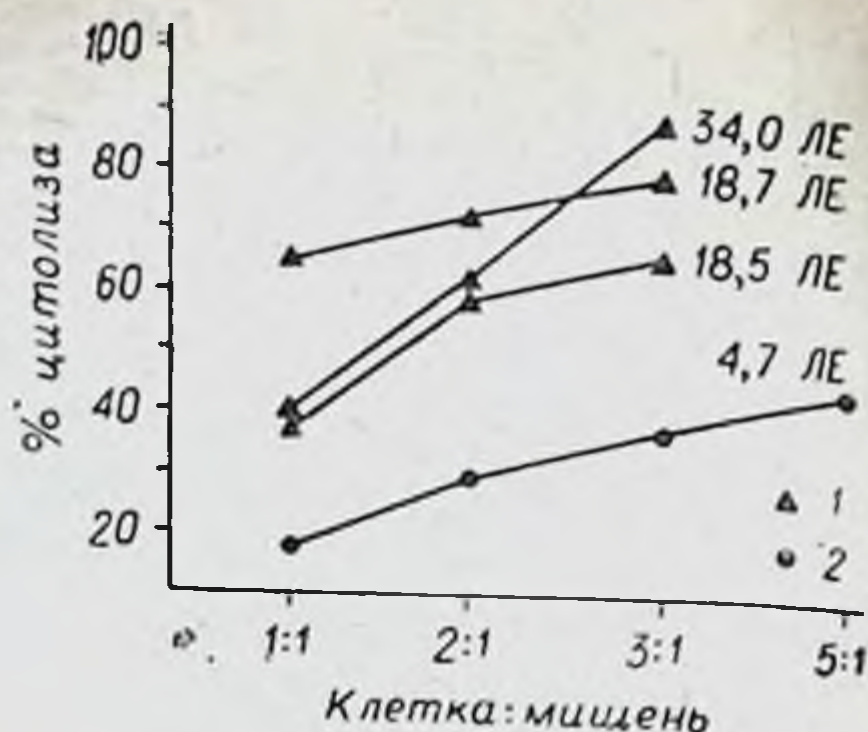


Рис. 5. Цитолитическая активность фракции лимфобластов и больших лимфоцитов, выделенных методом спонтанного осаждения в градиенте ТЭС.

1 — фракция лимфобластов, эксперименты I, II, III; 2 — нефракционированные лимфоциты (усредненные данные трех экспериментов). Литические единицы (ЛЕ) определяли количеством лимфоцитов на $1 \cdot 10^6$ /клеток культуры, способных лизировать 50% КМ.

Динамика синтеза ДНК в МЛС и в монокультуре лимфоцитов тимуса и селезенки представлена на рис. 2. Синтез ДНК в МЛС с клетками тимуса и селезенки максимальный на 3-й день культивирования и постепенно снижается к 6-му дню. Синтез ДНК в стимулированных тимоцитах в 3—4 раза ниже по сравнению со стимулированными лимфоцитами селезенки, однако индекс стимуляции примерно вдвое превышает таковой в МЛС с клетками селезенки, так как синтез ДНК в монокультуре лимфоцитов селезенки значительно превышает синтез ДНК в монокультуре лимфоцитов тимуса. Несмотря на значительную разницу в интенсивности синтеза ДНК, цитолитическая активность стимулированных лимфоцитов тимуса ниже всего лишь в 1,5—2 раза, чем лимфоцитов селезенки, а в отдельных опытах достигает того же уровня (рис. 3).

При изучении динамики цитолитической активности Т-киллеров тимуса и селезенки можно видеть, что цитолитическая активность стимулированных лимфоцитов селезенки появляется на 3-и сутки культивирования, достигает максимума на 4—5-й день и снижается к 7-му дню. Цитолитическая активность стимулированных лимфоцитов тимуса обнаруживается на 4-й день, достигает максимума на 5-й и резко падает к 6-7-му дню культивирования (рис. 4).

Чтобы продемонстрировать, какие клетки в МЛС определяют цитолитическую активность культуры, суспензию лимфоцитов фракционировали методом спонтанного осаждения в градиенте телячьей эмбриональной сыворотки. Оказалось, что на 4-й день

культивирования в MLC цитолитическое действие на КМ оказывают главным образом большие лимфоциты и лимфобласты (рис. 5). Активность этой фракции в несколько раз превышает активность нефракционированных лимфоцитов и соответствует 18,7—34,0 литических единиц (ЛЕ) по сравнению с 4,7 ЛЕ в исходной культуре (на 10^6 клеток). Таким образом, выбранная нами модель позволила манипулировать с популяцией эффекторных Т-лимфоцитов, содержащей значительное количество Т-киллеров.

УЛЬТРАСТРУКТУРА ЭФФЕКТОРНЫХ ЛИМФОЦИТОВ, АДСОРБИРОВАННЫХ НА ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК-МИШЕНЕЙ

Поскольку способностью специфически адсорбироваться на поверхности КМ обладают преимущественно Т-киллеры (учитывая, что в MLC генерируют и другие субпопуляции эффекторных Т-лимфоцитов), для электроно-микроскопического исследования лимфоциты, полученные на 4—5-й день MLC тимуса, центрифугировали при 150 g в течение 3 мин в пластиковых пробирках с плоским дном, чтобы осадить на монослое КМ. После 10-минутной инкубации неприкрепившиеся клетки энергично отмывали, заливали свежей средой и инкубировали в течение 30, 60 и 180 мин.

На поверхности КМ адсорбируются главным образом лимфобласты и большие лимфоциты, но встречаются также средние и малые лимфоциты. После 10 мин инкубации лимфоциты взаимодействуют с небольшой областью поверхности КМ, однако через 30—60 мин протяженность контакта лимфоцита и КМ значительно увеличивается, цитоплазматические мембраны обеих клеток могут быть расположены параллельно одна другой (на расстоянии 15—17 нм) или не параллельно: в этом случае расстояние между мембранами колеблется от 10 до 150 нм. Местами мембраны сближаются, однако расстояние между ними не бывает меньше 6—7 нм. Отростки лимфоцита вдавливаются глубоко в цитоплазму КМ, однако целостность цитоплазматических мембран обеих клеток не нарушается (рис. 1, 3, приложение).

В цитоплазме лимфоцитов обнаруживаются многочисленные митохондрии с хорошо развитыми кристами и электронно-оптически плотным митохондриальным матриксом и множество липидных вакуолей, причем диаметр некоторых из них превышает 1 мкм. Центриоли имеют нормальную структуру. Цитоплазматические микронити и микротрубочки хорошо развиты. Видны многочисленные рибосомы, профили эндоплазматического ретикулума и развитый комплекс Гольджи.

Гладкий эндоплазматический ретикулум анастомозирует с трубчатыми структурами (ТС). ТС представляют собой образования диаметром 50—60 нм и длиной до 1 мк (в плоскости ультратонкого среза) (рис. 1—6, приложение). ТС анастомозируют друг

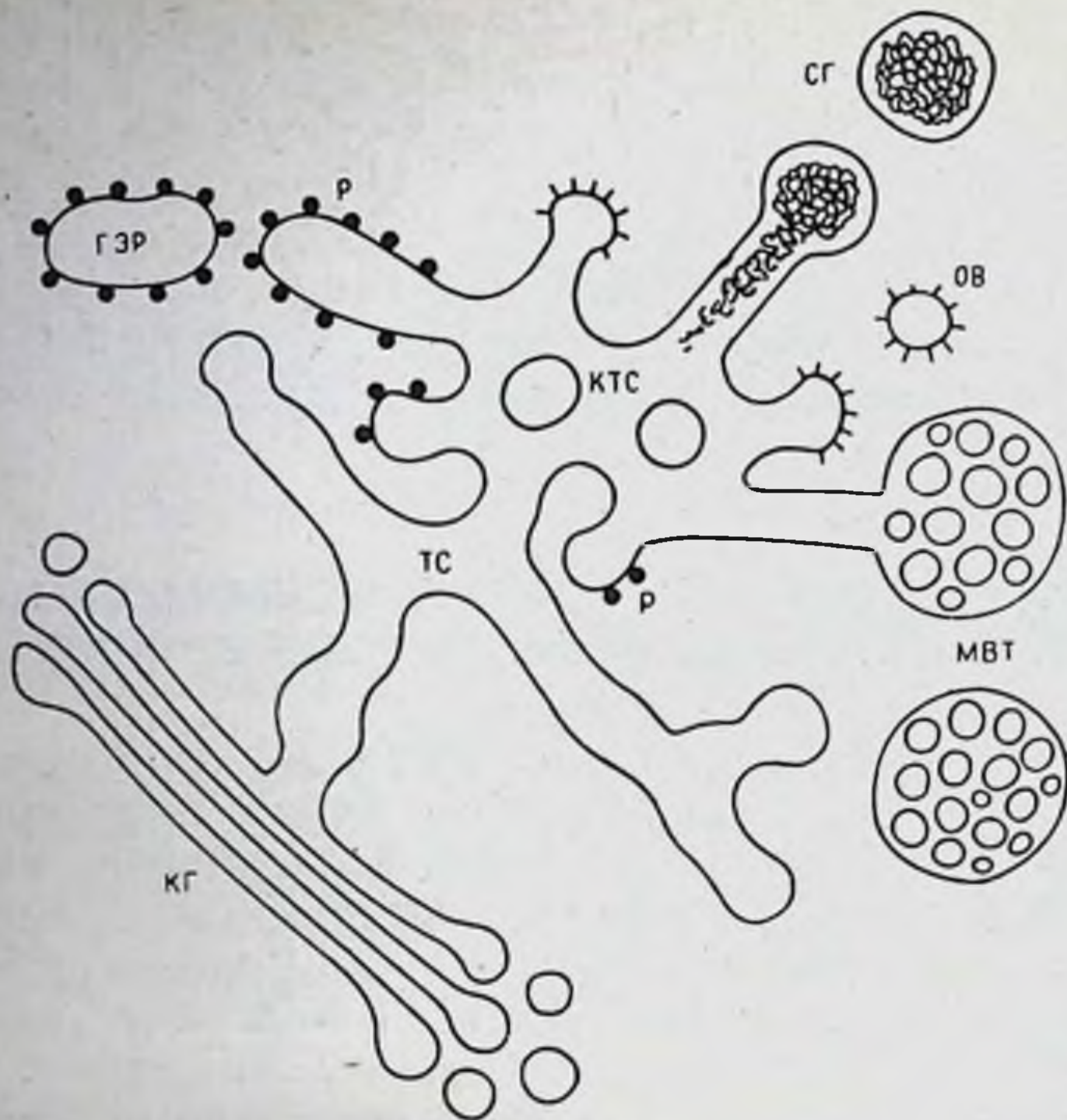


Рис. 6. Схема синтеза специфического продукта в цитоплазме цитолитического Т-лимфобласта.

ЭР — эндоплазматический ретикулум; Р — рибосомы; ТС — трубочатые структуры; КТС — комплекс трубочатых структур; КГ — комплекс Гольджи; СГ — секреторные гранулы; ОВ — опушенные везикулы; МВТ — мультивезикулярные тельца.

с другом, образуя трубочатый комплекс сложной конфигурации (рис. 7, приложение). ТС анастомозируют также с мультивезикулярными тельцами и опушенными везикулами (рис. 8, 9, приложение). Последние являются пузырьками диаметром 70—100 нм, наружная мембрана которых покрыта отростками длиной примерно 10 нм [Быковская и др., 1978, б; Раушенбах, Быковская, 1979; Bykovskaja e. a., 1980].

Комплекс трубочатых структур (КТС) представляет собой сеть анастомозирующих трубочатых структур диаметром около 60 нм, имеющих двойную мембрану. Диаметр полостей КТС колеблется от 40 до 80 нм. На периферии КТС локализуются многочисленные рибосомы и профили эргастоплазматического ретикулума, КТС располагается вблизи комплекса Гольджи и может образовывать анастомозы с вакуолями КГ (рис. 10, приложение). КТС заполнен гомогенным осьюофильным веществом, которое концентрируется в зрелых и незрелых секреторных гранулах (рис. 11—14, приложение).

Трубочатые структуры можно наблюдать также в малых и средних лимфоцитах. На рис. 6 схематически изображен КТС и анастомозирующие с ним органоиды. Эти структуры, очевидно,

могут представлять собой GERL-комплекс, описанный ранее Новиковым и др. в ряде секреторных клеток. GERL — это специализированная область гладкого ЭР, связанная с «опушенными» везикулами, в которой локализуются скопления лизосом. GERL-комплекс расположен между ядром и проксимальным концом КГ и intimately связан с вакуолями КГ. Авторы полагают, что в этой области образуются лизосомы и опушенные везикулы. В области GERL, как и в лизосомах, обнаруживается активность кислой фосфатазы, арилсульфатазы, E-600 резистентной эстеразы. GERL-комплекс обнаружен в инсулиноме, β -клетках поджелудочной железы, эпителиальных клетках щитовидной железы и других секреторных клетках [Novikoff, Novikoff, 1977].

Кислые гидролазы в лимфоцитах, стимулированных ФГА и в MLC, описаны Хиршхорном с сотрудниками [Hirschhorn e. a., 1967], Коэном с сотрудниками [Cohen e. a., 1973] и Биберфельдом [Biberfeld, 1971]. В аналогичных клетках описаны развитый гладкий эндоплазматический ретикулум, опушенные везикулы и электронно-плотные лизосомоподобные тельца [Elves e. a., 1964; Johnson, Roberts, 1964; Parker e. a., 1965].

В лимфобластах, обладающих цитолитической активностью, продемонстрированы многочисленные полирибосомы и множество пузырьков в цитоплазме [Matter, Simpson, 1976], а также повышенная концентрация гранулярного ЭР и развитый аппарат Гольджи к началу взаимодействия с КМ, что, по мнению автора, указывает на готовность к синтезу вакуолей и лизосом [Poulsen, Nielsen, 1979].

В течение первых 30 мин взаимодействия с КМ обнаруживается возрастание ареала вакуолей от 1,7 % до 11 % и через 3 ч — увеличение поверхности цитоплазмы лимфобласта. В течение первых 20 мин взаимодействия с КМ кислая фосфатаза обнаруживается в матриксе примерно 50 % мультивезикулярных телец, после 30 мин — в фагосомах и через 2 ч — в резидуальных тельцах. Активность кислой фосфатазы в области КГ появляется только после 30 мин взаимодействия и обнаруживается примерно в 80 % бластных клеток [Poulsen, Nielsen, 1979].

Таким образом, можно постулировать, что в цитоплазме эффекторных Т-лимфобластов и больших лимфоцитов, адсорбированных на поверхности КМ и убивающих эти клетки, имеется секреторный аппарат, который, возможно, активируется при контакте лимфоцита и КМ.

КЛЕТКИ ПАМЯТИ

Цитолитическая активность в MLC падает как функция времени после иммунного ответа. Это снижение, как было доказано, не связано с гибелью клеток, а является следствием последующей дифференцировки эффекторных Т-лимфоцитов [MacDonald e. a., 1973].

Возникает вопрос, отражает ли изменение физических свойств киллера с течением времени дифференцировку одной клеточной линии или параллельно появляется несколько клеточных линий? Являются ли клетки, способные к анамнестическому ответу на аллоантигены, производными киллеров, или киллеры — конечные клетки, не способные к дальнейшей дифференцировке? Ответы на эти вопросы получены с помощью следующих экспериментов: лимфоциты из MLC, взятые на пике иммунного ответа, при максимальном содержании бластных клеток, фракционировали методом спонтанного осаждения в градиенте ТЭС. 95 % литической активности обнаруживала фракция бластов и больших лимфоцитов, которые были перенесены на фидерный монослой сингенных макрофагов, или фибробластов. Через 3—4 дня культивирования бластные клетки превращались в малые лимфоциты («вторичные» лимфоциты, или клетки памяти). При этом количество клеток, меченных ^3H -тимидином, прогрессивно падало, что позволяет предположить превращение бластов во «вторичные» лимфоциты без клеточного деления [Andersson, Häyry, 1973; McDonald e. a., 1974].

На 14-й день культивирования на сингенном монослое образовавшуюся из фракции бластных клеток популяцию малых лимфоцитов рестимулировали и получили 94 % киллерной активности, что количественно соответствовало литической активности, которой обладала фракция лимфобластов-предшественников. Следовательно, предшественники вторичных киллеров, полученных после рестимуляции, выделены из первичной MLC. Далее, когда лимфоциты, полученные из фракции бластных клеток, вновь разделяли на 14-й день MLC, остаточная литическая активность обнаруживалась во фракции малых лимфоцитов, которых рестимулировали и через 48 ч повторно фракционировали. Из малых лимфоцитов образовались бласты, обладающие высокой цитолитической активностью (которая возросла в 13 раз). Этот эксперимент с двойным фракционированием подтверждает, что малые лимфоциты с остаточной активностью на 14-й день при экспозиции с соответствующими аллоантигенами могут быстро дифференцироваться в большие лимфоциты, обладающие высокой цитолитической активностью [McDonald e. a., 1974].

Рестимуляция таких «вторичных» лимфоцитов антигеном характеризуется следующими критериями: вторичный ответ может быть получен при использовании меньшего количества стимулирующих облученных клеток или при использовании субклеточных препаратов, которые могут заменить интактные облученные клетки как источник эффективного аллоантигенного стимула; пролиферативный и цитолитический ответ обнаруживается раньше, достигает более высокого уровня и продолжается далее; увеличивается способность образовывать конъюгаты, или адсорбироваться на монослое соответствующих клеток-мишеней.

Такой усиленный иммунный ответ указывает на повышенное содержание предшественников вторичных Т-киллеров, имеющих высокую аффинность рецепторов к аллоантигену. Очевидно, существует качественное различие в связывающей способности рецепторов сенсibilизированных предшественников киллеров по сравнению с клетками-предшественниками в первичной MLC.

Энгерс с сотрудниками [Engers e. a., 1975] показали, что фрагменты мембран клеток мышинного лимфолейкоза служат сравнительно слабыми антигенными препаратами для индукции киллеров в популяции нормальных селезеночных клеток по сравнению с облученными селезеночными клетками, используемыми в качестве стимулирующего антигена. И наоборот, эти фрагменты мембран служили достаточным стимулом для клеток иммунной селезенки. Киллеры, генерированные в популяции лимфоцитов иммунной селезенки мембранными фрагментами, по специфичности и цитолитической активности были идентичны клеткам, стимулированным интактными облученными лимфоцитами.

Даже кортизон-резистентные лимфоциты тимуса, которые характеризуются высокой цитолитической активностью в MLC, были способны лишь к слабому ответу при стимуляции субклеточными мембранными фрагментами опухолевых клеток [Wagner, Boyle, 1972].

Таким образом, для генерации киллеров в первичном иммунном ответе требуются живые интактные лимфоидные клетки, тогда как для стимуляции вторичного ответа достаточно аллогенных субклеточных мембранных фракций. Первичный ответ в MLC не удалось получить при использовании стимулирующих клеток, облученных ультрафиолетом, тогда как и пролиферативный, и цитолитический ответ был успешно получен при тех же условиях стимуляции во вторичной MLC, что объясняется предположительной потерей поверхностных LD-детерминант под действием ультрафиолета [Andersson, Haug, 1975; Wagner, Rollinghoff, 1976]. Эти факты позволяют предположить, что в результате первичной иммунизации образуется клон клеток, обладающих более совершенным механизмом распознавания, чем тот, который имеется в исходной популяции.

Изучение кинетики регенерации цитолитической активности выявило 10-кратное усиление количества литических единиц на культуру без соответствующего увеличения количества живых клеток в первые 24 ч реэкспозиции с аллоантигенами. Таким образом, речь идет не о селективном уменьшении или обогащении культуры цитолитическими лимфоцитами. В последующие 3 дня нарастание литической активности соответствует увеличению количества живых клеток.

Клетки, полученные во вторичной MLC, обладают примерно вдвое более высокой литической активностью, чем клетки, полученные на пике первичного иммунного ответа, а живые клетки,

взятые после третьей и четвертой стимуляции в MLC, более цитотоксичны, чем после второй MLC [McDonald e. a., 1974].

Так как литическая активность значительно усиливается в первые 24 ч рестимуляции без заметного увеличения количества живых клеток, возникает предположение, что в течение первых 24 ч реэкспозиции с антигеном цитолитическая активация может диссоциировать с пролиферацией.

Чтобы показать, что дифференцировка и пролиферация рестимулируемых клеток — два разных процесса, были использованы ингибиторы синтеза ДНК: гидроксимочевина (HU) [Andersson, Näyru, 1975] и цитозин-арабинозид [ARA-C] [McDonald e. a., 1975]. Использованная концентрация ARA-C не влияла на цитолитическую активность и жизнеспособность лимфоцитов в течение 48 ч культивирования. В первые 24 ч после рестимуляции цитолитическая активность в разных опытах возрастала в 6—20 раз и не изменялась в присутствии ARA-C. 60—70% клеток в культуре были средние и большие лимфоциты и около 90% этих клеток были мечены ³H-тимидином. В присутствии ARA-C образовалось примерно такое же количество больших и средних лимфоцитов, однако пометилось менее 2% клеток. 95% клеток, фракционированных на 14-й день и являющихся предшественниками лимфобластов, несут на своей поверхности антиген MTLA, поверхностный маркер Т-клеток, и менее 1% клеток Ig позитивны. Эти данные показывают, что большая часть малых Т-лимфоцитов после рестимуляции увеличивается в размерах и начинает синтезировать ДНК, причем увеличение размера клеток и появление цитолитической активности диссоциирует с синтезом ДНК. Чтобы прямо доказать связь между увеличением размера клеток и появлением литического потенциала, малые лимфоциты, фракционированные на 14-й день MLC, дифференцировали в большие цитолитические лимфоциты в течение 24 ч после рестимуляции, и эта функциональная активация в присутствии ARA-C диссоциировала с синтезом ДНК [McDonald e. a., 1975].

Интересно отметить, что в первичной MLC существует прямая связь между синтезом ДНК и появлением цитолитической активности. ARA-C [Rollinghoff e. a., 1973], 5-бромдезоксипуридин [Clark, Nedrud, 1974], H³ TdR [McDonald e. a., 1973; Cantor, Jandinski, 1974] ингибируют развитие первичной цитолитической активности.

При электронно-микроскопическом исследовании выявлено два типа клеток: 84% составляют лимфобласты с ядром, содержащим диспергированный хроматин, 2—3 больших ядрышка, грозди рибосом, профили круглого ЭР, митохондрии, хорошо развитый КГ; 16% клеток меньшего размера, с хроматином, конденсированным на периферии, с большим количеством рибосом, разбросанных в цитоплазме, и более развитой филаментозной сетью под клеточной мембраной [McDonald e. a., 1975]. Те с сотрудниками [Teft e. a., 1977], используя метод клональной селекции предшест-

венников цитолитических Т-лимфоцитов, показали, что при стимуляции аллоантигенами индивидуальные клетки-предшественники образуют клоны, которые содержат клетки памяти той же специфичности. Однако только половина клонов, отвечающих на первичную стимуляцию, может быть активирована при реэкспозиции с оригинальным стимулирующим аллоантигеном.

Интересно, что образование вторичных Т-киллеров, специфичных к стимулирующим антигенам, может быть индуцировано 15-минутной обработкой мышинных селезеночных клеток, ранее иммунизированных *in vivo* или *in vitro* аллоантигенами, периодатом натрия (NaIO_4). Вторичные киллеры образуются через 24 ч после обработки и в отсутствии и в присутствии цитозин-арабинозида, т. е. для индукции киллеров синтез ДНК не нужен. Цитолитическая активность лимфоцитов через 48 ч после обработки периодатом такая же, как в параллельных культурах, стимулированных облученными аллогенными селезеночными клетками, хотя пик активности обнаруживается позднее и оказывается ниже. Добавление в культуру клеток памяти сингенных неиммунных обработанных периодатом и облученных спленоцитов также индуцирует образование вторичных киллеров, что предполагает существование непрямого механизма активации.

Не ясен эффект митогенов и посторонних аллоантигенов на рестимуляцию клеток памяти. Яносси и Гривс [Janossy, Greaves, 1971], а также Андерсен с сотрудниками [Andersson *et al.*, 1972] нашли, что потомки бластных клеток, культивированные на сингеном монослое, не дают пролиферативного ответа на оптимальные, или субоптимальные концентрации ФГА или Кон А. Чирс с сотрудниками [Cheers *et al.*, 1974] показали, что лимфоциты, иммунизированные в реакции трансплантат против хозяина, хорошо отвечают на соответствующие, но не посторонние стимуляторные клетки. Авторы объясняют это тем, что на стимуляцию митогенами и аллоантигенами отвечают разные субпопуляции Т-лимфоцитов: когда Т-лимфоциты мышей стимулировали ФГА, или Кон А и бластные клетки на пике иммунного ответа удаляли методом спонтанного осаждения в градиенте ТЭС или обработкой *Budg* плюс свет, оставшиеся в культуре клетки не реагировали на митогены, но обнаруживали нормальный ответ в MLC, и наоборот, если Т-клетки сначала стимулировали в MLC и реагирующие клетки аналогичным образом удаляли, лимфоциты, оставшиеся в этих культурах, отвечали на митогены, но не на стимуляторные клетки, использованные в MLC [Andersson, Häyry, 1975]. Однако существует мнение, что Кон А действует как поликлональный активатор Т-клеток, стимулируя появление эффекторных лимфоцитов со специфичностью к аллогенным, но несингенным КМ. Киллеры, индуцированные Кон А, выделены из того же пула клеток-предшественников, которые в норме после стимуляции аллоантигенами дифференцируются в эффекторные клетки [Bevan *et al.*, 1976].

Остается неизвестным: все предшественники киллеров стимулируются Кон А или какая-то фракция этих клеток. Сероттини и Бруннер [Serottini, Brunner, 1977] исследовали эффект Кон А на 28-дневную культуру MLC. Литическая активность вторичных киллеров была одинаково высокой после 4-дневной стимуляции лимфоцитов Кон А или соответствующими аллоантигенами. Действие клеток, стимулированных Кон А, было строго специфично, сингенные КМ не были лизированы, сукцинил Кон А, не агглютинирующий митоген Т-клеток, был одинаково эффективен при индукции эффекторных Т-клеток. Авторы полагают, что Кон А способен индуцировать функциональную дифференцировку предшественников Т-киллеров в популяции долгоживущих лимфоцитов MLC.

Трудно объяснить несоответствие этих данных с результатами Андерсена и Хэри [Andersson, Häyry, 1975], изучавших не цитолитический, а пролиферативный эффект Кон А и исследовавших потомки бластных клеток, выделенных на пике иммунного ответа, тогда как Сероттини и Бруннер [Serottini, Brunner, 1977] стимулировали нефракционированную популяцию MLC. Эти данные, безусловно, требуют детального изучения.

Вместе с увеличением литической активности вторичных киллеров изменяются их связывающие свойства. Как известно, адсорбция Т-киллеров на поверхности КМ зависит от температуры, хотя и не в такой степени, как сам «летальный удар» [Berke, Amos, 1973; Berke e. a., 1975; Martz, 1975]. Как показали Сероттини и Бруннер [Serottini, Brunner, 1977], популяции лимфоцитов из MLC-2 образуют стабильные конъюгаты с КМ при 15° С и в меньшей степени при 4° С, тогда как лимфоциты из MLC-1 неэффективны в обоих случаях. Однако результаты Глазербрука [Glaserbrook, 1978] в какой-то мере не согласуются с этими данными: для лимфоцитов из вторичной MLC, смешанных в соотношении 1 : 1 с КМ и отцентрифугированных при 4° С, требовалось 10—15 мин последующей инкубации при 37° С, тогда как для первичных аллоиммунных лимфоцитов требовалось 20—30 мин для образования стабильных конъюгатов. Можно предположить, что степень образования конъюгатов отражает разницу в количестве, распределении или аффинности рецепторов, специфичных к аллоантигену, между популяциями Т-киллеров, стимулированных в MLC-1 и MLC-2. Интересно, что для лимфоцитов из MLC-1 требуется вдвое больше времени для образования конъюгатов по сравнению с клетками из MLC-2, хотя в конце инкубационного периода образуется одинаковое количество конъюгатов. Этот факт может означать, что в MLC-2 дифференцировка лимфоцитов при контакте с антигеном не связана с пролиферацией Т-киллеров, так как увеличение количества киллеров должно было бы повлечь за собой увеличение количества конъюгатов лимфоцит-КМ.

Имеются данные, свидетельствующие о том, что клетки памяти представляют собой гетерогенную популяцию. Было показано,

что лимфоциты селезенки мышей, рестимулированные на 10-й день после аллоиммунизации, наращивают свой литический потенциал до максимума в первые 24 ч контакта с антигеном, минуя клеточную пролиферацию. Этот пул клеток памяти обнаруживается с 10-го до 181-го дня от момента иммунизации. Лимфоциты, взятые на 45-й день, содержат два типа клеток: популяцию, которая дифференцируется в киллеры без синтеза ДНК, и клетки, которые образуют киллеры через пролиферацию, после 24—48 ч экспозиции с антигеном [Kamat, Henney, 1976].

Кроме того, описаны так называемые прекиллеры. Литически активные мышинные селезеночные клетки, полученные на 10—18-й день после аллоиммунизации, обнаруживают нарастание литической активности при культивировании *in vitro* в течение 24 ч, в отсутствии антигена. Это усиление литической активности не зависит от синтеза ДНК, связано с протеиновым синтезом *de novo* и опосредуется фракцией Т-клеток, не прилипающих к монослою аллогенных КМ. Прекиллеры появляются с 3—4-го дня после аллоиммунизации, их литическая активность достигает максимума к 10—13-му дню и в последующем снижается [Kamat, Henney, 1975; Kamat, Henney, 1976]. Фракционирование методом спонтанного осаждения в градиенте ТЭС показало, что эти клетки представляют собой малые лимфоциты (скорость осаждения 3—4 мм/ч), которые через 24 ч культивирования *in vitro* превращаются в большие клетки со скоростью осаждения 6 мм/ч [Gorgczynski, Tigelaar, 1975]. Таким образом, существуют два пути образования вторичных Т-киллеров из популяции иммунных лимфоцитов: антигеннезависимая дифференцировка из прекиллеров и дифференцировка клеток памяти, которая требует антигена. Биохимические процессы, лежащие в основе этих превращений, неизвестны, однако и антигензависимая и антигеннезависимая дифференцировка Т-киллеров подавляются ингибиторами, которые усиливают уровень циклического АМФ [Kamat, Henney, 1975].

Как известно, для оптимальной генерации киллеров в МЛС необходима кооперация клеток, включающих предшественники Т-киллеров, различные типы вспомогательных клеток, в том числе Т-клетки амплифайеры $Ly+1+$ [Cantor, Boyes, 1975], макрофаги [Wagner e. a., 1972; McDonald e. a., 1973], а также не Т-акссесорные клетки [Schilling e. a., 1976; Miller e. a., 1977]. Показано, что удаление прилипающих к нейлону клеток из популяции лимфоцитов иммунной селезенки в 15 раз ингибировало их способность отвечать на рестимуляцию субклеточными мембранными фракциями нормальной селезенки. Однако те же иммунные лимфоциты обнаруживали нормальный ответ на стимуляцию интактными облученными аллогенными селезеночными клетками или на стимуляцию субклеточными фракциями в присутствии облученных сингенных клеток селезенки [Maryanski e. a., 1980]. Таким образом, генерация вторичных киллеров из клеток памяти также

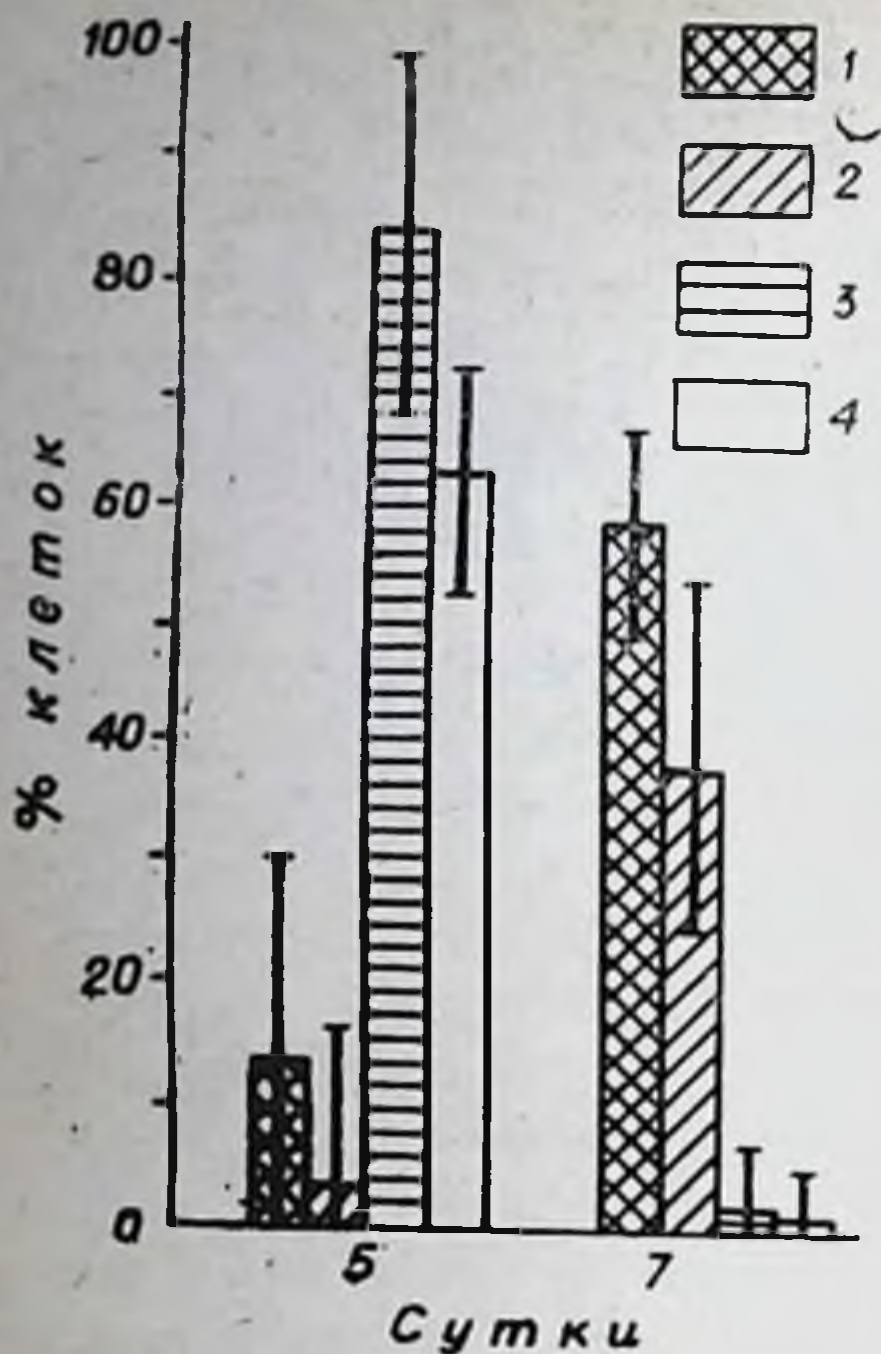


Рис. 7. Изменение пропорции лимфобластов и меченных ^3H -тимидином лимфоцитов, выделенных методом спонтанного осаждения в градиенте ТЭС с 5-го по 7-й день культивирования на монослое сингенных макрофагов

1 — малые лимфоциты; 2 — средние лимфоциты, 3 — бласты и большие лимфоциты; 4 — клетки, меченные ^3H -тимидином. Усредненные данные трех экспериментов.

полученных методом спонтанного осаждения в градиенте ТЭС, вводили внутривенно сингенным реципиентам, отличавшимся кариотипически и лишенным Т-клеток (тимэктомированным или облученным и обработанным антисывороткой плюс комплимент после введения сингенных клеток костного мозга). Потомки бластных клеток, имеющих маркерную хромосому Т6Т6, можно было проследить в организме мыши-реципиента с помощью кариологического анализа. Через 42 дня после переноса при рестимуляции селезеночных клеток реципиентов более 90% делящихся клеток имели маркер Т6Т6. Клетки лимфатических узлов тех же мышей отвечали очень слабо, хотя и с такой же скоростью. И через 14, и через 63 дня после переноса реактивность была одинаково ограниченной для клеток селезенки и отсутствовала в лимфоузлах [Andersson, Näygy, 1975].

По данным разных авторов, пик цитолитической активности в MLC

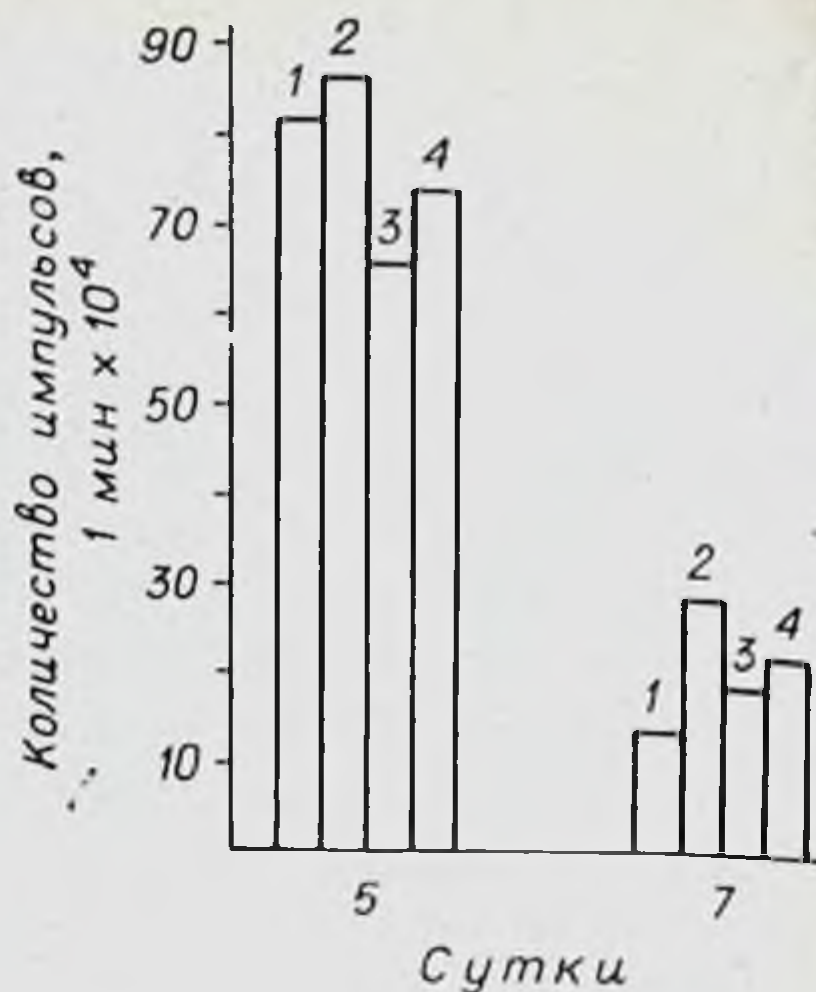


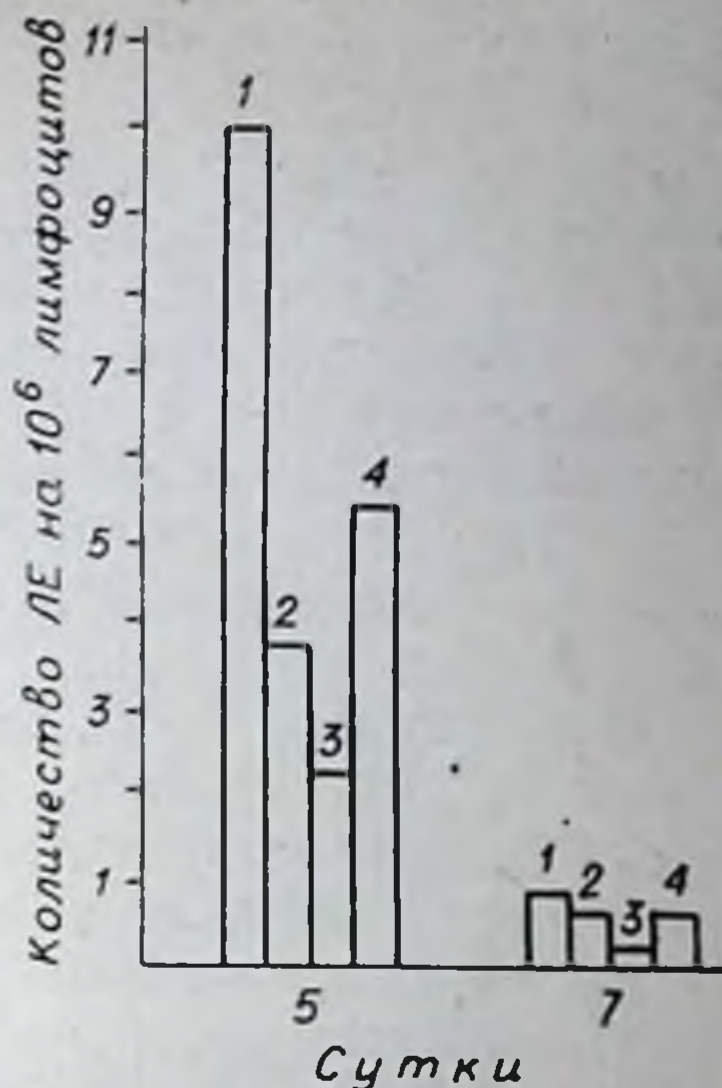
Рис. 8. Динамика синтеза ДНК в смешанной культуре лимфоцитов с 5-го по 7-й дни культивирования.

1 — 4 — количество экспериментов.

строго зависит от присутствия не Т-вспомогательных клеток.

Какова судьба клеток памяти? Эти сравнительно долгоживущие клетки заселяют селезенку и в меньшей степени лимфоузлы обнаруживаются в этих органах более чем через 20 нед после переноса. Фракцию Т-лимфобластов,

Рис. 9. Изменение цитолитической активности стимулированных лимфоцитов с 5-го по 7-й день культивирования, выраженное в литических единицах (ЛЕ).
Усл. обозн. см. рис. 8.



обнаруживается в интервале от 5-го до 11-го дня культивирования [McDonald e. a., 1975; Andersson, Häyry, 1975]. Клетки памяти принято изучать на 14-й день МЛС, что соответствует времени появления клеток памяти в селезенке аллоиммунизированных животных.

В наших экспериментах пик цитолитической активности наблюдается на 4—5-й день и затем цитолитическая активность снижается к 6—8-у дню культивирования. На 7—8-й день МЛС



Рис. 10. Дифференцировка цитолитического Т-лимфоцита от лимфобласта (а) до среднего и малого лимфоцита клетки памяти (с).

количество живых клеток составляет 60—70% от исходного. В культуре клеток, фракционированных в градиенте ТЭС на 5-й день MLC, содержание бластов и больших лимфоцитов уменьшается до 1—4%, пропорция средних лимфоцитов составляет 35—42%, пропорция малых лимфоцитов — 45—56%. Авторадиографически содержание меченных ^3H -тимидином клеток не превышает 1—2% (рис. 7). Синтез ДНК снижен в 4—5 раз по сравнению с клетками MLC 5-го дня культивирования (рис. 8). Цитологическая активность таких клеток снижается в среднем от 4,5 ЛЕ/ 10^6 лимфоцитов на 5-й день MLC до 0,5 ЛЕ/ 10^6 лимфоцитов на 7-й день (рис. 9).

В цитоплазме таких лимфоцитов, адсорбированных на поверхности КМ, отсутствуют трубчатые структуры, видны профили гладкого эндоплазматического ретикулума, зрелые секреторные гранулы, КГ представлен несколькими небольшими вакуолями. Таким образом, низкой цитолитической активности этих клеток морфологически соответствует отсутствие активации секреторного аппарата (рис. 15—18, приложение).

На рис. 10 представлена схема изменений в цитоплазме Т-киллера от стадии лимфобласта до среднего и малого лимфоцита — клетки памяти.

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА СЕКРЕТОРНОГО АППАРАТА В ЦИТОПЛАЗМЕ ВТОРИЧНЫХ Т-КИЛЛЕРОВ

В лимфоузлах, дренирующих кожный гомотрансплантат, описаны большие пиронинофильные клетки, иммунобласты [Dameshek, 1963]. Количество иммунобластов достигает максимума через 4 дня после трансплантации [Scothorne, McGregor, 1955; Burwell, Gowland, 1960]. Мононуклеарные клетки и большие пиронинофильные лимфоциты в трансплантационном ложе обнаруживаются на 5—7-й день после пересадки, а отторжение трансплантата продолжается до 10—12-го дня [Medawar, 1944]. *In vitro* при однократной иммунизации облученными клетками аллогенной селезенки лимфобласты, обладающие цитолитической активностью, обнаруживаются, как было показано, на 4—5-й день культивирования, а на 7—8-й день при отсутствии антигена превращаются в малые и средние лимфоциты, не способные убивать клетки-мишени.

Чтобы приблизить условия эксперимента *in vitro* к естественным условиям отторжения аллотрансплантата *in vivo* и проследить дифференцировку секреторного аппарата в цитоплазме лимфоцитов, мы провели одно- и двукратную рестимуляцию Т-киллеров.

Рестимуляцию проводили на 7—8-е сут MLC сразу после появления вторичных лимфоцитов. Синтез ДНК незначительно увеличивается в первые 24 ч после рестимуляции и резко возрастает через 48 ч. Через 72 ч синтез ДНК падает до исходного уровня (рис. 11).

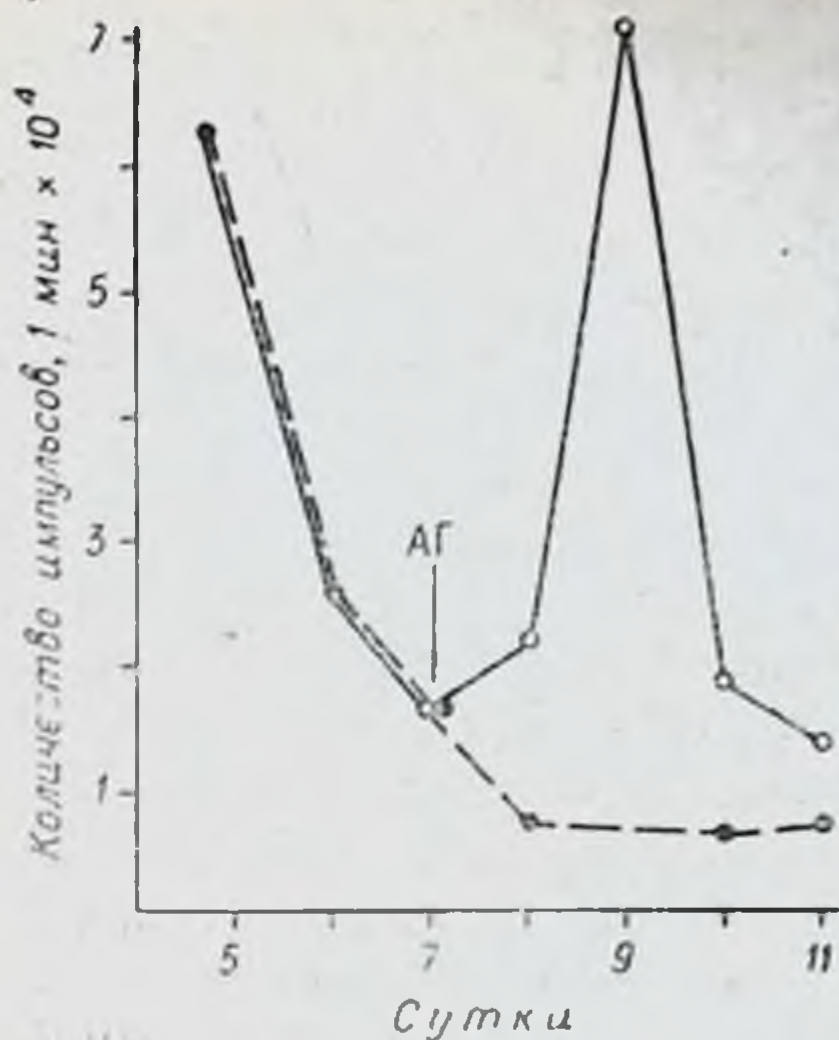


Рис. 11. Динамика синтеза ДНК после рестимуляции клеток памяти. Сплошная линия — рестимулированная культура; пунктирная линия — интактная MLC. АГ — рестимуляция антигеном. Усредненные данные трех экспериментов.

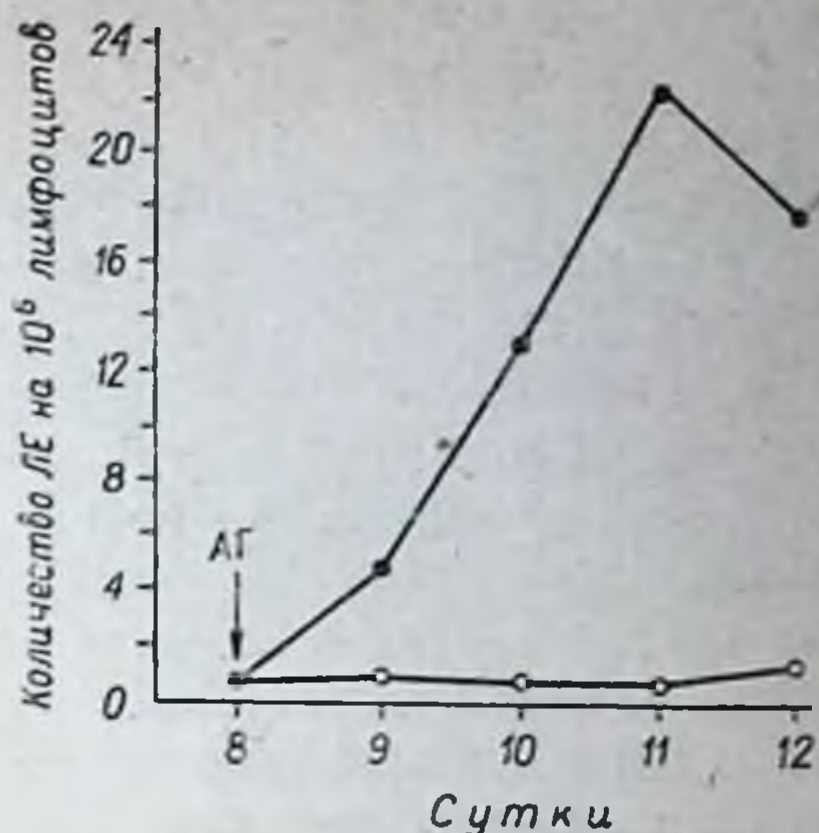


Рис. 12. Цитолитическая активность лимфоцитов, рестимулированных на 8-е сут MLC. Обозначения: сплошная линия — рестимулированная культура; пунктирная линия — интактная MLC. АГ — рестимуляция антигеном. Усредненные данные четырех экспериментов.

вых суток почти в 10 раз. В следующие 24 ч количество ЛЕ на 10^6 клеток в среднем увеличивается с 4,85 до 12,4. Пик цитолитической активности наблюдается на 3-й сут после рестимуляции, причем цитолитическая активность культуры вновь увеличивается почти в 2 раза, до 22 ЛЕ (рис. 12).

Цитолитическая активность лимфоцитов, не зависящая от синтеза ДНК в первые 24 ч после рестимуляции, составляет в среднем 5 ЛЕ на 10^6 клеток, т. е. доходит до уровня литической активности 5-го дня MLC. Очевидно, повторный контакт с антигеном является стимулом для активации секреторного аппарата Т-киллеров, а последующая пролиферация обеспечивает увеличение количества Т-киллеров и наращивание литического потенциала. Если через 2 сут после рестимуляции в культуре преобладают лимфобласты, то на 4—5-е сут популяция состоит главным образом из средних и малых лимфоцитов. Такие лимфоциты обладают высокой цитолитической активностью, которая сочетается с наличием характерных морфологических признаков.

Через 15 мин после адсорбции вторичных Т-киллеров на поверхности КМ в цитоплазме этих клеток обнаруживаются цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума, митохондрии, скопления рибосом, липиды, многочисленные секреторные гранулы (рис. 19, 20, приложение). После 30—60 мин взаимодействия КГ в большинстве клеток ориентирован в зону контакта с КМ

(рис. 21—23, приложение). Наиболее хорошо развит вакуолярный аппарат комплекса Гольджи. В зоне КГ локализуются многочисленные секреторные гранулы различной электронно-оптической плотности. В цитоплазме лимфоцитов обнаруживается особенно большое количество цитолисом различной величины, электронно-оптической плотности и ультраструктурной организации (рис. 24—30, приложение). Диаметр небольших органелл составляет 1—1,5 мкм. В процессе формирования цитолисом в их состав могут включаться различные органоиды лимфоцита, в частности, липидные вакуоли (рис. 24, приложение). В цитоплазме вторичных Т-киллеров регулярно обнаруживаются мультивезикулярные тельца, содержащие скопления небольших вакуолей (рис. 28, приложение), некоторые из них заполнены электронно-оптически плотным материалом (рис. 29, 30, приложение). Различную электронную плотность имеют также опушенные везикулы, локализующиеся в различных участках цитоплазмы лимфоцита.

Все вышеописанные структуры — секреторные гранулы, мультивезикулярные тельца, цитолисомы, опушенные везикулы — перемещаются к поверхности лимфоцита, по-видимому, с помощью микротрубочек и микронитей, которые обнаруживаются в большом количестве в гиалоплазме вторичного Т-киллера через 30—60 мин после контакта с клеткой-мишенью (рис. 31, приложение).

Выход содержимого секреторных гранул, мультивезикулярных телец и цитолисом (рис. 32—36, приложение) осуществляется вследствие слияния оболочек этих структур с плазматической оболочкой лимфоцита. Содержимое секреторных гранул, мультивезикулярных телец и цитолисом обнаруживается в межклеточном пространстве, в зоне контакта лимфоцита и клетки мишени (рис. 33—36, приложение). На электронно-микроскопических фотографиях в дно, что мембраны цитолисом подвергаются деструкции (рис. 36, приложение), вследствие чего содержимое цитолисом и секреторных вакуолей вступает в непосредственный контакт с мембраной клетки-мишени.

Выход гипотетического секрета из цитоплазмы лимфоцита может осуществляться вакуолями КГ, опушенными везикулами, мультивезикулярными тельцами или в цитолисомах. В двух последних случаях секретлируемый продукт может быть выделен в собственной мембране.

* *
*

Изучение дифференцировки секреторного аппарата эффекторных Т-лимфоцитов — необходимое условие для выяснения механизма их действия, и, в частности, для выяснения механизма действия Т-киллеров на клетки-мишени. Если в цитоплазме Т-киллеров синтезируется некий секрет, ответственный за гибель клеток-мишеней, синтез, депонирование и выведение секретлируемого про-

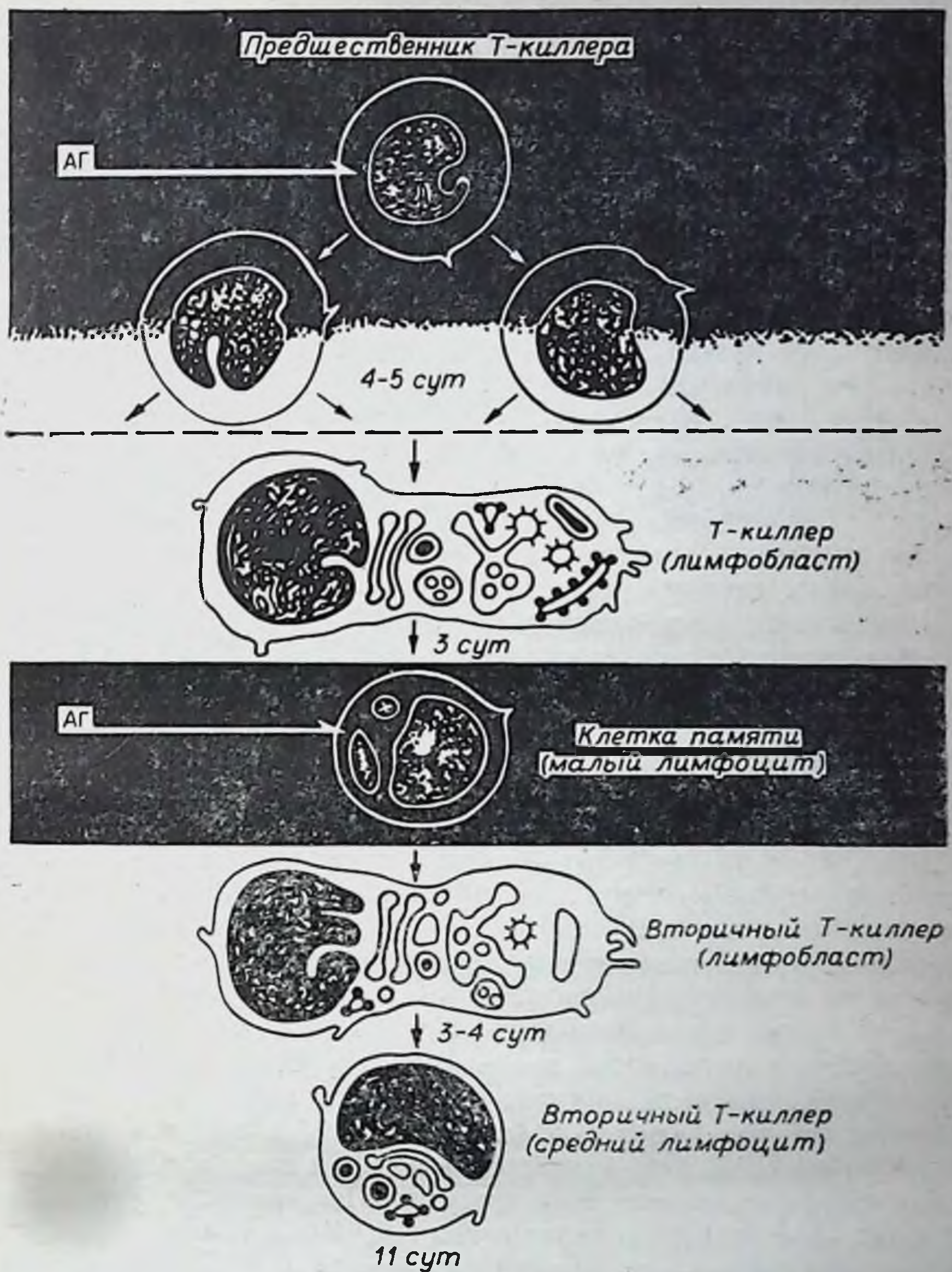


Рис. 13. Схема дифференцировки Т-киллера. Клетка-предшественник пролиферирует под действием аллоантигена до стадии цитолитического лимфобласта, который при отсутствии повторного стимула превращается в клетку памяти, не обладающую цитолитической активностью. При рестимуляции специфическим антигеном клетка памяти в течение 24 ч превращается во вторичный киллер (лимфобласт) и через 3—4 сут в средний и малый лимфоцит с высоким литическим потенциалом.

дукта, очевидно, находятся в прямой зависимости от стадии дифференцировки лимфоцита.

На рис. 13 представлена схема дифференцировки секреторного аппарата Т-киллеров. Цитолитическая активность лимфоцитов после первичной антигенной стимуляции обнаруживается на 3-й сут и достигает максимума на 4—5-е сут. Появлению цитолитической активности предшествует бласттрансформация и пролиферация клона эффекторных лимфоцитов, обеспечивающих генерацию Т-киллеров. На этом этапе, как было показано, цитолитической активностью обладают лимфобласты и большие лимфоциты. В цитоплазме клеток, адсорбированных на поверхности мишеней, обнаружен развитый секреторный аппарат: трубчатые структуры и комплекс трубчатых структур, заполненные гомогенным осьюофильным содержимым, формирующиеся незрелые и зрелые секреторные гранулы, опущенные везикулы, мультивезикулярные тельца и гипертрофированный аппарат Гольджи. Для изучения ультраструктуры Т-киллеров, чтобы избежать примеси В-клеток, использованы стимулированные *in vitro* лимфоциты тимуса.

В отсутствие повторного антигенного стимула лимфобласты и большие лимфоциты превращаются в средние и малые лимфоциты, не способные лизировать клетки-мишени. Это так называемые вторичные лимфоциты, в популяции которых содержатся клетки памяти. Признаков активации секреторного аппарата в цитоплазме вторичных лимфоцитов, адсорбированных на поверхности клеток-мишеней, не обнаружено.

Через 24 ч после рестимуляции вторичные лимфоциты восстанавливают свою литическую активность, а через 72 ч литический потенциал вновь пролиферирующей культуры увеличивается в 4—5 раз по сравнению с цитолитической активностью этих лимфоцитов на пике первичного иммунного ответа. Вторичные Т-лимфобласты киллеры также превращаются в средние и малые лимфоциты, высокий литический потенциал которых сохраняется в течение нескольких дней. В цитоплазме таких лимфоцитов, адсорбированных на поверхности клеток-мишеней, обнаруживается гипертрофированный КГ, ориентированный в зону контакта с КМ, многочисленные секреторные вакуоли, цитолисомы, опущенные везикулы, мультивезикулярные тельца. В межклеточном пространстве, замкнутом мембранами лимфоцита и КМ, видны разрушенные цитолисомы, секреторные вакуоли, частично покрытые мембраной, а также содержимое секреторных вакуолей.

Вторичные Т-киллеры, имеющие размеры малых и средних лимфоцитов, появляются на 11—12—14-е сут МЛС, если рестимуляция была проведена на 7—8-е сут. Можно утверждать, что такие лимфоциты соответствуют Т-киллерам, выделяемым при иммунизации *in vivo*, и, в частности, малым и средним лимфоцитам перитонеального экссудата, получаем на 11—12 день после иммунизации мышей «аллогенными опухолевыми клетками».

Таким образом, литический потенциал Т-киллеров возрастает

за счет дифференцировки секреторного аппарата, активированного повторной антигенной стимуляцией. Теоретически ультраструктура субпопуляций эффекторных Т-лимфоцитов не должна иметь каких-либо принципиальных различий, как, например, ультраструктура клонов плазматических клеток, синтезирующих разные типы иммуноглобулинов. Предложенная нами модель дифференцировки секреторного аппарата Т-киллеров, очевидно, в общих чертах представляет основные закономерности дифференцировки эффекторных Т-лимфоцитов.

Г л а в а IV

АКТИВАЦИЯ СЕКРЕТОРНОГО АППАРАТА Т-КИЛЛЕРОВ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С КЛЕТКАМИ-МИШЕНЯМИ

Изучение функциональной активности и морфологии эффекторных Т-лимфоцитов, адсорбированных на поверхности КМ, выявило наличие секреторного аппарата в цитоплазме последних. Исследование синтеза, депонирования и выхода гипотетического секрета имеет, с нашей точки зрения, решающее значение для выяснения механизмов действия Т-киллера на клетку-мишень. В связи с этим представляется важным рассмотреть имеющиеся в литературе сведения о функции и морфологии секреторных клеток.

МЕХАНИЗМЫ СЕКРЕЦИИ

Продукты секреции обычно представляют собой сочетания белков и липидов, белков и углеводов или всех трех классов соединений. Продукты секреции образуются в результате своего рода сборки, которая складывается из ряда последовательных этапов с участием различных компонентов клетки. Эти этапы соответствуют определенным стадиям метаболизма, причем компарментализация обеспечивает высокую эффективность процессов.

1. Первым этапом секреции является включение аминокислот в полипептидные цепи полисомами, расположенными на мембранах гранулярного эндоплазматического ретикулума.

2. На втором этапе процесса вновь синтезированные полипептиды переносятся в цистернальные пространства гранулярного эндоплазматического ретикулума (стадия сегрегации). При этом может происходить связывание между собой отдельных цепей или их конформационные изменения [Vassalli e. a., 1971; Cioly, Lennox, 1973; Stevens, Williamson, 1973]. Так, например, через 1,5 мин после введения мышам ^3H -лейцина метка обнаруживается преиму-

щественно в области ядра и шероховатого ретикулума плазматической клетки, тогда как через 30 мин она концентрируется в области шероховатого ретикулума и КГ [Bouteille, 1970].

3. На третьем этапе секреторного процесса осуществляется транспорт протеина в КГ пузырьками Гольджи. Транзитные пузырьки, отделившиеся от гладкого ЭР, мигрируют в КГ, где они сливаются, добавляя мембрану к формирующемуся отделу КГ [Morre, Mollenhauer, 1964; Morre, Ovtracht, 1977].

4. Четвертый этап определяется как стадия концентрации белка в конденсирующих вакуолях КГ, где секрет подвергается созреванию и депонируется. Впервые биохимическое, электронно-микроскопическое и электронно-авторадиографическое исследование секреторной клетки проведено Паладе [Palade, 1966]. Через 3—5 мин после введения крысам ^3H -лейцина большая часть метки обнаруживалась в шероховатой эндоплазматической сети базальной части экзокринной клетки поджелудочной железы. Через 20—40 мин большая часть метки локализовалась в конденсирующих вакуолях, в дистальном участке КГ, и спустя час метка находилась в зимогеновых гранулах.

5. Пятая стадия характеризуется выходом секрета из клетки под действием соответствующих специфических стимулов. Однако выход секрета не всегда требует определенного стимула. Существуют клетки с непрерывным типом секреции, так называемые «нестимулируемые». Плазматическая клетка служит наглядным примером клеток такого типа.

Как известно, В-лимфоциты, клетки костно-мозгового происхождения трансформируются при контакте с антигеном в плазматические клетки, синтезирующие иммуноглобулин. Количество продуцируемых иммуноглобулинов находится в прямой зависимости от содержащихся в лимфоидной системе плазматических клеток. Ультраструктура плазматической клетки описана впервые Браунштейнером [Braunsteiner e. a., 1953], обнаружившими выраженный эндоплазматический ретикулум в цитоплазме этих клеток. Позже различные авторы подтвердили и дополнили эти исследования, которые суммированы в обзоре Бесси (1967).

На ранних стадиях развития плазматической клетки полости цистерн эндоплазматического ретикулума не расширены и содержат небольшое количество гомогенного вещества, характеризующегося низкой электронной плотностью. Позднее, примерно на 11—12-й день, наблюдается расширение цистерн, в которых это вещество накапливается в виде гранул и хлопьев, а в последующем появляются крупные сферические массы — тельца Русселя. Иногда это вещество конденсируется и образует кристаллы [Thiery, 1958]. И кристаллы, и тельца Русселя дают положительные реакции на белки и мукополисахариды, а использование меченых ферритином антител к гамма-глобулину позволило идентифицировать синтез разных типов иммуноглобулинов. Специфической особенностью плазматической клетки является также ги-

пертрофированный КГ. Ядро клетки сдвинуто к периферии, а КГ имеет полярность, связанную с секрецией. Цистерны КГ уплощены в проксимальном конце, прилежащем к ядру, и постепенно расширяются, превращаясь в гигантские вакуоли на дистальном конце. Кроме того, в области КГ выявляются так называемые транзитные пузырьки круглого эндоплазматического ретикулума и мелкие пузырьки КГ, которые играют значительную роль в выведении продуктов секреции [Tartakoff, Vassalli, 1977].

Таким образом, ультраструктура плазматической клетки имеет характерные особенности секреторных клеток. И хотя иммуноглобулины, из которых складывается набор антител организма, в обычном смысле слова не принято считать секреторными веществами, общая схема сборки и секреции иммуноглобулинов в основном соответствует модели, установленной для синтеза ряда продуктов секреции.

Ультраструктура эффекторного Т-лимфоцита, адсорбированного на поверхности клетки-мишени, во многом соответствует ультраструктуре секреторной клетки: хорошо развитый шероховатый и гладкий ретикулум, комплекс трубчатых структур, пертрофированный КГ, секреторные вакуоли и опущенные везикулы, многочисленные митохондрии свидетельствуют об активном синтезе и выведении секретиремого продукта. Секретиремые плазматической клеткой иммуноглобулины попадают в кровь и действуют на дистанции, тогда как для осуществления цитолитического эффекта Т-киллера необходим его непосредственный контакт с клеткой-мишенью. Возникает предположение, что Т-киллер является клеткой с прерывистым типом секреции, для которой контакт с КМ является стимулом для последующей активации секреторного аппарата и выделения секрета.

В клетках этого типа секретиремый продукт депонируется в секреторных вакуолях. Секреторные вакуоли тянутся от КГ к тому участку на поверхности клетки, где происходит выделение секрета и по пути постепенно созревают. Таким образом, продукты секреции все время перемещаются в одном направлении, а местоположение КГ изменяется в зависимости от направления потока секреции. Продукт секреции может накапливаться в цистернах и затем «отшнуровываться», будучи покрытым мембраной; при этом количество секрета возрастает в направлении к дистальному концу. Например, продукт секреции в экзокринных клетках поджелудочной железы накапливается и видоизменяется в конденсирующих вакуолях, лежащих вблизи дистального конца КГ и, как предполагается, мембраны этих вакуолей являются производными цистерн КГ [Jamieson, Palade, 1967, a].

Продукты, синтезированные в цистернах шероховатого эндоплазматического ретикулума, представляют собой простые белки, или полипептиды. Очень немногие клетки секретируют такие неизмененные белки. В большинстве случаев прежде чем покинуть клетку они претерпевают значительные изменения. И изменения

эти происходят в КГ, который активно участвует в процессе секреции, определяя характер секретируемых веществ и образование скелета молекул, из которых в последующем складываются сложные конечные продукты. Прежде всего это добавление к полипептидной цепи различного числа боковых олигосахаридных цепей, в результате чего могут образовываться высокомолекулярные гликопептиды, например, муцины. Присоединение углеводных цепей к полипептидам осуществляют гликолизирующие ферменты, содержащиеся в мембранах эндоплазматической сети и, главным образом, КГ. При изучении клеток щитовидной железы методом радиоавтографии меченная тритием манноза обнаруживалась сначала в эндоплазматической сети и затем в других участках клетки [Whur e. a., 1969].

Последующая модификация углеводной части молекулы заключается часто в присоединении сульфатных групп, как это, например, происходит при образовании муцинов [Neutra, Leblond, 1966]. Метаболизм неорганического сульфата изучен в ацинарных клетках поджелудочной железы методом электронной автордиографии [Berg, Young, 1971]. Через 10 мин после инъекции мышам сульфата ^{35}S метка обнаруживалась в области КГ. Через 30 мин большая часть радиоактивного материала перемещалась в конденсирующиеся вакуоли и затем в зимогеновые гранулы. Через 4 ч после инъекции часть зимогеновых гранул с радиоактивным содержимым секретируется и меченый материал появляется в системе протоков поджелудочной железы. Таким образом, КГ оказывается ответственным за концентрацию и упаковку пищеварительных ферментов, доставляемых из эндоплазматического ретикулула, и вовлечен в производство сульфатируемых мукополисахаридов, которые подвергаются упаковке вместе с ферментами в зимогеновых гранулах и секретируются вместе с ними.

Часто полипептиды, предназначенные для секреции, синтезируются в такой форме, которая не обладает биологической активностью конечного продукта. Например, β -клетками островков Лангерганса в поджелудочной железе синтезируется молекула проинсулина, состоящая из единичной полипептидной цепи и не обнаруживающая биологической активности. Только в КГ и в прилегающих к нему областях клетки в результате расщепления полипептидной цепи образуется активный инсулин, состоящий из двух полипептидных цепей, связанных между собой двумя дисульфидными связями [Jamieson, 1972].

Синтез липидов, как было показано, осуществляется в шероховатой и гладкой эндоплазматической сети [Stein, Stein, 1967]. Через 2 мин после введения ^3H -пальмитата и ^3H -глицерина голодавшим крысам метка обнаруживалась в элементах шероховатой и гладкой эндоплазматической сети клеток печени и через 5 мин метка концентрировалась в капельках, представляющих, очевидно, депонированные липиды, а через 10 мин перемещалась в КГ. Авторы полагают, что в области КГ секрет подвергается дополни-

тельной обработке, а вакуоли КГ используются в качестве транспортного средства для вывода секрета в межклеточное пространство. В последующем было замечено [Friedman, Cardell, 1972], что пузырьки, образующиеся из эндоплазматической сети и переносящие липид в КГ, сливаются только с теми участками аппарата Гольджи, которые примыкают к формирующимся секреторным вакуолям.

Синтез гликолипидов в КГ не был доказан, однако высказываются предположения, что сборка основных компонентов плазматической мембраны происходит в КГ и в последующем вакуоли КГ встраиваются в плазматическую мембрану клетки [Whaley e. a., 1972; Dauwander e. a., 1972]. Кроме того, среди гликолипидов есть соединения, содержащие галактозу, фукозу и сиаловую кислоту, которые, как было показано, включаются в биосинтез в области КГ.

Таким образом, синтез и формирование любого продукта секреции имеет одни и те же закономерности для разных типов секреторных клеток.

ВЫХОД СЕКРЕТА

Секреторные клетки делятся на 2 типа: клетки с непрерывным и прерывистым типом секреции. К первому относятся, как упоминалось выше, плазматические клетки, непрерывно синтезирующие и выделяющие иммуноглобулины, бокаловидные клетки пищеварительного тракта, которые секретируют пищеварительные ферменты и слизь, клетки Панета и некоторые другие. Экзоцитоз этих клеток носит непрерывный характер и продолжается в течение всей их относительно недолгой жизни.

Клетки второго типа депонируют синтезируемый продукт в секреторных гранулах, которые разгружаются только в ответ на специфические стимулы, различные для разных типов клеток. Например, для β -клеток поджелудочной железы, синтезирующих инсулин, таким стимулом является повышение концентрации глюкозы в окружающей среде, стимулом для выхода гистамина из тучных клеток является соответствующий комплекс антиген — антитело, а нейромедиаторы выделяются в ответ на нервный импульс. Последовательность событий, вызываемых действием стимула на секретирующую клетку, называют «сопряжением стимул — секреция» по аналогии с сопряжением процессов возбуждение — сокращение в мышце, так как процессы секреции подобно мышечному сокращению нуждаются в присутствии Ca^{2+} во внеклеточной среде. Экзоцитоз клеток с депонированным продуктом секреции связан с рядом факторов: наличием экстраклеточного Ca^{2+} , энергии, изменением уровня циклических нуклеотидов в цитоплазме и целостностью цитохалазин-колхицинчувствительных структур.

Ингибиторы экзоцитоза. Как известно, цитоскелет клетки составляет система микротрубочек и микрофиламентов, которые играют основную роль в контроле над формой и подвижностью клетки. Иммунологические исследования показали, что лейкоциты и другие немusечные клетки содержат миозин, аналогичный миозину гладкой мышцы. Микротрубочки и микрофиламенты состоят из актина и миозинподобных белков и создают каркас клетки и ее сократительную систему [Allison, 1973].

Процессы эндо- и экзоцитоза также непосредственно связаны с этой системой. Такие препараты, как колхицин и винбластин поражают систему микротрубочек, связываясь с субъединицами тубулина [Margolis, Wilson, 1977] и могут быть использованы как ингибиторы экзоцитоза. Например, колхицин подавляет выделение гистамина тучными клетками [Gillespie e. a., 1968], выход инсулина из β -клеток поджелудочной железы крысы [Lacy, 1975; Moskalewski e. a., 1980], выход лизосом в лейкоцитах человека [Malawista, Bodel, 1967].

Винбластин, как было показано, вызывает исчезновение микротрубочек и появление типичных паракристаллов в фолликулах цитоплазмы клеток щитовидной железы мыши. Винбластин ингибирует транспорт вновь синтезированного белка в проток фолликула, что связано со снижением образования экзоцитозных вакуолей и сокращением транспорта вновь образованных экзоцитозных пузырьков в проток фолликула [Ericson, 1980]. Цитохалазин Б, в свою очередь, влияет на функцию микрофиламентов, снижает вязкость актомиозинового комплекса, взаимодействуя с его актиновым компонентом [Spudich, Lin, 1972]. Цитохалазин Б ингибирует выход секреторного продукта в клетках щитовидной железы мыши [Williams, Wolf, 1971], в тучных клетках крысы [Org e. a., 1972]. Колхицин и винбластин вызывают дезорганизацию диктиосом аппарата Гольджи [Moskalewski e. a., 1975; Thyberg e. a., 1977].

Однако действие колхицина, винбластина и цитохалазина Б не распространяется на клетки с непрерывным типом секреции, так как, очевидно, маленькие пузырьки, содержащие продукт секреции, достигают плазматической мембраны без участия сократительной системы, как это было показано на примере плазматической клетки [Tartakoff, Vassalli, 1977] и плазматомы [Parkhouse, Allison, 1972].

Роль ионов кальция в секреции изучалась многими авторами. В частности, исследован выход инсулина, стимулированный глюкозой в изолированных островках Лангерганса, которые инкубировали в течение 40 мин в присутствии ^{45}Ca . Включение Ca^{2+} , индуцированное глюкозой, усиливалось в среде, где Na^{+} был частично замещен ионами K^{+} , и ингибировалось 2-дезоксиглюкозой, эпинефрином, диазоксидом, низкой температурой, высокими концентрациями ионов магния и низкими концентрациями Ca^{2+} . При этих условиях изменение включения ^{45}Ca шло параллельно

с секрецией инсулина [Malaisse-Lagae, Malaisse, 1971]. Концентрация ионов кальция в цитоплазме контролирует полимеризацию и деполимеризацию тубулина [Wiesenberg, 1972a, б], оказывает влияние на сборку микротрубочек [Schliwa, 1976] и в то же время является стимулятором цАТФ [Spence e. a., 1980]. Авторы показали, что экскреции гормона роста, индуцированной простагландином Е и 3-изобутил-1-метилксантином, предшествует аккумуляции цАМФ, для которого необходим внутриклеточный Ca^{2+} .

Использование антибиотиков, ионофора А23187 и Х537А, которые облегчают движение Ca^{2+} через биологические мембраны и таким образом резко снижают содержание внутриклеточного кальция при инкубации клеток в бескальциевой среде, позволило продемонстрировать параллельную ингибцию содержания цАМФ и подавление выхода секрета без изменения его биосинтеза [Mira-Moser e. a., 1976; Brown e. a., 1980].

Электронно-микроскопическое исследование клеток парашитовидной железы, инкубированных с ионофором Х537А, обнаружило селективные изменения в КГ. Изменения зависели от продолжительности экспозиции с антибиотиком: после 60 мин инкубации цистерны и пузырьки КГ выглядели раздутыми и дезорганизованными [Ravazzola, 1976]. Как было показано, разбухание цистерн КГ связано с ингибцией включения ^3H -глюкозозамина и ^{35}S сульфата в глюкозаминогликаны [Somlyo e. a., 1975]. Аналогичные изменения обнаружены также в цитоплазме плазматических клеток после инкубации с ионофором А23187 в отсутствие Ca^{2+} : массивная аккумуляция пузырьков в области КГ, гипертрофия некоторых пузырьков и исчезновение цистерн КГ [Tartakoff, Vassalli, 1977].

Следует отметить, что роль цАМФ в секреторной активности клеток в различных тканях не укладывается в рамки какой-либо простой и единой модели. Например, активаторы или дериваты цАМФ оказывают ингибирующее действие на выход гистамина из тучных клеток или экскрецию иммуноглобулина плазматическими клетками. Образование гемолитических бляшек лейкоцитами селезенки иммунных мышей ингибировалось дибутирил цАМФ, липиднорастворимым аналогом эндогенного нуклеотида; теофиллин, ингибитор деградации цАМФ, потенцировал эффект гистамина, изопротеренола и простагландинов; холерный энтеротоксин — активатор аденилатциклазы, продуцировал замедленную ингибцию бляшкообразования и параллельное усиление содержания в лейкоцитах цАМФ [Melmon e. a., 1974]. Тартакофф с сотрудниками [Tartakoff, Vassalli, 1977] не обнаружили влияния дериватов цАМФ или агентов, изменяющих уровни цАМФ и цГМФ в отсутствие экстраклеточного Ca^{2+} , на секрецию меченого по тритию иммуноглобулина.

Участие процессов дыхания в секреции было показано на примере плазматических клеток, обработанных *in vitro* дианис-тым калием, азидом натрия, ротеноном, антимицином А. Ингиби-

Т а б л и ц а 1

Сравнение условий механизмов секреции и цитолиза клеток-мишеней на стадии «летальный удар»

Изучаемая система	Условия	Тест	Ингибитор
Секреторная клетка	Ca^{2+} в среде 37°C , специфический стимул	Выход секретлируемого продукта	KCN, NaNO_3 антимицин А Колхицин: винбластин, цитохалазин В, NaNO_3 , ионофоры \times 537А и А23187 Стимуляторы и дериваты ЦАМФ для тучных и плазматических клеток
Т-киллеры, адсорбированные на КМ (стадия «летальный удар»)	Ca^{2+} в среде 37°C , контакт с КМ или КовА, или ФГА	Цитоллиз клеток-мишеней	NaNO_3 подацетат, ДМСО, фенол Цитохалазин В, колхицин Стимуляторы с цАМФ EDTA, ионофор А — 23817, $+22^\circ\text{C}$

Примечание. Специфический стимул необходим для клеток с прерывистым типом секреции; колхицин, винбластин и цитохалазин. В действуют только на клетки с упакованным секретом (с прерывистым типом секреции).

ция бляшкообразования не была связана с действием KCN на само анти тело или на синтез белка, так как предварительная 2-часовая инкубация иммунных селезеночных клеток с пуромицином или циклогексимидом не снижала бляшкообразования [Fitch e. a., 1968].

Как упоминалось выше, цитоллиз КМ разделен на три этапа: адсорбция Т-киллера на КМ, стадия «летальный удар» и последующий независимый лизис КМ. Процесс секреции можно разграничить на две стадии: 1) синтез и накопление специфического продукта (исключая клетки с непрерывным типом секреции) и 2) выведение продукта секреции. Очевидно, имеет значение изучение специфической стадии — выведения секреторного материала, которая, по-видимому, соответствует стадии «летальный удар» для Т-киллеров, адсорбированных на поверхности КМ.

Анализ условий, необходимых для получения эффекта, а также использование соответствующих ингибиторов дают возможность сравнить эти два процесса. Как показано в табл. 1, ингибиторы дыхания полностью подавляют выход секрета и цитоллиз КМ. Колхицин, винбластин и цитохалазин В оказывают ингибирующий эффект, воздействуя на систему микронитей и микротрубочек, осуществляющую выведение секреторных вакуолей из клетки. Удаление ионов Ca^{2+} из среды останавливает киллинг КМ и выход секрета, что демонстрирует ингибирующее действие ионофоров и ЭДТА. Стимуляторы цАМФ по-разному действуют на секреторные клетки, но ингибируют выход секрета из тучных и плаз-

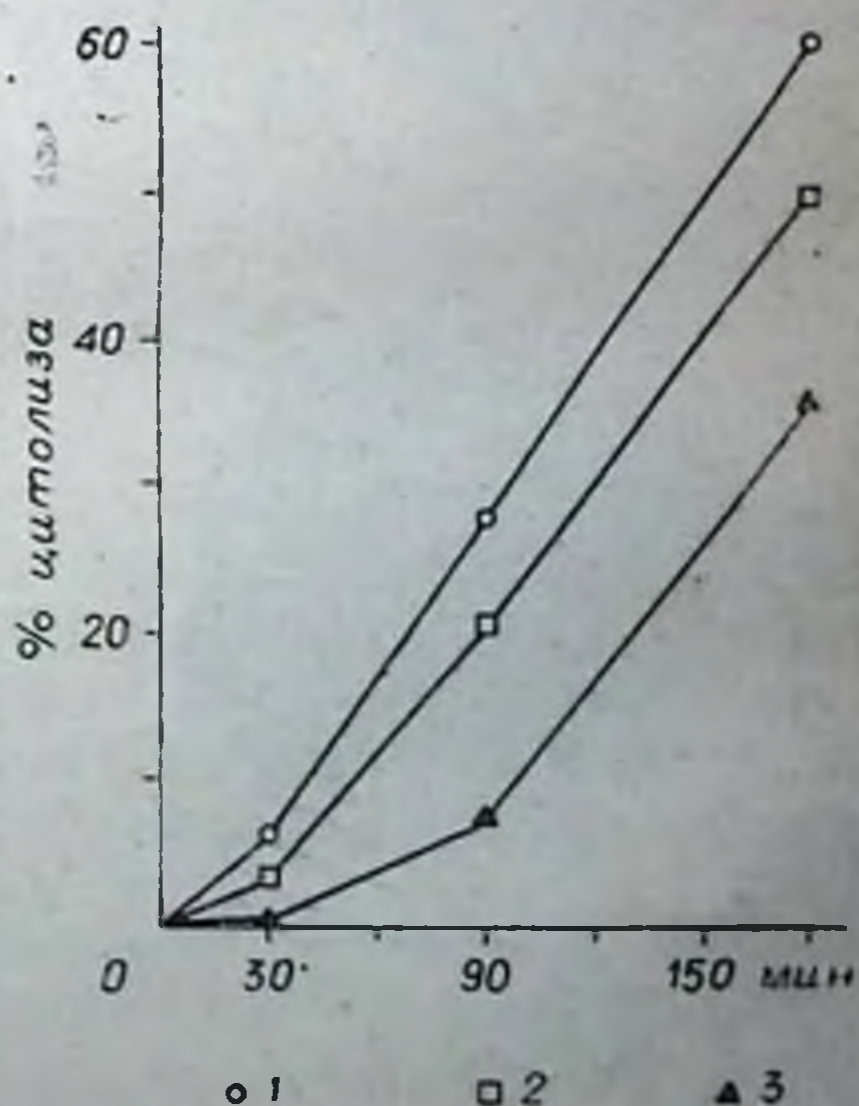
матических клеток, что соответствует их действию на Т-киллеры.

Таким образом, анализ условий, необходимых для секреции и киллинга КМ, а также клеточных механизмов, принимающих участие в этих процессах, позволяет заключить, что Т-лимфоцит киллер является секреторной клеткой. Стадия адсорбции лимфоцита на поверхности КМ служит, очевидно, специфическим стимулом для активации секреторного аппарата, выхода секреторных вакуолей и появления веществ, поражающих мембрану или, возможно, проникающих внутрь цитоплазмы КМ.

СВОЙСТВА Т-КИЛЛЕРОВ ПЕРИТОНЕАЛЬНОГО ЭКССУДАТА

Асцитная опухоль — удобная модель для изучения Т-киллеров, так как сразу после отторжения опухолевого трансплантата в перитонеальном экссудате наряду с макрофагами (количество которых достигает 50%) обнаруживаются лимфоциты, обладающие высокой цитолитической активностью [Berke e. a., 1972]. Показано, что эти клетки являются неприлипающими к нейлоновой вате малыми и средними лимфоцитами, которые обладают антигенными маркерами Θ , H-2, Ly 2, 3 [Cantor, Boyse, 1977] и уникальной антигенной детерминантой K_2 , которая характерна для цитолитических лимфоцитов перитонеального экссудата [Sullivan e. a., 1973]. Т-киллеры перитонеального экссудата могут быть выделены через 3 дня после введения облученных аллогенных опухолевых клеток, их литическая активность достигает максимума на 5—6-й день. Противоопухолевый иммунитет в этой системе обнаруживается также на 5-й день после введения опухолевого трансплантата. Т-киллеры перитонеального экссудата, иммунные к сингенной опухоли, обладают антигеном Thy, Ig-негативны [Schick, Berke, 1978]. Эти клетки представляют собой малые и средние лимфоциты, образующие прочные конъюгаты с опухолевой КМ. Такие конъюгаты служат удобной моделью для изучения механизма действия Т-киллеров и, в частности, для изучения их ультраструктуры в процессе взаимодействия с опухолевой КМ.

Рис. 14. Кинетика цитолиза клеток L-1210 (H-2^d) перитонеальными лимфоцитами мышей линии СЗН (H-2^k), полученными на 11-е сут после внутрибрюшинной иммунизации. Обозначения: соотношение лимфоцит: клетка-мишень 1 — 10:1; 2 — 5:1; 3 — 2,5:1.



Цитолитическая активность Т-киллеров, выделенных из перитонеального экссудата

Клетки-мишени	Т-киллеры	Соотношение лимфоцит:КМ	% цитолиза*
L 1210 (H-2 ^d)	СЗН (H-2 ^k)	10 : 1	58
		5 : 1	51,3
		2,5 : 1	36
L (H-2 ^k)	СЗН (H-2 ^k)	10:1	3,9
		5:1	2,5
		2:1	2,4

* Время инкубации 180 мин.

В наших экспериментах использованы очищенные от прилипающих клеток лимфоциты перитонеального экссудата мышей линии СЗН (H-2^k), полученные на 11-й день после иммунизации клетками асцитного лейкоза L-1210, перевиваемыми на мышях линии ДВА/2 (H-2^d).

Данные, представленные на рис. 14, показывают, что степень цитолиза зависит от времени инкубации и соотношения лимфоцит: КМ. Через 30 мин взаимодействия лизируется 7,1% КМ при соотношении 10 : 1 и 0,7% КМ при соотношении 2,5 : 1, через 3 ч соответственно 59 и 36% КМ.

Специфичность полученного эффекта продемонстрирована в табл. 2. Т-киллеры, выделенные от мышей СЗН (H-2^k), не способны лизировать L-клетки (H-2^k).

Так как ранее в цитоплазме лимфоцитов, образующих конъюгаты с КМ, не обнаружено каких-либо признаков, свидетельствующих о синтезе или накоплении специфического продукта [Koren e. a., 1973; Kalina, Ginsburg, 1975], мы изучили процесс взаимодействия Т-киллера и КМ в динамике [Быковская и др., 1977в, 1978; Bykovskaja e. a., 1978a, б; 1979].



Рис. 15. Схема ультраструктуры ЦТЛ через 5 мин после образования конъюгата.

1 — мембрана ЦТЛ; 2 — рибосомы; 3 — эндоплазматический ретикулум; 4 — увеличенные цистерны ЭР; 5 — незрелая секреторная гранула; 6 — зрелая секреторная гранула; 7 — кристаллоподобная структура; 8 — слияние кристаллоподобной структуры с секреторной гранулой; 9 — липидная вакуоль; 10 — полая липидная вакуоль; 11 — слияние липидной вакуоли с секреторной гранулой; 12 — комплекс Гольджи; 13 — гипертрофия КГ; 14 — предполагаемое слияние КГ с мембраной лимфоцита; 15 — мультивезикулярное тельце; 16 — неизменная митохондрия; 17 — гипертрофированная митохондрия; 18 — последовательные стадии образования цитолисом, включающих кристаллоподобные скопления рибосом; 19 — мембрана КМ; 20 — содержимое секреторных гранул и цитолисом в межклеточном пространстве между ЦТЛ и КМ; 21 — клетка-мишень.

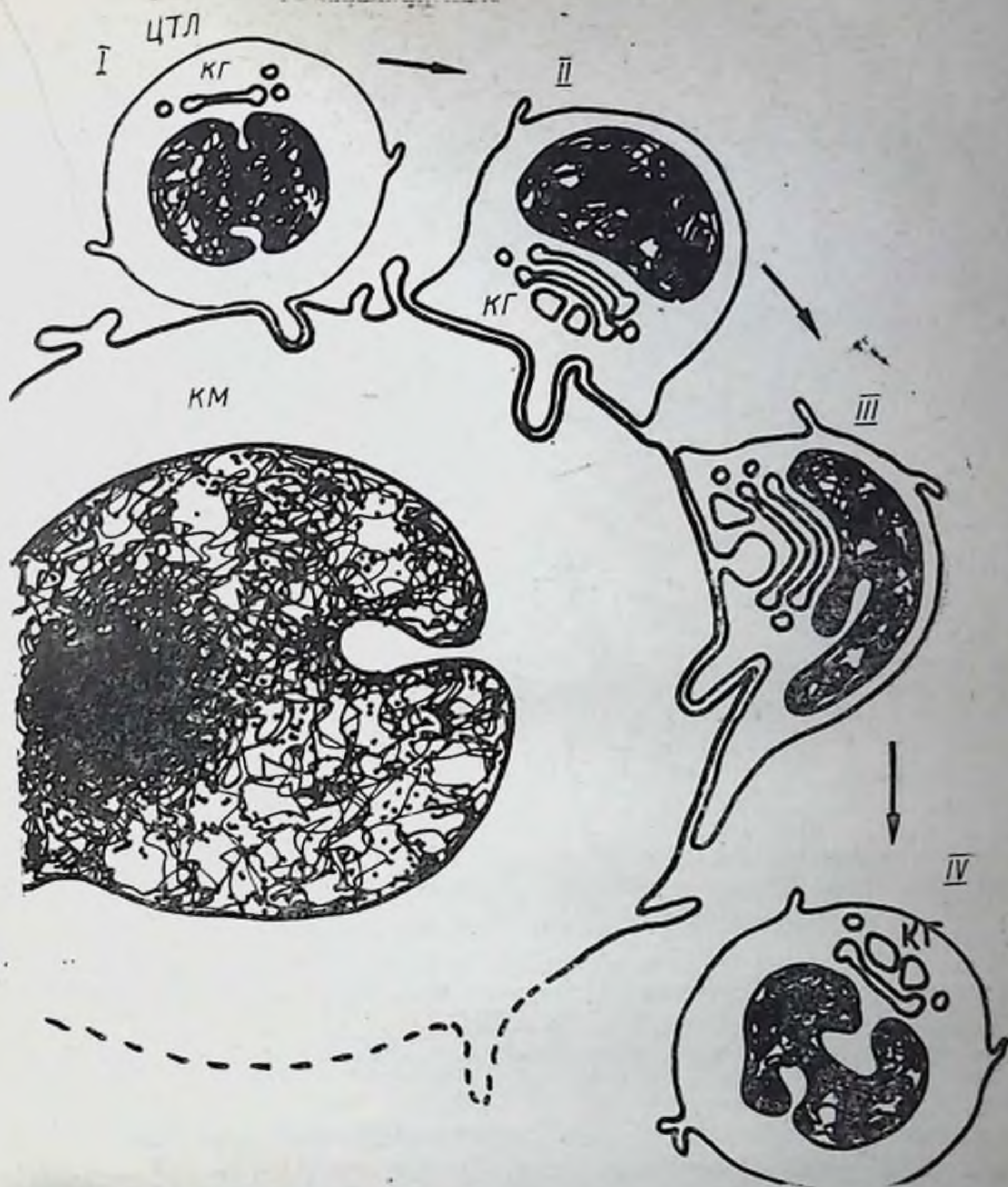


Рис. 16. Схематическое изображение изменения ультраструктуры цитолитического Т-лимфоцита (ЦТЛ) через 5 (I), 30 (II) и 60 мин (III, IV) после контакта с опухолевой клеткой-мишенью (КМ).

Ультраструктура Т-киллеров через 5 мин после образования конъюгатов лимфоцит — клетка-мишень. Малые и средние лимфоциты, образующие конъюгаты с КМ, имеют сферическую форму. Зона их контакта с КМ не превышает 5—15% поверхности лимфоцита. Лимфоцит легко отличим от КМ по величине, субмикроскопической организации и наличию в цитоплазме КМ скопления нуклеоидов онкорнавирусов типа А.

Как правило, только один лимфоцит адсорбирован на одной КМ (рис. 37, 38, приложение), однако есть конъюгаты, где 2—4 лимфоцита могут быть адсорбированы на одной КМ (рис. 39, 40,

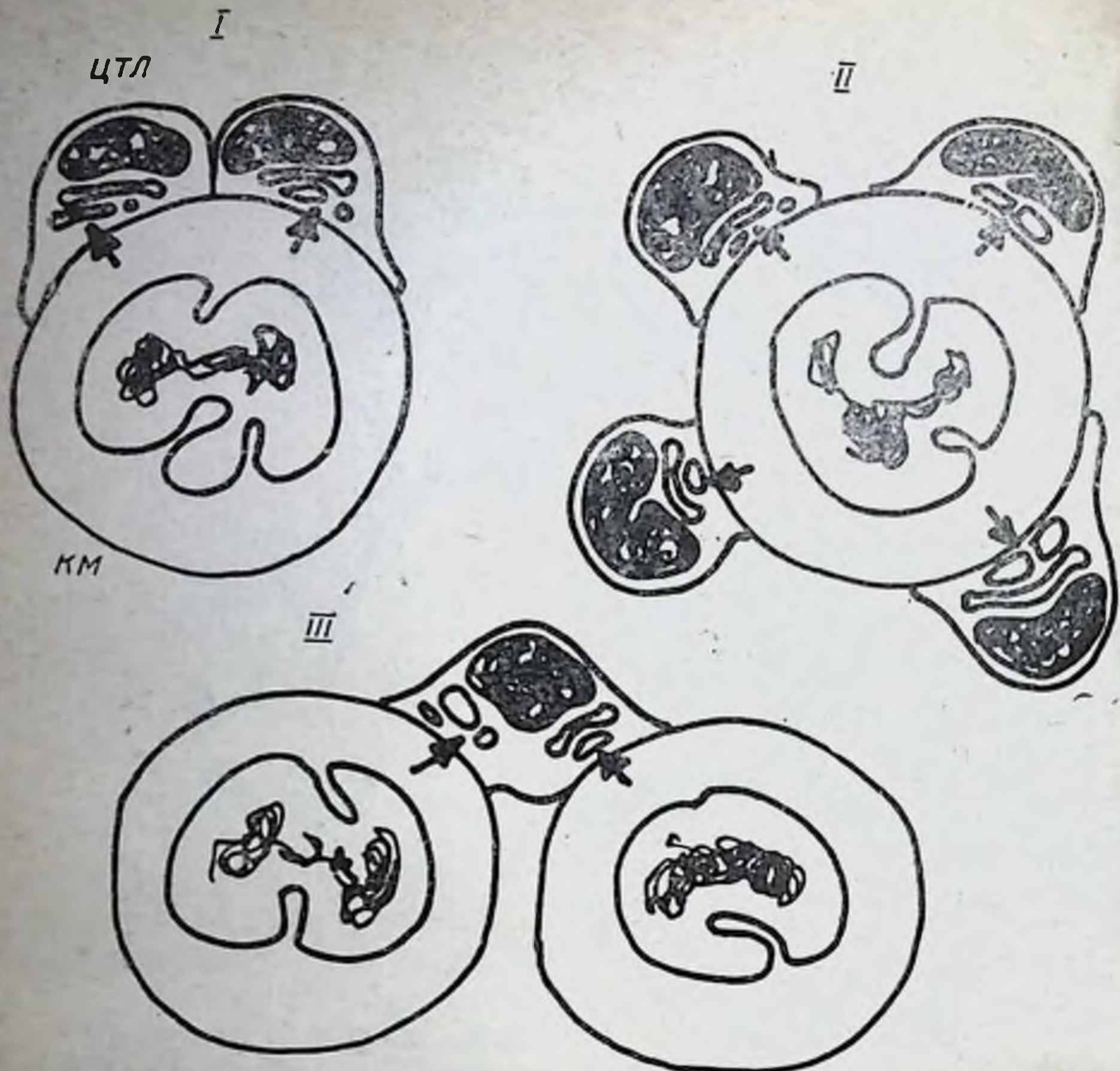


Рис. 17. Основные типы взаимодействия ЦТЛ и КМ через 60 мин после контакта (схема). Стрелками обозначена локализация комплекса Гольджи в ЦТЛ.

I — взаимодействие двух рядом расположенных ЦТЛ и КМ; II — взаимодействие нескольких ЦТЛ и одной КМ; III — взаимодействие одного ЦТЛ и двух КМ.

приложение), или, наоборот, один лимфоцит адсорбирован на двух КМ (рис. 41 приложение).

В цитоплазме лимфоцитов обнаруживаются вакуоли диаметром 200—300 нм, содержащие высококонтрастный осмифильный компонент. Морфологически эти структуры связаны со зрелыми секреторными гранулами.

Обнаружены кристаллоподобные структуры, которые характеризуются низкой электронно-оптической плотностью, имеют различные размеры, их длина достигает 4000 нм. Ограничивающая мембрана по ультраструктуре идентична мембране эргастоплазматического ретикулума.

Цитолисомы, содержащие скопления рибосом, ограничены мембраной. В некоторых случаях скопления рибосом формируют кристаллоподобные упаковки.

В цитоплазме лимфоцитов имеются также липиды, лизосомоподобные структуры, мультивезикулярные тельца, митохондрии.



Рис. 18. Схема ультраструктуры ЦТЛ после 30—60 мин взаимодействия с КМ. Усл. обозн. см. рис. 15.

Комплекс Гольджи мало дифференцирован, его локализация не связана с зоной контакта лимфоцита с КМ (рис. 15).

Подобную субмикроскопическую организацию имеют Т-киллеры, адсорбированные на поверхности КМ через 30 мин инкубации при 4°C, а также через 30—60 мин культивирования отдельно от КМ при температуре 37°C.

Ультраструктура Т-киллеров через 30—60 мин после образования конъюгатов с клеткой-мишенью. С увеличением времени инкубации Т-киллеры, адсорбированные на поверхности КМ, уплощаются, их ядра сдвигаются к противоположному от КМ полюсу и приобретают овальную форму; зона контакта с КМ увеличивается до 20—30% (рис. 42, приложение), образуются многочисленные цитоплазматические отростки. Через 15 мин инкубации появляются параллельные цистерны КГ, их количество увеличивается до 4—8, отмечены вакуоли КГ диаметром до 30—50 нм. Изменения, которые претерпевает аппарат Гольджи в процессе взаимодействия с КМ, схематически представлены на рис. 16. Цистерны эндоплазматического ретикулума локализуются возле проксимального конца КГ. На дистальном конце КГ появляются увеличенные вакуоли КГ диаметром до 100—150 нм. Гигантские вакуоли КГ диаметром до 300—700 нм появляются через 30 мин инкубации. Они образуются, очевидно, в результате слияния вновь появляющихся вакуолей, или увеличенных цистерн. Большая часть гипертрофированных вакуолей прозрачна, но некоторые из них заполнены осмниофильным содержимым. Через 30—60 мин после образования конъюгатов гипертрофированные ва-

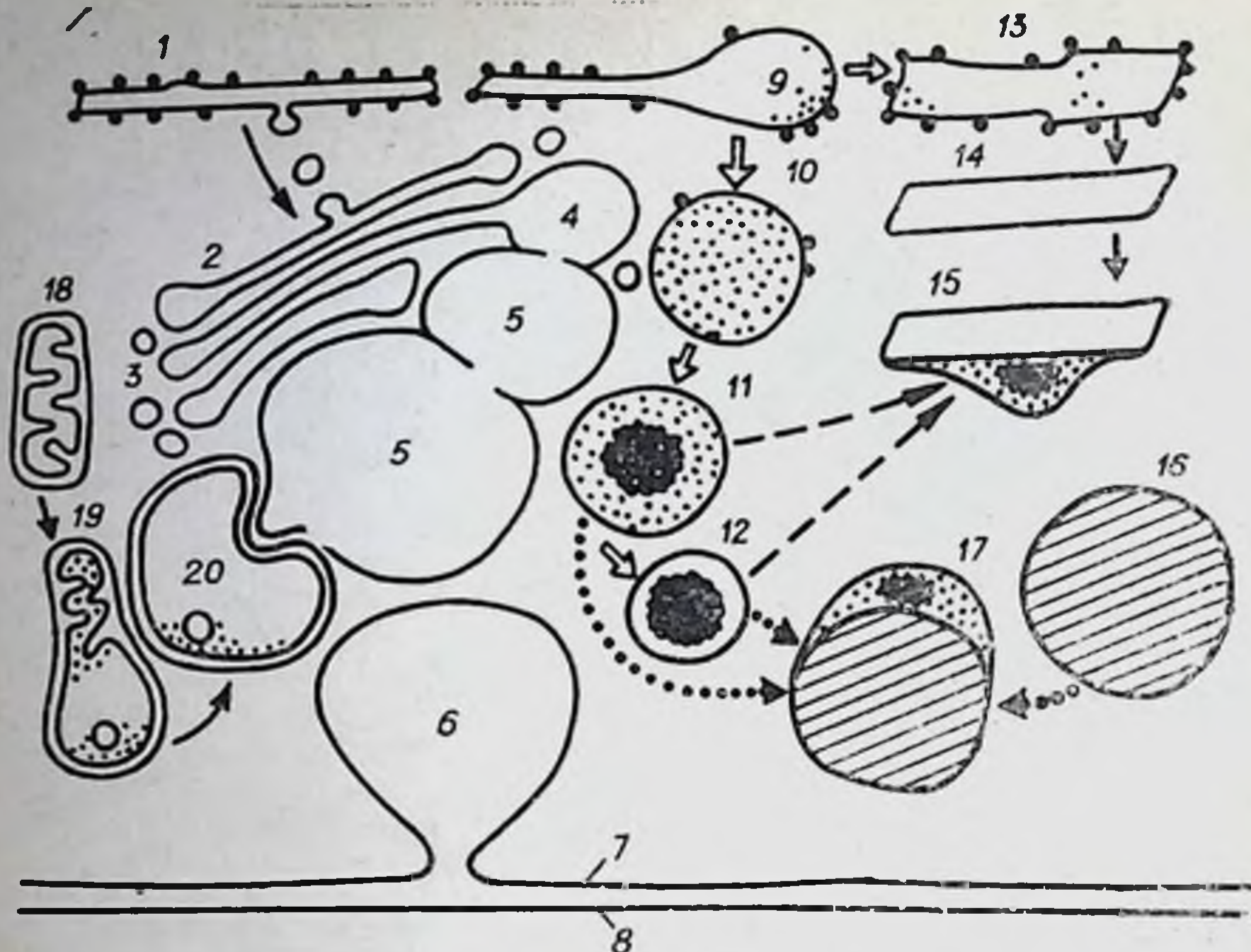


Рис. 19. Предполагаемый морфогенез внутриклеточных вакуолей и гранул в цитоплазме ЦТЛ после 30 мин взаимодействия с КМ (схема).

1 — эндоплазматический ретикулум; 2 — цистерны КГ; 3 — вакуоли КГ; 4 — увеличение вакуолей на проксимальном конце КГ; 5 — гипертрофированные вакуоли КГ; 6 — предполагаемые слияния вакуоли КГ с мембраной ЦТЛ; 7 — мембрана ЦТЛ; 8 — мембрана КМ; 9 — расширенная вакуоль эндоплазматического ретикулума; 10, 11 — незрелые секреторные гранулы. 12 — зрелая секреторная гранула; 13, 14 — последовательные стадии формирования кристаллоподобных структур из вакуолей эндоплазматического ретикулума; 15 — слияние кристаллоподобных структур с секреторными гранулами; 16 — липидная вакуоль; 17 — слияние липидной вакуоли с секреторной гранулой; 18—20 — последовательные стадии гипертрофии митохондрий.

куоли ориентированы в зону контакта лимфоцита и КМ и движутся к поверхности лимфоцита (рис. 43—46, приложение). В зоне контакта лимфоцита с КМ вакуоли КГ, очевидно, сливаются с плазмалеммой лимфоцита.

Если несколько лимфоцитов адсорбированы на поверхности одной КМ, КГ каждого из них ориентирован в зону контакта с КМ. Если один лимфоцит связан с двумя КМ, в его цитоплазме формируются два КГ и каждый из них ориентирован к соответствующей КМ (рис. 17).

Одновременно с гипертрофией и изменением ориентации КГ появляются незрелые секреторные гранулы, полиморфные вакуоли, заполненные осьюмфильным компонентом умеренной электронно-оптической плотности размером до 400—600 нм (рис. 43—47, приложение). Секреторные гранулы локализуются во всех областях цитоплазмы лимфоцита и нередко вблизи мембраны лимфоцита. В межклеточном пространстве в зоне контакта лимфоцита и КМ локализуются скопления осьюмфильного компонента,

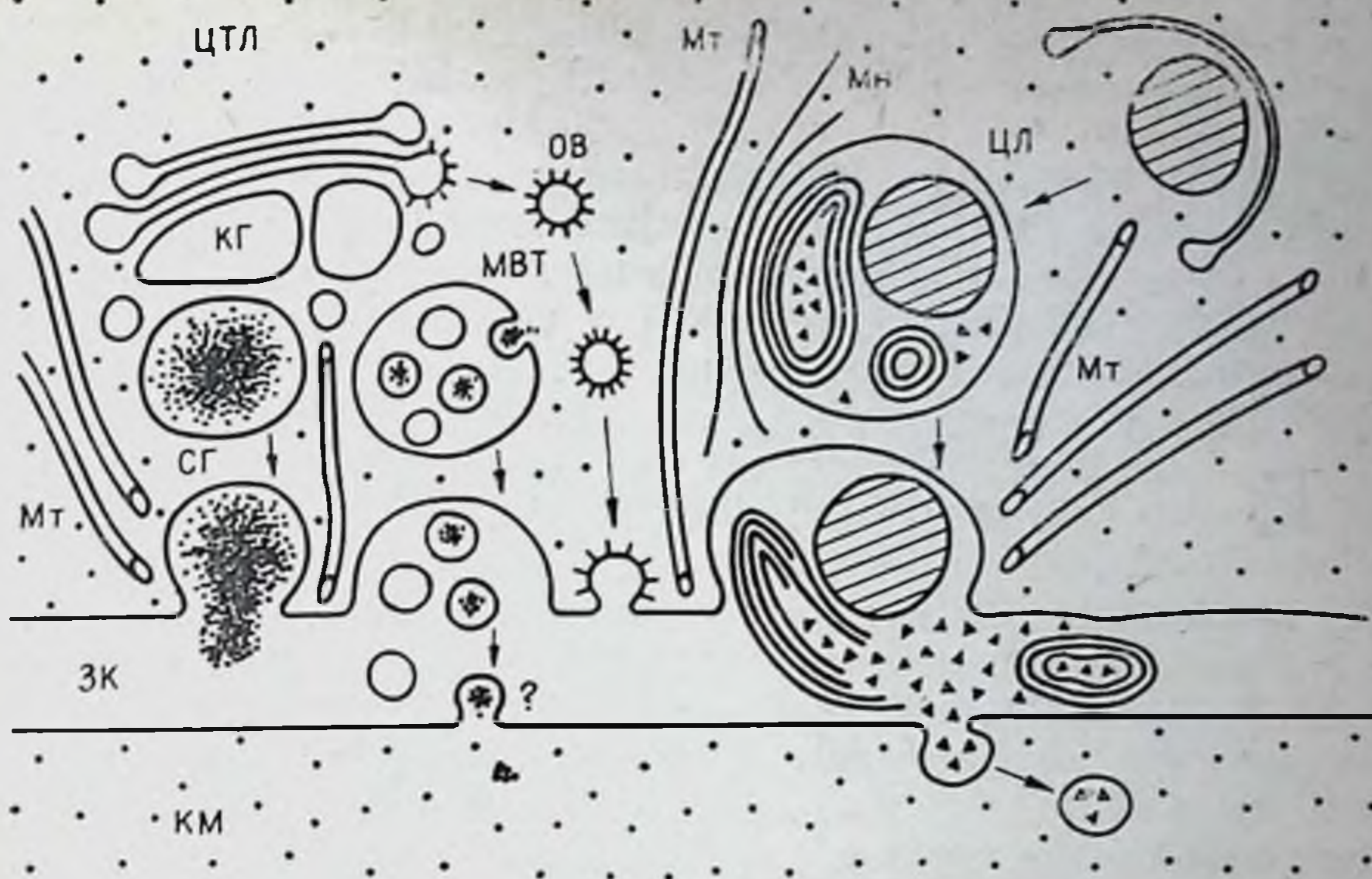


Рис. 20. Схематическое изображение предполагаемых вариантов выделения секрета из цитолитических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) в процессе взаимодействия с клеткой-мишенью (КМ).

Мт — цитоплазматические микротрубочки; КГ — комплекс Гольджи, СГ — секреторные гранулы; ЗК — зона контакта ЦТЛ и КМ; МВТ — мультивезикулярное тельце; ОВ — опушенные везикулы; Мн — микронитии; ЦЛ — цитолосома.

сходного по электронно-оптической плотности с содержимым секреторных гранул.

В процессе взаимодействия Т-киллера и КМ обнаруживается также слияние секреторных гранул с липидами и кристаллоподобными структурами (рис. 48—53, приложение). Наблюдается вакуолярное перерождение митохондрий, расположенных в зоне гипертрофированного КГ. Митохондрии округляются, увеличиваются в диаметре и превращаются в гигантские вакуоли диаметром 1500—2000 нм.

На рис. 18 схематически представлены изменения, происходящие в цитоплазме Т-киллера, взаимодействующего с КМ. Изменение ориентации цитоплазмы лимфоцита, увеличение поверхности контакта с КМ, гипертрофия и перемещение вакуолей КГ в зону контакта с КМ, появление незрелых секреторных гранул, слияние секреторных гранул с липидами и кристаллоподобными структурами и, наконец, обнаружение содержимого секреторных гранул в межклеточном пространстве, ограниченном мембранами лимфоцита и КМ, — все это свидетельствует об активации секреторного аппарата в цитоплазме Т-киллера после его адсорбции на поверхности КМ.

Морфогенез гипотетического секрета можно представить следующим образом (рис. 19): специфический продукт синтезируется в дистернах гранулярного Эр, затем переносится в гладкий Эр

и последовательно в КГ, где он аккумулируется и формируется в незрелых и зрелых секреторных гранулах. Одновременно в цистернах Эр формируются, очевидно, кристаллоподобные структуры. Контакт Т-киллера с КМ является, очевидно, специфическим стимулом, который индуцирует активацию митохондрий, гипертонию и изменение ориентации КГ, слияние секреторных гранул с кристаллоподобными структурами и липидами и их миграцию в межклеточное пространство (рис. 20).

МОРФОЛОГИЯ ЭКЗОЦИТОЗА

По мере того, как продукт секреции проходит через КГ, он концентрируется, конденсируется, подвергается ряду химических изменений. Окончательно сформировавшаяся секреторная гранула находится в цитоплазме до появления специфического стимула, необходимого для активации системы, обеспечивающей выход депонированного секрета.

Выход секрета (экзоцитоз) определяет конечную стадию секреции. В основном экзоцитоз описывался как процесс слияния мембраны секреторной вакуоли с наружной мембраной клетки и последующего выхода секретиремого материала в межклеточное пространство. Перед слиянием взаимодействующие мембраны приходят в близкий контакт и их прилежащие слои формируют пенталаминарные структуры. Последующая элиминация внутренних слоев этих структур приводит к образованию гибрида — триламинарных мембран. В месте слияния образуется отверстие и в открывшемся кольце смыкаются две мембраны-партнеры [Palade, 1975].

Метод «замораживание — скалывание» позволил обнаружить новые данные по механизму экзоцитоза, характерные для секретирующих клеток, так как обычные электронно-микроскопические методы не дают возможности выяснить, какие именно перестройки происходят в мембранах. Слияние мембран отражает процесс перераспределения молекул, в результате которого одна мембрана сливается с другой.

Основной компонент большинства клеточных мембран — двойной слой липидных молекул толщиной 4,5 нм. Второй компонент составляют белки, которые находятся на поверхности мембраны, погружены в слой липида либо пронизывают мембрану насквозь. Проникающие белки называют интегральными или внутренними, а поверхностные — наружными. При использовании метода криоскалывания клеточные мембраны быстро замораживают при температуре жидкого азота и легким ударом раскалывают вдоль плоскости наименьшего сопротивления, которая проходит между двумя липидными слоями. На платино-углеродной реплике, полученной с поверхности скола, путем напыления оказываются две полумембраны, представляющие половины двойного липидного

слоя. Интегральный белок или комплекс липида с белком, оказавшиеся в плоскости скола на фоне гладкой поверхности липидного слоя, имеют вид гранул или углублений. Такие белки принято называть внутримембранными гранулами (ВМГ). По изменениям плотности или характера расположения ВМГ судят о перемещении белковых молекул в плоскости мембраны.

При изучении экзоцитоза в секреторных клетках проанализировано 3 этапа сборки и функционирования ВМГ: образование розетки, кольца и отверстия. Розетка представляет собой дезагрегацию ВМГ на комплементарных участках мембран секреторной гранулы и клеточной оболочки; функция кольца, очевидно, заключается в том, чтобы повысить прочность мембраны и служить зоной стабилизации, вокруг которой мембрана секреторной гранулы сливается с плазматической мембраной клетки. Сборка розетки сопровождается появлением Ca^{2+} -АТФазной активности [Plattner e. a., 1977] и актиновых волокон, связанных с частичками розетки и ответственных за стабильность агрегата [Beisson e. a., 1980; Chandler, Heuser, 1980]. Появление фиброзных структур в момент связывания секреторных вакуолей, формирующихся перед слиянием с плазматической мембраной, интерпретируется как «стадия распознавания» [Aupus e. a., 1979]. Так как сокращение актиновых волокон находится в прямой зависимости от содержания Ca^{2+} , Ca^{2+} -АТФазная активность может соответствовать насосу, поддерживающему локально низкие концентрации Ca^{2+} и таким образом препятствуя слиянию мембран [Beisson e. a., 1980].

В процессе экзоцитоза в тучных клетках, стимулированных синтетическим поликатионом, образуются единичные поры с узкой шейкой (до 0,05 мкм в диаметре), соединяющие отдельные секреторные гранулы с плазматической мембраной. Зачастую отверстие формируется даже тогда, когда вакуоль остается отделенной от плазматической мембраны на расстояние 0,1 мкм. Образовавшиеся поры представляют собой каналы, соединяющие секреторную вакуоль с внеклеточным пространством. Иногда секреторные вакуоли бывают соединены группой из 2—4 пор [Chandler, Heuser, 1980].

В наших исследованиях при использовании метода криоскалывания [Шевелев, Быковская, 1981] на репликах, полученных через 15 мин взаимодействия Т-киллера и КМ, видны аналогичные изменения: в участке цитоплазмы, ориентированном в сторону КМ, концентрируется значительная часть клеточных органоидов: митохондрии, профили шероховатого и гладкого эндоплазматического ретикулума, полиморфные вакуоли, аппарат Гольджи (рис. 46, 54—56, приложение). Видны крупные липидные вакуоли, которые располагаются группами по 2—3 или рассеяны по отдельности. Размеры вакуолей колеблются от 1 до 1,5 мкм. Наблюдаются липиды, соединенные с вакуолью, покрытой миелиновой оболочкой (рис. 55, 56 приложение). После 30 мин взаимодействия

значительно увеличивается площадь контакта Т-киллера и КМ, размеры митохондрий значительно возрастают, в гипертрофированных митохондриях сглаживаются кристы и их количество уменьшается.

Обращает на себя внимание увеличение протяженности цистерн эндоплазматического ретикулума. Цистерны шероховатого и гладкого Эр можно наблюдать по всему периметру цитоплазмы лимфоцита (рис. 55, 56, приложение). Профили Эр располагаются также вокруг гипертрофированных вакуолей КГ.

Гигантские вакуоли КГ ориентированы в зону контакта с КМ (рис. 46, приложение). Вокруг КГ концентрируются многочисленные полиморфные вакуоли диаметром 150—500 нм. Вакуоли окружены трехслойной оболочкой, в которой расположение внутримембранных гранул идентично их распределению в мембранах КГ.

Через 15—60 мин взаимодействия Т-киллера и КМ прослеживается выход вакуолей через оболочку лимфоцита (рис. 54—57, приложение). С увеличением времени взаимодействия на поверхности лимфоцита появляется выраженная складчатость мембраны, которая на ультратонких срезах представлена многочисленными микроворсинками.

На репликах оболочки лимфоцита выявляются участки мембраны, лишенные ВМГ и ограниченные валиком из равномерно расположенных ВМГ. Эти структуры, очевидно, представляют собой места слияния мембраны секреторной вакуоли и цитоплазматической мембраны лимфоцита. Внутренний диаметр их равняется 60 нм. Наружный диаметр — 80 нм (рис. 56, приложение). На внутренней поверхности цитоплазматической мембраны видны сливающиеся с ней вакуоли (рис. 57, 59, приложение).

Выход вакуолей можно наблюдать также в продольном сколе, в зоне контакта лимфоцита и КМ. В межклеточном пространстве, замкнутом оболочками обеих клеток, обнаруживаются полиморфные сферические образования, которые, очевидно, представляют собой содержимое выделяющихся секреторных вакуолей, из них многие покрыты мембраной. Частота и плотность расположения ВМГ идентична ВМГ на мембранах вакуолей КГ. Диаметр крупных вакуолей — около 500 нм, мелких — около 200 нм. Прослеживается выход вакуолей в межклеточное пространство, при этом собственная мембрана вакуоли сохраняется (рис. 57—61, приложение).

Каким образом осуществляется выход покрытых мембраной секреторных вакуолей, не ясно. Можно предположить, что в цитоплазме лимфоцита одна или несколько секреторных гранул могут быть заключены в общую вакуоль, типа цитолисомы, которая обеспечивает компартментализацию секрета. В последующем мембрана такой цитолисомы включается в плазматическую мембрану лимфоцита, выделяя наружу секреторные гранулы, покрытые собственной оболочкой. Возможно, имеется несколько типов

вакуолей: кроме цитолисомы выделяются вакуоли КГ, мультивезикулярные тельца и опущенные везикулы.

Оболочка секреторной гранулы может иметь соответствующий рецептор, необходимый для ее адсорбции на поверхности КМ. Такое предположение подтверждается биохимическими данными о том, что из лимфотоксина может быть выделена фракция C_x , обладающая специфической цитолитической активностью по отношению к соответствующим клеткам-мишеням [Hiserodt e. a., 1979].

ШЕДДИНГ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ Т-КИЛЛЕРА И ЕЕ КОМПОНЕНТОВ

На всем протяжении контакта между лимфоцитом и КМ плазмалеммы обеих клеток располагаются параллельно одна другой или отступают одна от другой, образуя щелевидные пространства. Местами отростки лимфоцита вдавливаются в цитоплазму КМ, проникая вглубь, вплоть до ядра, однако цитоплазматическая мембрана КМ при этом остается неповрежденной. Никогда не наблюдалось слияния между мембранами лимфоцита и КМ и расстояние между мембранами обеих клеток не было менее 6—7 нм. Между мембранами видны электроно-оптически плотные нити (рис. 62, 63, приложение). Через 30 мин взаимодействия наряду с увеличением поверхности контакта Т-киллера и КМ наблюдается увеличение размеров цитоплазмы и появление многочисленных микроворсинок [Быковская и др., 1978; Вуковскаја е. а., 1979].

Раньше считалось, что только В-лимфоциты покрыты микроворсинками, тогда как Т-лимфоциты не имеют их или имеют очень мало [Reyes e. a., 1975; Polliack e. a., 1975]. Впоследствии появились данные о том, что и Т-лимфоциты и В-лимфоциты могут быть более или менее ворсинчаты [Lipscomb, Sell, 1975]. Далее было показано, что у движущегося лимфоцита ворсинки сконцентрированы главным образом в области уropоды [Fagreau e. a., 1974]. Микроворсинки появляются у клеток, готовящихся к делению, они необходимы для контакта с субстратом и другими клетками [Loog, 1977]. Микроворсинки чувствительны к охлаждению, они менее выражены на лимфоцитах, инкубированных при 0°C, по сравнению с теми же клетками, выдерживаемыми при 37°C. Присутствие цитохалазина Б полностью снимает экспрессию микроворсинок на поверхности лимфоцитов, тогда как колхицин и винбластин, которые не являются ингибиторами секреции иммуноглобулинов, не влияют на образование кепинга или экспрессию и распределение микроворсинок [Loog, Hagg, 1975]. Интересно, что на лимфоцитах, обработанных меченой антииммуноглобулиновой сывороткой до фиксации, меченый Ig располагается на микроворсинках, тогда как обработка антисывороткой после фиксации выявляет метку у основания микроворсинок [Wofsy e. a., 1974].

Таким образом, помимо участия в клеточном делении контакта с субстратом и другими клетками, увеличение количества микроворсинок может быть следствием выхода секретируемого продукта в составе многочисленных вакуолей КГ, а исчезновение микроворсинок коррелирует с ингибцией секреции при аналогичной обработке.

Через 30 мин взаимодействия лимфоцита и КМ наблюдается «shedding» цитоплазматической мембраны лимфоцита. Две плазматические мембраны сливаются, образуя трехслойные мембранные структуры. Небольшие фрагменты этих структур наблюдались на разных стадиях формирования в зоне контакта лимфоцита и КМ (рис. 64—67, приложение). Однако этот процесс наиболее активен на поверхности лимфоцита, противоположной зоне контакта с КМ (рис. 64, приложение). Кроме shedding двух-трехслойных плазматических мембран (рис. 66, 69, приложение) образуются также многослойные мембранные структуры (рис. 65, приложение). Многочисленные фрагменты плазмалеммы, оторвавшейся от лимфоцита, расположены в стороне от клеток (рис. 69, 70, приложение). В процессе shedding плазмалеммы лимфоцита содержимое его цитоплазмы не попадает в межклеточное пространство, так как целостность цитоплазматической мембраны не нарушается. Shedding фрагментов цитоплазматической мембраны лимфоцита наблюдался также при использовании метода криоскалывания (рис. 67, приложение) [Быковский и др., 1978; Быковская и др., 1980; Bykovskaja e. a., 1979].

Явление shedding не отмечалось после инкубации конъюгатов при 4°C. Изменения цитоплазматических мембран Т-киллера, взаимодействующего с КМ, являются, безусловно, следствием тех процессов, которые происходят в цитоплазме лимфоцита и мембраны эндоплазматической сети лимфоцита, принимают непосредственное участие в этих процессах.

Концепция «эндомембранной системы» [Morgè, Ovtrachf, 1977] рассматривает систему клеточных мембран как функциональное и структурное целое, в котором осуществляются процессы дифференцировки и движения мембран, включая функцию аппарата Гольджи. Элементами эндомембранной системы являются выросты ядерной оболочки, шероховатый и гладкий Эр, КГ, различные цитоплазматические пузырьки. Плазматическая мембрана, мембрана вакуолей и лизосом являются конечными продуктами системы. Электронно-микроскопические, биохимические и иммунологические исследования подтверждают концепцию единства эндомембранной системы. Биогенез и текучесть внутренних мембран клетки представляются следующим образом: цистерны шероховатого Эр, связанные с выпячиваниями ядерной мембраны, постепенно превращаются в гладкий Эр. От цистерн гладкого Эр отпочковываются маленькие пузырьки, названные транзиторными везикулами. Транзиторные пузырьки, отделившись от Эр, мигрируют в КГ, где они сливаются, образуя цистерну на прокси-

мальном (формирующемся) конце КГ. Содержимое пузырьков и мембраны созревает и в конечном счете выводится из клетки в виде секреторных пузырьков или вакуолей. Предполагается, что КГ формирует два типа мембран: на экспорт продуктов секреции и для клеточной поверхности. Важной функцией КГ может быть формирование и перенос информационных и рецепторных молекул на клеточную поверхность, в процессе биогенеза мембран или их восстановления. Сборка «основных» компонентов плазматической мембраны происходит в КГ. Среди гликолипидов есть соединения, содержащие галактозу, фукозу и сialовую кислоту — углеводные группы, включающиеся в продукты, синтезируемые КГ [Whaley e. a., 1972; Oseroff e. a., 1973; Bennett e. a., 1974]. Как было показано, накопление материала в КГ или в связанных с ним пузырьках происходит лишь после того, как мембраны этих структур достигнут известной стадии развития [Meldolesi e. a., 1971 a — в].

Пузырьки Гольджи выделяют свое содержимое в межклеточное пространство, и их мембраны сливаются с плазмалеммой. Внедрение нового материала клеточной оболочки между уже существующими структурами названо интуссусцепцией. В связи с этим КГ рассматривается не только как органелла, выполняющая выделительную функцию, но и как органелла, осуществляющая синтез плазмалеммы. Предполагается, что КГ функционирует как система формирования внутриклеточной плазмалеммы [Frey-Wyssling, 1973]. Непосредственно после выхода продукта секреции протяженность плазматической мембраны значительно увеличивается. Затем происходит некий процесс компенсации, в результате которого протяженность этой мембраны возвращается к первоначальной. Например, в изолированных клетках поджелудочной железы увеличивается количество микроворсинок через 10 мин после стимуляции *in vitro* секретинном [Reddy e. a., 1979], а в клетках гипофиза после секреции пролактина обнаруживается повышенное количество микроворсинок, цитоплазматических выростов и пузырей [Antakly e. a., 1980].

До настоящего времени вопрос об удалении избытка мембраны остается открытым. Не ясно, возвращается ли она в виде мелких пузырьков в эндоплазматическую сеть или специфически разрушается. По мнению Тейлора с сотрудниками [Taylor e. a., 1971], существует непрерывное формирование и диссоциация составных частей мембраны, которая в диссоциированном состоянии подвергается деградации. Однако другие авторы считают, что фрагменты мембран возвращаются в цитоплазму в виде аутофагических пузырьков, попадают в лизосомы и там разрушаются [Vollender, Wabel, 1973]. Предполагается также, что некоторые компоненты мембран, возможно, видоизмененные в лизосомах, сначала используются каким-то образом в цитоплазме и в последующем вторично применяются для построения мембран [Holtzman e. a., 1973]. Поскольку данные, подтверждающие рециклинг

плазматической мембраны, недостаточны и пути биосинтеза и деградации в клетке подчиняются строгим законам биохимии, в силу которых невозможно простое превращение одного компонента в другой, следует считать, что шеддинг плазматической мембраны лимфоцита является компенсаторным механизмом, освобождающим его от избытка этой мембраны.

МЕМБРАНОСОМЫ

Через 30—60 мин после адсорбции лимфоцита на поверхности КМ непосредственно под мембраной лимфоцита выявляются овальные структуры диаметром от 1 до 40 нм. Речь идет об образованиях высокой электронно-оптической плотности диаметром от 1 до 40 нм (рис. 69—77, приложение). Мы называли их «мембраносомы». Мембраносомы близко прилегают к внутренней поверхности цитоплазматической мембраны лимфоцита и имеют отростки длиной до 5—6 нм и диаметром 2—3 нм. Эти отростки пронизывают наружную цитоплазматическую мембрану (см. рис. 21, а, рис. 75, приложение).

Мембраносомы могут быть расположены на любом участке цитоплазматической мембраны. На одном ультратонком срезе клетки можно увидеть до 10—20 мембраносом, что в пересчете на всю поверхность лимфоцита может составить не менее чем 200—400 нм (рис. 77, приложение). Однако на некоторых участках отмечается повышенная концентрация этих структур, где мембраносомы расположены близко одна к другой.

Мембраносомы отмечаются также на поверхности интерфазных и делящихся клеток *L*-1210 на всех стадиях их взаимодействия с Т-киллером. Мембраносомы могут быть локализованы вблизи онкорнавирусов в момент их баддинга (см. рис. 77, приложение). Мембраносомы слущиваются с поверхности лимфо-

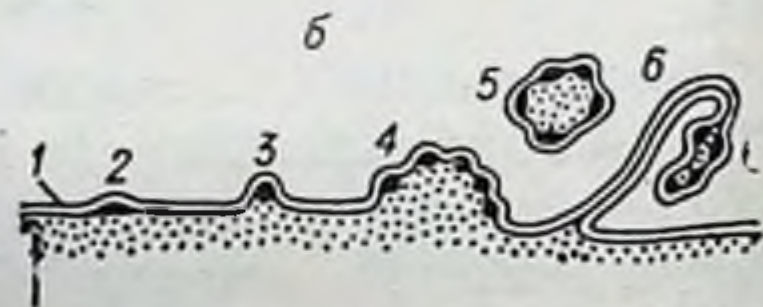
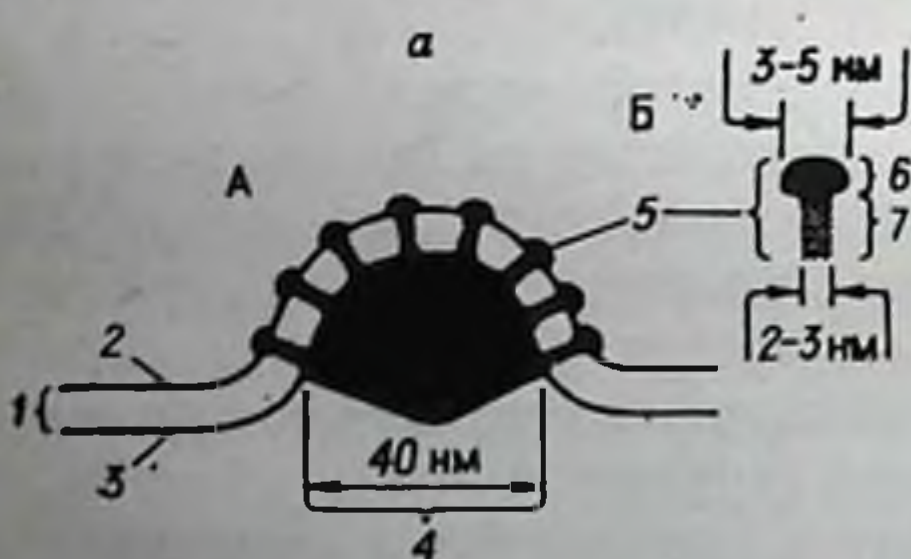


Рис. 21. Структура и формирование мембраносом на поверхности лимфоцитов (схема).

а — ультраструктура мембраносомы (А) и отдельного «отростка» мембраносомы (Б): 1 — плазматическая оболочка клетки, 2 — наружная мембрана оболочки, 3 — внутренняя мембрана плазматической оболочки, 4 — «тело» мембраносомы, 5 — «отростки» мембраносомы, 6 — «головка» отростка мембраносомы, 7 — «ножка» отростка мембраносомы; б — предполагаемый морфогенез мембраносом: 1 — плазматическая оболочка лимфоцита, 2—3 — последовательное увеличение мембраносомы, 4 — формирование скопления мембраносом, 5 — отделение скопления мембраносом от поверхности лимфоцита в процессе пинализации, 6 — локализация мембраносом в слущивающихся фрагментах плазматической оболочки лимфоцита.

на плазматической оболочке, 3 — внутренняя мембрана плазматической оболочки, 4 — «тело» мембраносомы, 5 — «отростки» мембраносомы, 6 — «головка» отростка мембраносомы, 7 — «ножка» отростка мембраносомы; б — предполагаемый морфогенез мембраносом: 1 — плазматическая оболочка лимфоцита, 2—3 — последовательное увеличение мембраносомы, 4 — формирование скопления мембраносом, 5 — отделение скопления мембраносом от поверхности лимфоцита в процессе пинализации, 6 — локализация мембраносом в слущивающихся фрагментах плазматической оболочки лимфоцита.

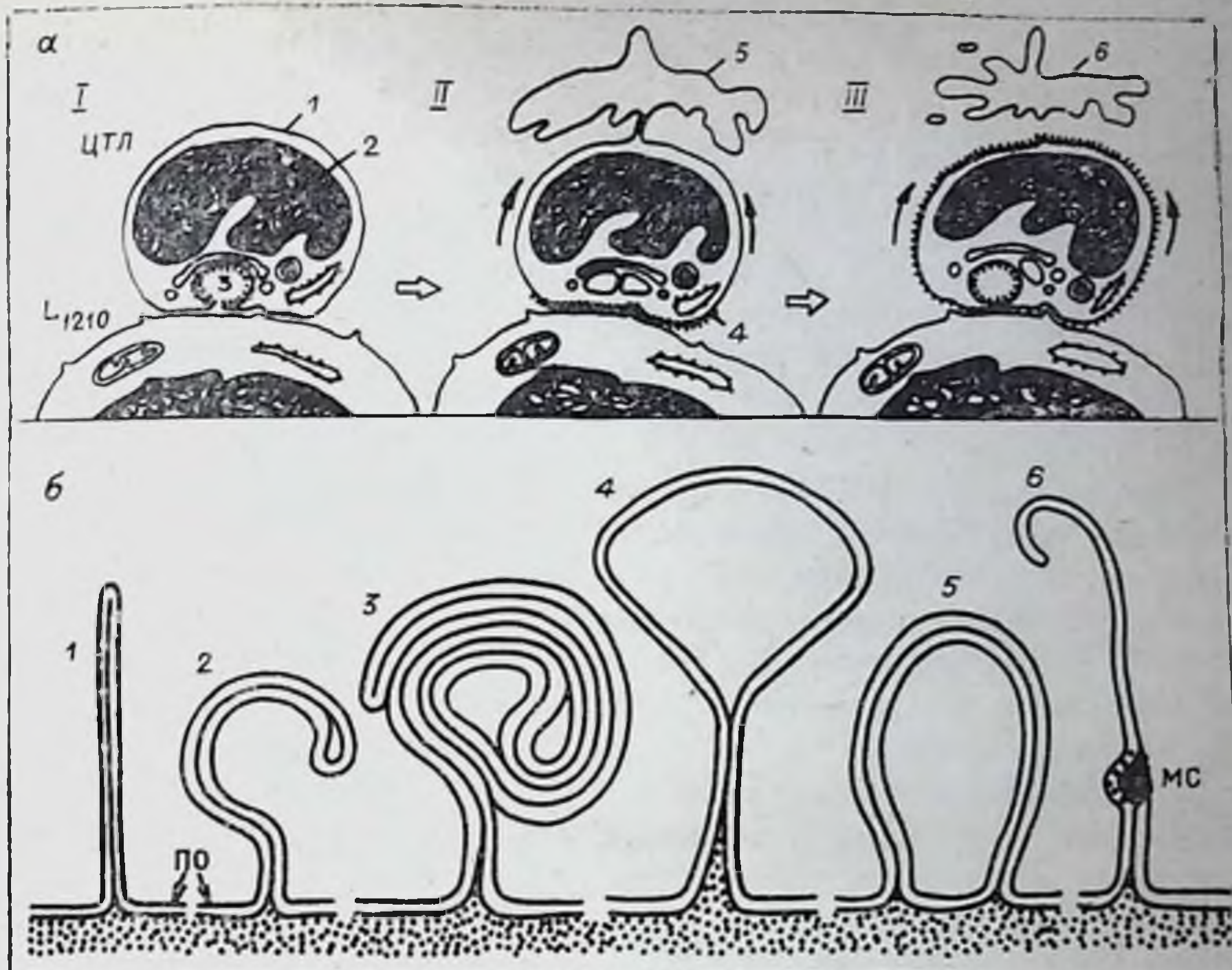


Рис. 22. Случивание фрагментов плазматической оболочки с поверхности цитолитического Т-лимфоцита в процессе взаимодействия с опухолевой клеткой-мишенью.

а — последовательные этапы случивания фрагмента плазматической оболочки через 5 (I), 30 (II) и 60 (III) мин после контакта цитолитического Т-лимфоцита (ЦТЛ) с клеткой-мишенью (L = 1210): 1 — плазматическая оболочка ЦТЛ, 2 — ядро ЦТЛ; 3 — слияние мембраны гипертрофированной вакуоли комплекса Гольджи с плазматической оболочкой ЦТЛ, 4 — включение мембраны вакуоли комплекса Гольджи в состав плазматической оболочки ЦТЛ, 5 — случивание излишков плазматической оболочки ЦТЛ на поверхности лимфоцита, противоположной зоне контакта ЦТЛ и клетки-мишени, 6 — фрагмент плазматической оболочки, отделившийся от поверхности ЦТЛ, б — формы случивания плазматической мембраны ЦТЛ. Образование трехслойной (1, 2), многослойной (3), вакуолярной (4, 5) и двуслойной (6) мембранных структур. ПО — плазматическая оболочка; МС — мембраносома.

цита в виде компонентов цитоплазматической мембраны (см. рис. 21, б) или в процессе клазматоза (рис. 69—72, приложение).

Мембраносомы не были обнаружены на поверхности лимфоцитов, инкубированных в течение 30—180 мин при 37°C без клеток-мишеней, на ранних стадиях взаимодействия — в течение первых 5—15 мин или после 30-минутного взаимодействия с КМ при 4°C.

На рис. 22 представлены схемы изменений ультраструктуры плазматической мембраны Т-киллеров и несколько вариантов шеддинга плазмалеммы. Прослежено формирование двух-, трех- и многослойных мембранных структур. Наибольший интерес представляет, очевидно, шеддинг двуслойной мембраны лимфоцита, так как в этом случае выявляется внутренний осмиофильный слой плазмалеммы лимфоцита.

Можно предположить, что шеддинг плазматической мембраны лимфоцита представляет собой компенсаторный механизм, с помощью которого клетка освобождается от избытка плазматической мембраны, встраивающейся в наружную оболочку в процессе экзцитоза секреторных вакуолей и пузырьков КГ.

Биологическая роль мембраносом неясна. Можно предположить, что мембраносомы являются местом расположения рецептора Т-киллера, продуктом деятельности ферментов, экспрессированных на мембране [Ferluga, Allison, 1975] или представляют собой вид «миниформ» онкорнавирусов [Быковский, Клицунова, 1975].

Так как неперенным условием для осуществления цитолиза является адсорбция Т-киллера на поверхности КМ, компоненты мембран, принимающих участие в этом взаимодействии, могут быть отнесены к структурам, имеющим отношение к киллингу. Успешное связывание двух типов мембран, очевидно, является предпосылкой к последующей стадии «летального удара».

Кимура и Вигзель [Kimura, Wigzell, 1978] проанализировали определенные поверхностные структуры, экспрессируемые на мембранах Т-киллеров в плане их возможного участия в процессе цитолиза. Серологически определяемые антигены главного комплекса гистосовместимости, H-2D, H-2K, Thy-1 антигены, являющиеся поверхностными маркерами Т-лимфоцитов, как было показано, не вовлекаются в функционирование эффекторных механизмов Т-киллеров. Антисыворотка к антигену K₂, обнаруженному на мембранах Т-киллеров, выделенных из перитонеального экссудата [Sullivan e. a., 1973], не ингибировала цитолитический эффект Т-лимфобластов, полученных в MLC. Кроличья антисыворотка к β_2 -микроглобулину и поливалентная кроличья антииммуноглобулиновая сыворотка не оказывают действия на функцию Т-киллеров, Ia-антигены также не принимают участия на последних (эффекторных) стадиях иммунного ответа.

В серии работ Бинца и Вигзеля [Binz e. a., 1979] на поверхности Т-киллеров, генерированных против аллоантигенов, обнаружена рецепторная молекула. Последняя состоит из двух цепей (м. м. 14.000d), связанных дисульфидной связью. По идиотипическим и антигенсвязывающим свойствам половинки каждой из цепей идентифицированы V-отрезками тяжелых цепей антител.

В наших экспериментах при использовании метода криоскалывания обнаружены внутримембранные гранулы диаметром 80 — 100 Å, которые могут отделяться от поверхности плазматической оболочки лимфоцита во внеклеточное пространство и образовывать скопления из нескольких десятков частиц (рис. 68, приложение). Значение этого феномена не ясно. Можно предположить, что гранулы, экспрессированные на плазматической мембране лимфоцита, представляют собой какой-либо из упоминавшихся выше компонентов мембраны Т-киллеров и, возможно, гли-

копротеины, имеющие отношение к специфическим антигенным детерминантам Т-киллеров.

В обычном смысле шеддинг — это термин, используемый при описании освобождения антигенов клеточной оболочки. Описан шеддинг иммуноглобулинов лимфоцитов, меченных методом маркирования с лактопероксидазой [Cone e. a., 1971; Vietta, Uhr, 1972]. Необходимыми условиями для шеддинга являются клеточное дыхание и протеиновый синтез [Cone e. a., 1971]. Шеддинг меченых иммуноглобулинов у лимфоцитов происходит в течение нескольких минут после связывания с антииммуноглобулиновым реагентом и в последующем замедляется [Antoine, Avrameas, 1974].

Заметного шеддинга H-2-антигенов обнаружить не удалось [Vietta, Uhr., 1972, 1975], тогда как шеддинг HLA-антигенов у лимфоцитов человека успешно продемонстрирован. Было также показано, что клетки мышинной почки и тимуса слущивают материал, способный ингибировать цитотоксическую активность антисыворотки к H-2-антигенам [Kapeller e. a., 1973].

Полученные нами данные могут быть морфологическим выражением шеддинга компонентов плазматической оболочки лимфоцитов.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИМФОТОКСИНА

Активированные лимфоциты, стимулированные антигенами или митогенными факторами, высвобождают растворимые медиаторы, обладающие широким спектром биологической активности и названные лимфокинами [Lawrence, Landy, 1971]. Одним из лимфокинов является лимфотоксин, полученный впервые при культивировании лимфоцитов человека с ФГА [Granger, Kolb, 1968]. Лимфотоксин (ЛТ) обладает литической активностью и тестируется, как правило, на высокочувствительной к его действию линии клеток L-929. Лимфотоксин можно получить в культурах активированных лимфоцитов крыс, мышей и морских свинок, их действие сравнительно неспецифично [Granger e. a., 1975]. Однако цитолитический эффект ЛТ невысок, так как его содержание в культурах активированных лимфоцитов невелико, а выделение активных молекул затрудняет их нестабильность. Надосадок, полученный в культурах лимфоцитов человека, стимулированных КОН А или ФГА, был сконцентрирован в 50 раз с помощью амнонового фильтра РМ-10 и фракционирован на сефадексе G-150 или ультрагеле АсА-44. В результате фракционирования выделено 4 класса молекул, обладающих литической активностью: S_x — комплексная молекула с молекулярной массой >200000 d , α — $70-90000$ d , β — $25-50000$ d и γ — $10-20000$ d . При этом 40—60% литической активности принадлежало α -фракции и 20—40% — β -фракции. Эти классы молекул отличаются по стабильности и кинетике появления в культуре. При использовании моно-

обменной хроматографии и электрофореза в полиакриламидном геле можно видеть, что каждый класс ЛТ (кроме γ), в свою очередь, подразделяется на несколько подклассов. Класс C_x представляет, очевидно, агрегат, который содержит лимфотоксины с меньшей молекулярной массой. Классы лимфотоксина с большой молекулярной массой более стабильны при нагревании, хранении и фракционировании. C_x - и α -классы стабильны при замораживании в течение длительного времени, тогда как классы β и γ совершенно не стабильны при хранении. Классы C_x , α и β_2 выдерживают нагревание при 56°C в течение нескольких часов, а β_1 и γ -классы быстро инактивируются [Granger e. a., 1978]. Молекулы лимфотоксина содержат углеводы. На колонках с сефарозой, покрытых лектином, связывается от 10 до 50% активности человеческого лимфотоксина. Поскольку молекулы ЛТ чрезвычайно гетерогенны, количество связываемой активности лимфотоксина варьирует в зависимости от типа используемого лектина и тестируемой фракции ЛТ. Например, до 60% литической активности связывается конканавалином А и только 30% — лектином зародышей пшеницы, что указывает на присутствие в этих молекулах α D-маннозы и/или D-глюкозы, а также N-ацетил-D-галактозамина и/или сиаловой кислоты. Однако обработка нейраминидазой не оказывает эффекта на антигенность этих молекул и, по-видимому, углеводы не являются необходимыми для осуществления литического эффекта [Toth, Granger, 1979]. Результаты, полученные в других лабораториях при изучении физико-химических свойств лимфотоксинов, выделенных при активации лимфоцитов человека лектинами, в основном подтверждают изложенные выше сведения. Продемонстрировано существование классов α и β , активность α -класса также подразделена на три подкласса [Walker e. a., 1976; Lee, Lucas, 1976]. Кроличья антисыворотка, полученная к лимфотоксину, на 100% нейтрализовала эффект нефракционированного ЛТ, а также все классы ЛТ, которые, в свою очередь, могут обладать и общей, и частной специфичностью. Антисыворотка к классу α активно ингибирует цитолитический эффект α - и C_x -классов ЛТ, слабо ингибирует действие лимфотоксина класса β и не активна по отношению к классу γ . В свою очередь, антисыворотка к классу C_x подавляет действие лимфотоксина классов C_x , α и в меньшей степени — γ -класса. Антисыворотка, полученная к нефракционированному ЛТ человека, строго реагирует только с ЛТ человека, но не мыши, крысы, хомяка, морской свинки или кролика [Yamamoto e. a., 1978].

Предполагается, что классы молекул, из которых состоит лимфотоксиновый комплекс, нековалентно ассоциированы, так как в условиях высокой ионной силы они диссоциируют на отдельные компоненты с малой молекулярной массой, а в буферных растворах с низкой ионной силой могут реагировать в комплекс. При спонтанном осаждении в градиенте сахарозы или гельфльтрации на ультрагеле AcA-22 лимфотоксиновый комплекс элюирует

в виде нескольких дискретных пиков: C_x1 с молекулярной массой $1 \times 10^6 d$, $C_x^2 - 8 \times 10^5 d$, $C_x - 3,5 \times 10^5 d$ и C_x2 , $1-2 \times 10^5 d$. Предполагается, что комплексная лимфотоксическая активность состоит из нескольких классов ЛТ с меньшей молекулярной массой, связанных одной особой формы молекулой, являющейся ядром комплекса. В пользу этой концепции свидетельствует то, что антисыворотка к различным классам с низкой молекулярной массой (α - и β -классы) сильно ингибирует активность комплекса с высокой молекулярной массой.

Кроме того, показано, что лимфотоксиновые молекулы в комплексной форме могут взаимодействовать с иммуноглобулинподобным материалом. Антитела к Fab_2 -фрагменту IgG в значительной степени нейтрализуют лимфотоксиновый комплекс и не связываются с классами α , β или γ . При этом антисыворотка к Fab_2 фрагменту IgG наиболее эффективно нейтрализует субклассы комплекса C_x2 и C_x3 , что наводит на мысль об ассоциации со специфическими рецепторами Т-лимфоцита [Hiserodt e. a., 1978a].

Лимфотоксин, выделенный из культуры стимулированных Кон А или ФГА лимфоцитов человека, или из культуры лимфоцитов, стимулированных специфическим растворимым антигеном, частично ингибируется кроличьей антисывороткой к Fab_2 -фрагменту человеческого IgG. Активность лимфотоксина, полученного в односторонней смешанной культуре лимфоцитов человека, может быть нейтрализована адсорбцией на клетках-мишенях, использованных в качестве стимулирующих в MLC, однако его способность связываться с антисывороткой к Fab_2 -IgG составляет всего 5—20% активности ЛТ, выделенного из культур, стимулированных лектинами [Hiserodt e. a., 1978b].

В-лимфоциты периферической крови, стимулированные митогеном лаконоса или стафилококковым анатоксином, не синтезируют лимфотоксина. Изучение ЛТ, спонтанно секретируемого девятью лимфобластоидными человеческими линиями, имеющими маркеры В-лимфоцитов, показало, что в некоторых из этих линий синтезируется ЛТ, который по своим параметрам полностью соответствует ЛТ, выделяемому из супернатантов лимфоцитов периферической крови, стимулированных ФГА. Оба ЛТ имеют одинаковые параметры миграции в полиакриламидном геле, нейтрализации кроличьей антисывороткой к α -классу человеческого лимфотоксина, ультрацентрифугирования в градиенте 5—30% сахарозы и стабильности в течение 15 мин при 75°C. Таким образом, в культурах свежесделанных лимфоцитов периферической крови продуцентами лимфотоксина являются Т-, но не В-лимфоциты, тогда как длительно перевиваемые человеческие лимфоидные линии, имеющие маркеры В-клеток, также способны секретировать этот лимфотоксин. Однако вопрос о контаминации этих линий Т-клетками остается открытым [Rosenau e. a., 1979]. Ранее активность лимфотоксина была найдена Гренжером с сотрудниками [Granger e. a., 1970] в супернатантах человеческих лимфо-

бластоидных линий, имеющих маркеры В-клеток. Лимфотоксин обнаружен также в суспензии сенсibilизированных к туберкулину клеток селезенки морских свинок, которые были обработаны анти-Т-сывороткой и стимулированы очищенным протениновым дериватом [Bloom e. a., 1975]. О'Нейл с сотрудниками показали [O'Neill e. a., 1975], что лимфоциты периферической крови, имеющие Fc-рецептор и образующие розетки с покрытыми антителами эритроцитами быка, индуцируют образование лимфотоксина.

При изучении лимфоцитов периферической крови, разделенных на несколько субпопуляций, показано, что α ЛТ образует как обогащенная Т-лимфоцитами фракция клеток, стимулированных ФГА, так и не Т-клетки, стимулированные липополисахаридом или Кон А сефарозой в присутствии 5% Т-клеток. При этом липополисахарид (ЛПС) и Кон А сефароза могут индуцировать синтез ДНК в популяции Т-клеток, содержащих более 1,5% макрофагов, но не могут индуцировать секрецию этими клетками α -лимфотоксина. Лимфотоксин, выделенный из смешанной культуры лимфоцитов человека, стимулированных клетками лимфобластоидных линий RPMJ-1788 или WI-2, обладает повышенной литической активностью по отношению к стимулирующим мишеням, причем класс лимфотоксина C_x в 100 раз более эффективен по сравнению с классами ЛТ, имеющими малую молекулярную массу (α_1 , β , γ) и в 2—10 раз более активен по сравнению с C_x неиммунного АТ-ЛТ. Гетерологичная антисыворотка против α_2 класса ЛТ полностью ингибировала литическую активность всего комплекса, но не реагировала с иммуноглобулином. Очевидно, молекула лимфотоксина представляет собой систему литических молекул. Субклассы этой молекулы сами по себе обладают небольшой литической активностью, но они могут формировать комплексы с высокой литической активностью, имеющие антигенсвязывающие рецепторы [Yamamoto e. a., 1979]. Ингибиторы протенинового синтеза, эметин и циклогексимид тотально блокируют биосинтез лимфотоксина, аккумуляцию внутри клеток и выход в надосадочную жидкость при использовании интактных лимфоцитов человека, активированных на монослое L-клеток в присутствии Кон А. Колхицин и цитохалазин Б, ингибиторы секреции также подавляли выход лимфотоксина. Добавление 10^{-3} М-колхицина значительно редуцировало выход ЛТ в супернатанты, хотя при этом сохранялось 70—88% внутриклеточного ЛТ, который выделяли после обработки лимфоцитов ультразвуком. Однако цитолитическая активность и способность выделять лимфотоксин в популяции лимфоцитов, стимулированных в течение 3 дней конканавалином А, не ингибируется эметином. Такие лимфоциты, обработанные эметином и истощенные в течение 12 ч на монослое КМ, уже не способны оказывать цитолитическое действие или выделять лимфотоксин на свежем монослое L-клеток. Эксперименты показывают, что в лимфоцитах, стимулированных лектинами, в процессе бласттрансформации аккумулируется ЛТ, последую-

щее выделение которого не зависит от протеинового синтеза. Интересно, что колхицин в этой системе также оказывает слабое ингибирующее действие на выход лимфотоксина. В связи с этим авторы делают вывод, что ЛТ каким-то образом экспрессируется на клеточной оболочке и затем освобождается в супернатанте путем шеддинга [Hiserodt e. a., 1979a]. Однако уместно напомнить, что колхицин ингибирует выход секрета далеко не всеми типами секреторных клеток. В частности, колхицин не оказывает эффекта на секрецию иммуноглобулина клетками мышинной плазмацитомы [Allison, 1973].

Сравнительно высокий уровень литической активности удалось получить, используя обогащенную популяцию мышинных Т-лимфоцитов, активированных в течение 8—10 ч на монослое стимулирующих клеток-мишеней, обработанных ФГА.

Уровень литической активности, полученной в таких супернатантах, в 20—50 раз выше, чем при активации лимфоцитов в присутствии одного митогена. Неприлипающие селезеночные клетки крыс, морских свинок, кроликов, хомяков при аналогичных условиях также индуцируют образование лимфотоксина с высоким уровнем литической активности. Таким образом, оптимальными условиями для стимуляции выхода ЛТ являются взаимодействие лимфоцита и с лектином, и с поверхностью КМ.

Мышиный лимфотоксин оказался менее стабильным по сравнению с человеческим: активность ЛТ при хранении падает в течение первых 12 ч при 37°C или при 4°C и сохраняется примерно в течение 2 нед при —70°C [Huserodt e. a., 1979b]. Разделение мышинного лимфотоксина по молекулярной массе методом хроматографии на ультрагеле-АсА44 выявило несколько классов, аналогичных обнаруженным ранее в лимфотоксине человека: $S_x > 200000$ d, α — тяжелый (α_h) — 110000 — 140000 d, α — легкий (α_l) — 60000—90000, $d\beta$ — 40 000—50 000 d и γ — 10 000—20 000 d. Антисыворотка, полученная к целому супернатанту или к α_h , реагирует со всеми классами мышинного лимфотоксина, но не ингибирует действия лимфотоксинов лимфоцитов человека, крыс или морских свинок [Hiserodt e. a., 1979b].

Отличительной особенностью лимфотоксина, выделенного при активации иммунных Т-лимфоцитов на монослое аллогенных фибробластов, покрытых лектинами, является наличие высокомолекулярного комплекса, содержащего антигенсвязывающий рецептор(ы). Физико-химические и иммунологические исследования показывают, что литическая активность, полученная в супернатантах иммунных и неиммунных мышинных лимфоцитах, опосредуется различными классами лимфотоксина. В составе иммунного лимфотоксина клеточный лизис опосредуется фракциями с молекулярной массой $>200 000$ d. Эти фракции нестабильны, козья антисыворотка к мышинному иммуноглобулину не действует на их литическую активность, что снимает вопрос об участии системы антитело плюс комплемент. Поскольку лимфотоксин, выделенный

из супернатантов обогащенной популяции Т-лимфоцитов более активен по сравнению с ЛТ, полученным в суспензии нефракционированных клеток селезенки, высказывается предположение, что высокомолекулярные комплексы имеют отношение к рецепторам Т-лимфоцитов. Излагается концепция о том, что нестабильный специфический литический материал в супернатантах иммунных лимфоцитов является высокомолекулярным комплексом, содержащим субъединицы лимфотоксина с молекулярной массой α_n , которые функционально связаны с рецепторными молекулами, специфически связывающими антиген. Сделано заключение, что выход растворимого специфического литического клеточного материала из иммунных Т-лимфоцитов, по-видимому, требует уникального клеточного активирующего сигнала [Hiserodt e. a., 1979b].

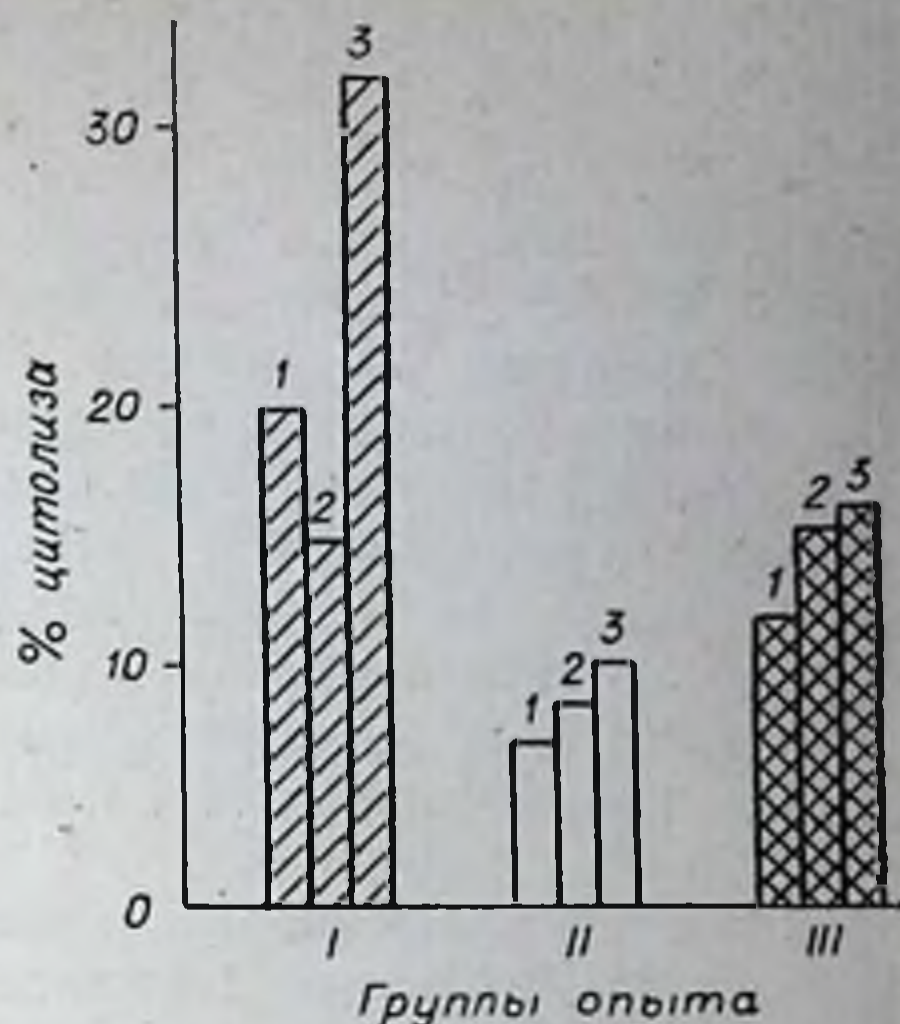
Хотя лимфотоксин, выделенный из культуральной среды, содержащей активированные лимфоциты, достаточно подробно изучен, до сих пор не доказана его прямая связь с цитолитическим действием Т-киллеров. Антитела к лимфотоксину подавляют цитолитический эффект лимфоцитов, иммунных к белковому антигену, в присутствии этого же антигена в культуральной среде на «посторонние клетки-мишени» [Walker, Lucas, 1974], но не оказывают эффект на цитолитическую активность Т-киллеров, иммунных к аллоантигенам, или специфическим опухолевым антигенам самих мишеней [Cateluy e. a., 1976]. Можно полагать, что лимфотоксин фиксируется на мембранах Т-киллера или экскретируется в незначительных количествах в замкнутое щелевидное пространство между мембранами лимфоцита и КМ и, таким образом, недоступен для антисыворотки.

Как было показано нами ранее, с помощью метода криоскальвания, а также на ультратонких срезах в межклеточном пространстве, замкнутом мембранами лимфоцита и КМ, обнаруживаются вакуоли, которые по своим параметрам (характер мембраны, размеры, содержимое) соответствуют секреторным вакуолям, локализованным в участке цитоплазмы Т-киллера, ориентированном в зону контакта с клеткой-мишенью. Соответствует ли содержимое этих вакуолей лимфотоксину, выделяемому из культуральной среды, содержащей активированные лимфоциты, остается неясным.

Для нас также представлялось интересным выделить лимфотоксин, специфичный по отношению к клеткам-мишеням в используемой нами системе, и охарактеризовать его.

В наших экспериментах (неопубликованные данные О. А. Мерзликиной и С. Н. Быковской) показано, что цитолитической активностью обладают и культуральная среда, и гомогенаты Т-киллеров, активированных на монослое КМ, или Коп А, тогда как супернатанты и гомогенаты неактивированных лимфоцитов не способны лизировать клетки-мишени. При сравнении литической активности ЛТ, полученного после активации лимфоцитов на мо-

Рис. 23. Цитолитическая активность лимфотоксина, выделенного из супернатантов лимфоцитов, активированных Кон А (I), на монослое КМ (II) или двумя стимуляторами вместе (III).



нословое КМ, и/или Кон А, оказалось, что активация митогеном более эффективна и даже при активации лимфоцитов на монословое КМ в присутствии Кон А эффект вдвое ниже по сравнению с действием одного Кон А (рис. 23). Обсуждая эти данные, можно предположить, что секрет, выделяемый лимфоцитом при контакте с КМ, в какой-то мере утилизируется или разрушается ею, тогда как при стимуляции Кон А весь секрет выходит в культуральную среду. Это подтверждается еще и тем, что гомогенаты лимфоцитов, активированных на монословое КМ в присутствии Кон А и на монословое КМ без Кон А, обладают примерно одинаковой цитолитической активностью. Цитолитическая активность гомогенатов примерно вдвое ниже цитолитической активности культуральной среды, полученной после активации лимфоцитов. Однако эти результаты не могут быть сравнимы, так как цитолитической активностью супернатантов обладают только образцы, сконцентрированные в 10—15—25 раз. Сконцентрированные образцы обессоливали на колонке с сефадексом G-25, что вопреки ожиданиям повысило их литическую активность в 1,5—2 раза. Сконцентрированные на аминовом фильтре PM10 и обессоленные образцы культуральной среды, полученной от активированных иммунных Т-лимфоцитов, специфичны по отношению к стимулирующим клеткам-мишеням и не оказывают эффекта на сингенные (L-1210) или гетерологичные (K-562) КМ. Цитолитический эффект лимфотоксина на КМ неоспорим, однако очень невысок. Чтобы получить лизис 30—40% $5 \cdot 10^5$ КМ, потребовалось стимулировать $1 \cdot 10^7$ иммунных лимфоцитов, полученных на 5-й день MLC. Этот эффект слишком далек от эффекта живых лимфоцитов, где требуется $25 \cdot 10^5$ Т-киллеров, чтобы лизировать то же количество КМ.

Возможно, синтезируемый лимфоцитом секрет представляет собой высокоактивный фермент, который выделяется в небольшой концентрации, действует локально на небольшом участке мембраны КМ и быстро разводится в культуральной среде. Возможно, ЛТ быстро инактивируется или секрет фиксирован на мембранах Т-киллера и может выделяться в культуральную среду в процессе шеддинга мембраны лимфоцита, описанного нами ранее.

Центральным звеном в иммунном ответе на опухолевые антигены, ассоциированные с главным комплексом гистосовместимости, являются цитолитические Т-лимфоциты (Т-киллеры). Деятельность Т-клеток регуляторов, осуществляющих хелперную и супрессорную функции, в конечном счете направлена на образование клона специфических Т-киллеров, или подавление его активности. Разные субпопуляции Т-хелперов и Т-супрессоров секретируют растворимые медиаторы (лимфокины), легко обнаруживаемые в надосадочной жидкости в иммунном ответе *in vitro*. Напротив, цитолитическое действие Т-киллеров возможно только при непосредственном контакте с клеткой-мишенью. Механизм действия Т-киллеров неизвестен.

Существует несколько гипотез, по-разному объясняющих цитолитический эффект Т-киллеров. Нами было высказано предположение о секреторном механизме их действия.

При изучении этой проблемы мы учитывали стадию дифференцировки, которая определяет физиологические особенности и функциональную активность клетки. В смешанной культуре лимфоцитов на 5-й день после стимуляции цитолитической активностью обладают лимфобласты и большие лимфоциты, тогда как на 11—12-й день после иммунизации *in vivo* на стадии отторжения опухолевого аллотрансплантата функцию Т-киллеров выполняют в основном малые и средние лимфоциты.

Чтобы понять механизм иммунного ответа *in vivo*, мы разработали модельную систему, которая позволила изучить функциональную активность и дифференцировку секреторного аппарата Т-киллеров от стадии лимфобласта до малого лимфоцита — клетки памяти на 7—8-й день МЛС и до вторичного среднего и малого лимфоцита, обладающего высоким литическим потенциалом.

В цитоплазме лимфобластов обнаружены структуры, свидетельствующие об активном синтезе и накоплении определенного продукта, а гипертрофированный КГ, ориентированный в зону контакта с КМ, и многочисленные опущенные везикулы на выведение секрета из клетки. В Т-клетках памяти, неспособных лизировать КМ, обнаруживаются только зрелые секреторные гранулы.

Значительному увеличению литического потенциала вторичных Т-киллеров, полученных после рестимуляции клеток памяти, соответствует появление в их цитоплазме многочисленных секреторных вакуолей. На стадии среднего и малого вторичного лимфоцита секретируемый продукт депонируется в зрелых секреторных гранулах. Очевидно, такие лимфоциты соответствуют Т-киллерам, обнаруживаемым после отторжения опухолевого аллотрансплантата *in vivo*. Контакт с КМ является стимулом, который вызывает активацию секреторного аппарата: гипертрофию и изменение ориентации КГ в зону контакта с КМ, выход секреторных вакуо-

лей в межклеточное пространство, ограниченное мембранами лимфоцита и КМ.

Взаимодействие Т-киллера и КМ было разделено на 3 стадии: специфическое связывание, «летальный удар», или программирование к лизису, и независимый лизис КМ. По нашему мнению, стадия «летальный удар» соответствует выходу секрета из цитоплазмы лимфоцита.

Использование « Ca^{2+} пульсового метода» позволило разграничить и отдельно изучить стадию «летальный удар». Строгая температурная зависимость, влияние ингибиторов энергетического метаболизма и гликолиза, участие системы микротрубочек и микронитей с исключительным постоянством коррелируют с аналогичными условиями, необходимыми для выхода секрета в секреторных клетках с прерывистым типом секреции. В нашей работе эти условия приведены и подробно проанализированы. Для выхода секрета необходим специфический стимул, оптимальные температурные условия (37°C), присутствие Ca^{2+} . Азид натрия, динитрофенол, колхицин, винбластин, цитохалазин Б и EDTA ингибируют активность аппарата Гольджи и выход секреторных вакуолей. Действие стимуляторов циклического аденозинмонофосфата на секреторные клетки неоднозначно. В некоторых секреторных клетках стимуляторы цАМФ ингибируют выход секрета. Например, теофиллин подавляет высвобождение гистамина тучными клетками.

Не ясно, что является причиной гибели клетки-мишени. По аналогии с механизмом действия антител и комплемента существует общепринятая концепция о повреждении мембраны клетки-мишени, взаимодействовавшей с лимфоцитом. Гипотеза коллоидно-осмотической гибели мишеней подтверждается данными о раннем выходе низкомолекулярных компонентов цитоплазмы, меченных ^{86}Rb . Однако результаты электронно-микроскопических исследований и цейтраферной киносъемки, демонстрирующих «взрывной» характер гибели КМ, отсутствие электронно-микроскопических данных о повреждении мембраны КМ на ранних этапах взаимодействия, активация гидролитических ферментов в цитоплазме КМ, контактирующих с иммунными лимфоцитами, ингибция независимого лизиса КМ веществами, известными как стабилизаторы лизосомальных мембран, и наличие оптимальной температуры свидетельствуют против этой гипотезы. Причиной гибели КМ может быть активация собственных лизосомальных ферментов вследствие трансмембранного стимула или проникновения экзогенного вещества, попавшего в лизосомы. Разбухание и гибель клетки-мишени могут быть следствием событий, разыгравшихся в лизосомах.

Продукт, синтезируемый Т-киллерами, очевидно, представляет собой сложный комплекс молекул, секретлируемых в небольшом количестве и/или легко разрушаемых. Выделение этого вещества в препаративных количествах позволит оценить его специ-

фичность, получить физико-химические характеристики и использовать как фармакологический агент в противоопухолевом и трансплантационном иммунитете.

Г л а в а V

ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ ПРОЦЕССЫ У БЕСТИМУСНЫХ ЖИВОТНЫХ

РАННЯЯ ТИМЭКТОМИЯ И ИНДУКЦИЯ ОПУХОЛЕЙ ХИМИЧЕСКИМИ КАНЦЕРОГЕНАМИ

После первых сведений об иммунодепрессивном действии неонатальной тимэктомии на трансплантированный иммунитет [Miller, 1961] было показано влияние раннего удаления тимуса на индукцию папиллом бензпиреном [Miller e. a., 1962]. У тимэктомированных мышей папилломы возникали раньше, быстрее росли, занимали большую поверхность кожи, реже подвергались обратному развитию и чаще малигнизировались. Сообщалось, что у неонатально тимэктомированных животных увеличивается частота сарком, папиллом, карцином кожи, молочной железы и яичников, гепатом, рака полости рта, рака желудка и аденом легких, индуцированных метилхолантреном, бензпиреном и диметилбензантраценом [Defendi, Roosa, 1964; Grant, Miller, 1965; Grant, Roe, 1969; Johnson, 1968, а, б; Szakal, Hanna, 1972]. Так, например, мышей линии C57BL6 тимэктомировали сразу после рождения [Grant, Miller, 1965]. Подопытным и контрольным мышам вводили по 200 мг метилхолантрена на животное. К 14-й нед после обработки саркомы возникли у 78% тимэктомированных животных и у 42% — ложнооперированных. Однако конечная частота новообразований и скорость их роста были одинаковыми в обеих группах. В аналогичных опытах [Nomoto, Takeja, 1969] неонатальная тимэктомия стимулировала возникновение индуцированных метилхолантреном опухолей у мышей AKR и CFI, но не C3H. Ранняя тимэктомия не оказала существенного влияния на индукцию опухолей некоторыми химическими канцерогенами [Johnson, 1968a; Balner, Dersjant, 1966; Law, 1966].

Таким образом, депрессия Т-системы при химическом канцерогенезе не всегда дает однозначные результаты, что, по-видимому, связано с методическими особенностями (вид канцерогена, доза, способ введения, возраст животных).

Если оценивать в целом экспериментальные материалы, то можно сказать, что ранняя тимэктомия в большинстве случаев ускоряет возникновение новообразований, однако это, как правило, проявляется лишь в начальных стадиях канцерогенеза (со-

кращение длительности латентного периода развития опухолей). Стимулирующее действие ранней тимэктомии обусловлено, по-видимому, угнетением противоопухолевого иммунитета. Об этом свидетельствуют, в частности, данные об индукции канцерогенами в опухолевых клетках выраженных специфических трансплантационных антигенов [Радзиховская, 1971; Груntenко, 1977; Klein, 1968]. Химические канцерогены, используемые в цитированных работах, сами обладают выраженным иммунодепрессивным действием, и поэтому на их фоне влияние тимэктомии менее заметно. Другое объяснение стимулирующего действия ранней тимэктомии заключается в предположении о существовании не связанного с иммунитетом гормонального влияния тимуса на пролиферацию нормальных и опухолевых клеток. В таком случае удаление тимуса будет, с одной стороны, нарушать иммунологический контроль за развитием злокачественных опухолей и способствовать таким образом малигнизации, а с другой — тормозить пролиферацию трансформированных клеток. Ряд факторов подтверждает это предположение. Например, есть данные о том, что даже когда у неонатально тимэктомированных мышей опухоли индуцировались канцерогенами легче, чем в контроле, темп роста опухолей в группе оперированных мышей был ниже [Grant, Miller, 1965]. При удалении тимуса во взрослом состоянии, когда иммунореактивность животных страдала в меньшей степени, отмечена не стимуляция, а торможение индукции опухолей бензпиреном [Fumagola, Giordano, 1962] и метилхолантреном [Smiesinski, Gorski, 1968]. Возможно, в этих случаях ингибирующее влияние тимэктомии на злокачественные процессы объясняется исключением гипотетического гуморального фактора тимуса, стимулирующего пролиферацию клеток прямо или косвенно через действие на другие эндокринные органы [Szent-Györgyi, 1965; Aoyama e. a., 1975].

ИММУНОДЕПРЕССИЯ И ИНДУКЦИЯ ОПУХОЛЕЙ ОНКОГЕННЫМИ ВИРУСАМИ

Поскольку вопрос об иммунодепрессии и индукции опухолей онкогенными вирусами подробно уже рассматривался другими исследователями [Красковский, 1970; Агеев, 1974; Говалло, 1977; Груntenко, 1973а, 1977; Фонталин, Певницкий, 1978; Шевелев, 1978; Дейчман, 1979; Лобко, Порубова, 1980; Baldwin, 1973; Kersey e. a., 1973; Klein, Klein, 1977], мы приведем лишь основные направления указанных исследований.

Ранняя тимэктомия животных существенно ускоряет индукцию опухолей аденовирусами 7, 21-го и 12-го типа и вирусом полиомы. Детально изучена роль тимуса в противоопухолевом иммунитете при индукции злокачественных новообразований вирусом полиомы. Последний при инфицировании им мышей в ран-

нем постнатальном онтогенезе индуцирует у животных большинства линий неопластический рост преимущественно в слюнных железах. Показано, что и сам вирус [Rowe e. a., 1958], и индуцируемые им новообразования [Sjögren e. a., 1961; Vanderputte, 1968] имеют специфические антигены и вызывают в норме иммунную реакцию организма. Взрослые мыши всех линий и поворожденные мыши C57BL устойчивы к онкогенному действию вируса, причем эта устойчивость не связана с его элиминацией. Вирус в организме животных размножается, хотя и образуются противовирусные антитела. Резистентность к онкогенному действию вируса связана с иммунологической реакцией организма. Неонатальная тимэктомия мышей C57BL или тимэктомия взрослых мышей CBA с последующим облучением резко нарушают их устойчивость к вирусу, а введение оперированным животным клеток селезенки или лимфоузлов сингенных (особенно иммунных) доноров восстанавливает резистентность. Лимфоподные клетки тимэктомированных доноров менее эффективны [Gaudas e. a., 1973; Ting, Law, 1967]. Трансплантация сингенного тимуса под кожу или внутрибрюшинно в миллипористой камере также восстанавливает резистентность тимэктомированных мышей [Law, 1967]. Нарушение устойчивости после тимэктомии не связано со снижением противовирусной реактивности организма. У тимэктомированных животных обнаруживаются те же титры противовирусных антител, что и у контрольных [Rowe e. a., 1958]. Взрослые мыши всех линий резистентны к действию вируса, но не устойчивы к трансплантации сингенной полиомной опухоли. Устойчивость к сингенной трансплантации опухоли может быть достигнута предварительной иммунизацией гомотрансплантатом полиомной опухоли или предварительным введением взрослым мышам вируса полиомы. Однако она не приобретается, если животные были тимэктомированы в 3-дневном возрасте [Law, 1967].

Принята следующая интерпретация этих данных [Sjögren e. a., 1961; Law, 1967]. Вирус полиомы трансформирует нормальные клетки в неопластические, содержащие новые клеточные антигены. Эти отдельные неопластические клетки опознаются и элиминируются в иммунологически компетентном организме, т. е. у взрослых животных. При этом происходит иммунизация специфическими опухолевыми антигенами, обеспечивающая резистентность к трансплантированной опухоли. Ранняя тимэктомия нарушает формирование иммунологической системы специфического противоопухолевого иммунитета.

Угнетение тимусзависимой иммунореактивности удлиняет период восприимчивости к ДНК-содержащим онкогенным вирусам, усиливает неопластическое действие последних и снимает естественную резистентность животных к ним. Механизм действия иммунодепрессии на канцерогенез ДНК-содержащими онкогенными вирусами опосредован через нарушение тимусзависимого специфического иммунитета не только к антигенам самого вируса, но

и к вирусиндуцированным антигенам трансформированных им клеток. Эти данные доказывают существование иммунного надзора при индукции опухолей ДНК-содержащими вирусами.

Вопрос о роли противоопухолевого иммунитета в канцерогенезе, вызванном РНК-содержащими онкогенными вирусами (онкорнавирусами), особенно важен, поскольку они считаются наиболее реальными претендентами на участие в естественном канцерогенезе, так как онкогенны для своих природных хозяев. Понятно, что изучение роли иммунитета в вирусном канцерогенезе на таких моделях наиболее близко к тому, что имеет место у человека. Кроме того, можно предполагать существование в природных системах особенностей взаимоотношений вируса и опухоли, с одной стороны, и иммунной системы, с другой, поскольку известно, что онкорнавирусы распространяются главным образом вертикально, могут встраиваться в геном хозяина [Голубев, Шляпкевич, 1972; Ирлин, Киселев, 1972; Агеев, 1974; Грунтенко, 1977] и, следовательно, индуцируемые ими антигены могут присутствовать в организме во время формирования лимфоидной системы в онтогенезе. Именно в природной системе вирус — хозяин отмечены шлоансы взаимоотношений, выработанные за время совместной эволюции.

Последнее является основанием дифференцировать при анализе противоопухолевого иммунитета в онкорнавирусном канцерогенезе результаты тех экспериментов, в которых опухоли индуцированы у неприродных хозяев (заражение птичьим вирусом саркомы Рауса млекопитающих) или искусственно (заражение вирусом Биттнера взрослых животных) и результаты, полученные в природной системе при естественном заражении вирусом (спонтанные опухоли молочной железы у мышей высококорковых линий, лейкозы у мышей высоколейкозных линий).

Перейдем к анализу экспериментальных данных. Как и при онкогенезе ДНК-содержащими вирусами, ранняя тимэктомия в некоторых случаях позволяет преодолеть видовую специфичность онкорнавирусов. Вирус мышинной саркомы Молони не вызывает опухолей у интактных крыс. Но после неонатальной тимэктомии заражение новорожденных крысят этим вирусом приводит к развитию опухолей на месте инъекции у 30—50% животных [Ting, 1967].

Удаление тимуса в раннем возрасте стимулирует развитие злокачественных процессов, индуцированных вирусом саркомы Рауса у неприродных хозяев. У крыс двух инбредных линий W/Fu и B/N удаляли тимус в 1-е сут после рождения. Тимэктомизированным и ложно оперированным животным в возрасте 4 нед инъекцировали вирус Рауса (штамм Шмидт — Руппин). У всех крыс возникли фибросаркомы. У подопытных животных обеих линий опухоли возникали на 4—8 нед раньше по сравнению с контролем [Borum, 1971; Sjögren, Borum, 1971]. В другом исследовании мышей линии C57BL тимэктомизировали в возрасте 6 нед, облучая

(350 Р) и заражая тем же штаммом вируса саркомы Рауса. У контрольных животных опухоли не развивались, у подопытных в 9 случаях из 28 (32%) возникли фибросаркомы [Koldovsky, Svoboda, 1965].

Изучалось влияние ранней тимэктомии на индукцию опухолей вирусами саркомы у тех животных, у которых данные вирусы выделены первоначально. Мышей СЗН/Ві и BALB/С тимэктомировали между 12-м и 108-м ч жизни. Вирус мышинной саркомы Harvey у контрольных мышей к концу 1-го мес после рождения вызвал у некоторых животных развитие эритробластической спленомегалии и сарком, а в более позднем возрасте — лимфоидного лейкоза. У тимэктомированных мышей СЗН/Ві число сарком было больше, чем в контроле, а у мышей BALB/с — наоборот. Операция предупреждала развитие лимфатической лейкемии у мышей обеих линий [East, Harvey, 1968]. Следовательно, зарегистрировано торможение после тимэктомии индукции вирусом лимфоидной лейкемии, но не представлено четких данных о влиянии операции на возникновение индуцированных сарком.

Интересные результаты по изучению действия тимэктомии и бурсэктомии на индукцию опухолей вирусом саркомы Рауса у его естественных хозяев (кур) получены Р. М. Радзиховской (1971). В первой серии опытов у цыплят в течение 48 ч после рождения хирургическим путем удаляли фабрициеву сумку. Ложнооперированные животные составляли контрольную группу. Всех птиц в возрасте 14—20 дней заражали вирусом саркомы Рауса. Разницы в возникновении опухолей у бурсэктомированных и контрольных птиц, зараженных вирусом в 14—30 дневном возрасте, не было, при более позднем заражении (возраст 60—90 дней) у бурсэктомированных птиц частота возникновения опухолей незначительно снизилась. Во второй серии экспериментов у части цыплят тимус удален в первые 3 дня после вылупления. Внутрикожная инокуляция вируса Рауса сделана на 10—12-й день. Внутрикожные опухоли на месте инъекции вируса у тимэктомированных птиц развивались примерно в 2 раза чаще, чем в контрольной группе, росли быстрее, чаще метастазировали и скорее вызывали гибель птиц.

По мнению автора, не гуморальные антитела, а тимусзависимые малые лимфоциты являются определяющими в противоопухолевом иммунитете. Этот вывод безусловно верен применительно к данной работе, однако назвать такую систему моделью естественного канцерогенеза можно лишь условно: использовался длительно пассируемый в лаборатории штамм вируса, заражение проводилось внутрикожной инъекцией и не при рождении, а в возрасте 10—12 дней.

То же можно сказать об исследованиях [Law e. a., 1968], в которых изучалось влияние ранней тимэктомии на индукцию опухолей вирусом саркомы мышей у животных этого же вида. У 3-дневных мышей С67ВL удаляли тимус, вирус инокулировали

15—75-дневным животным. В контрольной группе опухолей не отмечено, у тимэктомированных мышей прогрессивный рост опухолей наблюдался в 17—67% случаев.

Таким образом, удаление тимуса в раннем возрасте существенно облегчает онкорнавирусам преодоление видовых и линейных барьеров: при полном отсутствии индуцируемых ими новообразований у контрольных животных удаление тимуса в первые дни после рождения способствует развитию значительного количества неоплазм. Если после введения вируса у контрольных животных возникали опухоли, то тимэктомия в некоторых случаях ускоряла их развитие.

Изучение роли Т-системы в противоопухолевом иммунитете при неоплазмах лимфоидной ткани представляет особую трудность, так как зобная железа, с одной стороны, является центральным органом иммунной системы, а с другой — объектом малигнизации. Вместе с тем эта модель может иметь определенные преимущества, если удастся четко дифференцировать злокачественные процессы, происходящие в тимусзависимых (Т-система) и тимуснезависимых (В-система, миелоидные лейкозы) тканях.

Остановимся на вопросе о роли тимуса в генезе экспериментальных лейкозов. Показано [McEndy e. a., 1974; Furth, 1946], что тимэктомия эффективно предупреждает развитие спонтанной лейкемии у мышей высоколейкозных линий. Такие же данные получены при индукции лимфоидных лейкозов облучением и канцерогенами [Kaplan, 1950; Kaplan e. a., 1953]. Тимэктомия снижает количество заболеваний лейкемией, индуцированных вирусами Гросса [Gross, 1959], Молони [Moloney, 1960], Мазуренко [Степина, 1966] и не влияет на развитие ретикулоза, индуцированного вирусом Френд, гемоцитобластоза, индуцированного вирусом Раушера, и миелоидного лейкоза, вызванного вирусом Граффи [Miller, 1962]. Детальное исследование показало, что удаление тимуса тормозит развитие лейкозов лишь тогда, когда объектом малигнизации становятся тимусзависимые лимфоциты [Yokog, Ito, 1968]. По-видимому, тимэктомия снижает вероятность малигнизации и в меньшей степени влияет на пролиферацию лейкемических клеток, так как при трансплантации оперированным животным клеток сингенного лимфоидного лейкоза спонтанного происхождения отмечено некоторое ускорение роста последних [Abdou, McKenna, 1964].

Существенным моментом при этом является снижение числа Т-лимфоцитов, потенциально способных малигнизироваться под действием лейкозных вирусов, а также элиминация гормональных индукторов пролиферации Т-клеток. Это значительно затрудняет выяснение роли зависимого от тимуса противоопухолевого иммунитета в генезе таких лейкозов. Несколько яснее значение роли противоопухолевого иммунитета при обработке животных антилимфоцитарной сывороткой (АЛС), которая повреждает главным образом циркулирующие лимфоциты.

При введении АЛС снижается частота лейкозов, индуцированных облучением [Balner, 1970]. Многократное введение АЛС взрослым животным высоколейкозной линии АКВ уменьшает частоту возникновения спонтанных лимфом. Введение антилимфоцитарных антител мышам низколейкозной линии СЗН, зараженным сразу после рождения вирусом Гросса, удлиняет латентный период развивающихся лимфатических лейкозов. При заражении взрослых мышей СЗН вирусом лимфомы Гросса у интактных животных лимфомы не развиваются, дополнительные инъекции сразу после введения вируса иммунодепрессивных веществ (6-меркаптопурии, азатиоприна) не способствуют развитию лимфом, однако инъекции АЛС в этом случае индуцируют развитие последних у 39% животных [Vredevoe, Hays, 1969]. Инъекции 0,2—0,6 мл АЛС взрослым безмикробным мышам низколейкозной линии BALB/c и последующее заражение их вирусом мышинного лейкоза существенно увеличивали процент лимфоидных неоплазм. Введение вируса без АЛС индуцировало лейкоз у 2 мышей из 73 (2,7%), а с АЛС — у 75 из 95 (79%) [Law, 1973].

Таким образом, обработка АЛС мышей, зараженных сразу после рождения мышинными лейкозными вирусами, тормозит развитие лимфоидного лейкоза. То же воздействие на низколейкозных животных, зараженных вирусами во взрослом состоянии, резко стимулирует индукцию неоплазм.

Следовательно, прослеживается зависимость эффекта АЛС или тимэктомии от возраста заражения животных вирусами и их генетической резистентности к онкогенному действию последних.

В 70-е годы достигнут существенный прогресс в изучении генетического контроля резистентности к действию онкорнавирусов. Показано [Lilly, 1972], что чувствительность к действию вируса Френд, индуцирующего возникновение лейкемии, контролируется несколькими генами, определяющими вероятность трансформации вирусом клеток-мишеней иммунологический ответ на трансформированные клетки. Один доминантный ген определяет чувствительность клеток селезенки к трансформирующему действию вируса Френд, но не вируса Гросс (штамм А), другой ген определяет чувствительность хозяина к вспомогательным компонентам вируса Френд и к другим лейкемогенным вирусам [Lilly, 1970].

На генетической карте мышей в области локуса H-2 локализован ген резистентности к вирусу Гросс. Здесь же расположен ген иммунного ответа, регулирующий иммунореактивность животных на многие синтетические и природные антигены. Оба гена определяют степень иммунного ответа на мышинные лейкемические вирусы. Гены локуса H-2 контролируют выраженность поверхностных вирус-индуцируемых антигенов на лимфоидных клетках, трансформированных вирусом Френд. У мышей резистентных линий концентрация таких антигенов значительно выше, чем у чувствительных.

Следовательно, чувствительность мышей к тому или иному онкорнавирусу зависит, по-первых, от генетически контролируемой выраженности индуцированных вирусом антигенов на поверхности трансформированных им клеток и, во-вторых, от степени генетически контролируемого иммунного ответа на эти антигены.

Этот вывод, по-видимому, верен не только по отношению к лейкоэмическим онкорнавирусам, но и к другим РНК-содержащим онкогенным вирусам. Это подтверждают данные о зависимости от локуса H-2 чувствительности мышей к опухолегенному действию вируса Биттнера [Mühlbock, Dux, 1971].

Результаты изучения генетического контроля взаимоотношений иммунная система — индуцированная онкорнавирусом опухоль свидетельствуют, что даже у одного вида животных эти отношения могут существенно различаться. Тем более, по-видимому, существенны различия при индукции опухолей вирусами у их природных и неприродных хозяев. Это нужно учитывать при определении роли иммунного надзора в развитии неоплазм у человека.

Итак, противоопухолевые иммунные реакции организма либо не оказывают существенного влияния на развитие спонтанных лейкозов, индуцированных онкорнавирусами в природной системе, либо стимулируют их развитие. Данные о стимулирующем влиянии предварительного введения АЛС на индукцию лимфом при заражении животных вирусами во взрослом состоянии показывают, что тормозящее действие тимэктомии и АЛС в природных системах трудно объяснить лишь элиминацией чувствительных к вирусам лимфоцитов.

Таким образом, при индукции онкорнавирусами неоплазм лимфоидной ткани в природных системах у лабораторных животных накоплены факты, свидетельствующие либо об инертности иммунных реакций по отношению к развивающимся злокачественным процессам, либо об их стимулирующем влиянии на последние.

Под природными системами мы подразумеваем те случаи, когда вирус естественно встречается у особей данного вида и не подвергается экспериментатором направленной специальной селекции на способность индуцировать неоплазмы, и заражение животных происходит естественным путем без вмешательства человека.

Влияние иммунодепрессии на развитие вирусиндуцированных лейкозов у мышей может рассматриваться как исключение из общего правила стимуляции злокачественных процессов у иммунодепрессированных животных, так как применяемые для угнетения иммунореактивности воздействия так или иначе затрагивают ткани-мишени. Однако, как показано выше, такая трактовка не исчерпывает всей сути вопроса. Значительно труднее с позиций концентрации иммунного надзора объяснить результаты изучения влияния иммунодепрессии на индукцию опухолей онкорнавирусом в другой природной системе — при индукции опухолей молочной железы у мышей.

Американский исследователь Мартинес еще в 1964 г. впервые показал, что удаление тимуса на 6-й день после рождения у самок линии СЗН/Ві существенно задерживает возникновение опухолей молочной железы. У интактных самок опухоли развивались в 94,5% случаев, в то время как у тимэктомированных мышей они возникали лишь в 57,6%. Латентный период развития опухолей у тимэктомированных животных составлял 335 ± 16 дней, у контрольных — 276 ± 5 дней. Следовательно, у тимэктомированных мышей опухоли возникали реже и позже в среднем на 2 мес. Данные Мартинес неоднократно подтверждались другими исследователями.

Таким образом, иммунодепрессия однозначно стимулирует индукцию опухолей, развивающихся в результате экспериментального заражения животных ДНК-содержащими онковирусами. Сходные результаты, особенно четко выраженные в случаях индукции опухолей у неприродных хозяев, получены при экспериментальном заражении животных лабораторными штаммами онкорнавирусов. Эти две группы данных подтверждают концепцию иммунного надзора.

В то же время обнаружены факты, свидетельствующие об отсутствии стимулирующего действия и даже, напротив, зарегистрировано тормозящее влияние иммунодепрессии на индукцию новообразований онкорнавирусами в природных системах у мышей. Эти данные противоречат концепции иммунного надзора и требуют специального объяснения.

«ЧИСТАЯ» ИММУНОДЕПРЕССИЯ, ВРОЖДЕННОЕ ОТСУТСТВИЕ ТИМУСА И ОПУХОЛИ У МЫШЕЙ

Один из постулатов теории иммунного надзора [Burnet, 1970] говорит о том, что соматические мутации и другие, не зависящие от воли экспериментатора, факторы постоянно являются источником заметного количества злокачественных клеток, превращения которых в регистрируемые опухоли, как правило, не происходит благодаря их элиминации лимфоидной системой. Одним из способов проверки этого постулата является наблюдение за развитием раковых заболеваний у иммунодепрессированных, но не подвергавшихся дополнительным канцерогенным воздействиям лабораторных животных. Глейчманы [Gleichman, Gleichman, 1973] называют подобные исследования изучением влияния «чистой» иммунодепрессии на канцерогенез. Проанализировав результаты нескольких работ на эту тему, авторы приходят к выводу, что для лабораторных животных некоторые предсказания теории иммунного надзора не верны.

У мышей различных линий, иммунодепрессированных удалением тимуса вскоре после рождения [Law, 1969], не отмечено более частого возникновения неоплазм по сравнению с контролем.

Для сторонников концепции иммунного надзора определенной сенсацией стали результаты наблюдения за возникновением спонтанных новообразований у мышей с генетически детерминированным отсутствием тимуса.

В 1966 г. у мышей описана мутация (nu) по аутосомному рецессивному гену nude, фенотипически характеризующаяся у гомозиготных мышей (nu/nu) отсутствием волосяного покрова [Flanagan, 1966]. Такие животные названы «nude» (голые). Мыши nude, как и неопатально тимэктомированные животные, характеризуются вастинг-синдромом и короткими сроками жизни. Для этих мышей характерна лимфопения и атрофия лимфоидных органов (селезенка, лимфатические узлы) с резко выраженным истощением тимусзависимых областей. Всесторонняя характеристика иммунологического статуса мышей с врожденным отсутствием тимуса дана В. М. Манько (1979). В этом обзоре подробно описана патология клеточного и гуморального иммунитета к тимусзависимым и тимуснезависимым антигенам у бестимусных мышей, дана характеристика натуральных киллеров мышей nu/nu и рассмотрена возможность аутоиммунных осложнений у таких животных. У новорожденных мышей nu/nu тимус фактически отсутствует [Stutman, 1975a] и представлен рудиментом дольчатого строения, не имеющим дифференцированного эпителиального компонента и лимфоидных клеток. Дефект развития тимуса у мышей nude проявляется во всех возрастных группах животных и не зависит от пола. Таких мышей называют «бестимусными».

В 1969 г. мышам nu/nu без дополнительных воздействий трансплантирована опухоль человека [Rygaard, 1969; Rygaard, Poulsen, 1969]. В 1971 г. мышам nu/nu ввели клетки аденокарцином толстой или прямой кишок человека [Poulsen, Rygaard, 1971]. В 6 случаях из 9 гетероплантация оказалась удачной. В специальном исследовании [Visfeldt, 1972] было показано, что трансплантированные nu/nu клетки содержали только хромосомы человека.

Аналогичные результаты получены и другими исследователями при гетеротрансплантации самых разных опухолей человека [Грунтенко, 1977; Giovanella e. a., 1972, 1973, 1974; Poulsen e. a., 1973; Mach e. a., 1974]. При этом еще совсем недавно считалось, что у мышей nude спонтанные опухоли не возникают совсем. Ригаард, Паульсен [Rygaard, Poulsen, 1975], например, наблюдали 13 000 бестимусных мышей от рождения до 3-месячного возраста (3 мес — средняя продолжительность жизни мышей nude). Не зарегистрировано ни одного случая развития у них спонтанных опухолей. Кроме того, эти же авторы изучали развитие 15 700 мышей nude в течение длительного времени (до 10 мес), но и на этот раз образование спонтанной опухоли не зафиксировано [Rygaard, Poulsen, 1976].

Отсутствие спонтанных опухолей у бестимусных мышей можно было бы отнести к одному из иммунологических парадоксов [Stutman, 1975a], поскольку дефект развития Т-системы у мышей

nude, согласно концепции Бернета, должен сопровождаться возрастанием частоты спонтанных опухолей. Это парадоксальное явление, по-видимому, объясняется короткими сроками жизни, а также тем, что мышей разводят в помещениях, свободных от влияния экзогенных канцерогенов [Rygaard, Poulsen, 1974]. Поместив мышей nude в безмикробные условия и добившись существенного увеличения продолжительности их жизни, исследователи различных лабораторий обнаружили у них спонтанные новообразования [Stutman, 1975a, 1979; Machado e. a., 1977; Sharkey, Fogh, 1979a; Tralka e. a., 1977]. Описана, например, спонтанная лимфосаркома, возникающая у бестимусной мыши [Tralka e. a., 1977].

Опухоль состояла из напоминающих лимфоидные круглых или слегка овоидных клеток, из которых были получены перевиваемый штамм и клеточная линия NML-1. Клетки линии MNL-1 после 6 мес культивирования *in vitro* утратили сходство с лимфоидными и приобрели ультраструктурное сходство с макрофагами. С последними их сближала также способность к фагоцитозу. Примерно 20% культивируемых клеток содержали вирусные частицы С-типа.

У 6-месячного самца мыши nude обнаружили дифференцированную саркому без признаков метастазирования [Machado e. a., 1977]. Описана частота и патологоанатомические особенности спонтанных опухолей у 1141 бестимусных безволосых мышей обоего пола линии Swiss, наблюдавшихся 26 мес [Sharkey, Fogh, 1979]. В 6-месячном возрасте им перевивали различные опухоли человека. Одновременно с перевитыми у животных развивались спонтанные опухоли, из них 75% были лимфоретикулярными и 25% — аденомами легких, причем частота спонтанных опухолей у мышей nude и у нормальных сингенных животных той же линии оказалась сходной. Существенной разницы в частоте возникновения спонтанных опухолей у бестимусных мышей nude и их нормальных собратьев не отмечено [Stutman, 1975a, 1979]. В одном исследовании [Stutman, 1975a] наблюдали колонию мышей nu/nu, содержащихся в безмикробных условиях в течение 2 лет. В этой колонии средняя продолжительность жизни самцов составила 107 нед, а виргинных самок — 100 нед. У самок бестимусных мышей линии СЗН, которых наблюдали на протяжении только 7 мес, опухоли молочной железы встречались редко (10—15%), тогда как их частота резко возрастала, если животные жили больше года. Это свидетельствует о том, что 7 мес — слишком короткий период, чтобы судить об отсутствии спонтанных опухолей у мышей nude, как это сделано раньше [Rygaard, Poulsen, 1974]. При изучении встречаемости спонтанных опухолей у мышей nude обнаружено, что в одной группе самцов nu/nu и nu/+ (35 и 33 животных соответственно) за 70-недельный период наблюдения возникали спонтанно: лимфомы (6% у nu/nu; 3% у nu/+); ле-

гочные аденокарциномы (11% у nu/nu ; 12% у $nu/+$) и гепатомы (6% у nu/nu ; 7% у $nu/+$).

За период наблюдения (15 мес), равный максимальной продолжительности жизни в колонии мышей nu/nu , лимфомы, легочные аденокарциномы и гепатомы обнаружены соответственно у 4,12 и 22% животных. Таким образом, полученные данные показали, что частота образования спонтанных опухолей у мышей не отличается от таковой у нормальных животных соответствующей линии. При этом отмечен высокий процент возникновения ретикулярных опухолей у старых бестимусных мышей. Частота лимфом у этих животных оказалась несколько выше, чем у нормальных животных с тем же генотипом. В специальных исследованиях [Stutman, 1975a, 1979] изучали влияние внесения в геном бестимусных мышей *nude* доминантного гена A^{vy} (viable yellow). A^{vy} стимулирует у мышей развитие спонтанных опухолей. Оказалось, что в относительно раннем возрасте (23 нед) процент этих опухолей был сравним у nu/nu и $nu/+$ животных, носителей гена A^{vy} . У 50-недельных мышей также не найдено существенных различий между nu/nu , $nu/+$ и нормальными животными, несущими ген A^{vy} , по частотам возникновения спонтанных опухолей. Однако частота лимфом у мышей nu/nu (10%) была несколько выше, чем у мышей $nu/+$ и $+/+$ (15%).

Показано, что влияние гена A^{vy} на возникновение опухолей в значительной степени зависит от линии животных, которой ген введен. У животных линии А ген A^{vy} повышает частоту формирования легочных аденом, внесение A^{vy} в генотип СЗН способствует повышению частоты образования спонтанных опухолей молочной железы и гепатом, тогда как тот же самый ген у мышей СЗНf, свободных от вируса Биттнера, вызывает учащение случаев образования холангиом.

В одной из работ [Stutman, 1979] исследовали бестимусных мышей *nude*, частично скрещиваемых с СВА/Н. Получены обычные и бестимусные мыши, содержащие и не содержащие ген A^{vy} . В течение 600 дней у обычных и бестимусных мышей, имевших ген A^{vy} , частота опухолей легких, печени и некоторых других органов была выше, чем у нормальных и бестимусных, не имевших этого гена. Таким образом, у мышей частота опухолей не зависела от наличия тимуса. Штутман считает, что полученные факты противоречат предположению о том, что тимус играет ключевую роль в противоопухолевой защите организма, поскольку иммунологические исследования, проведенные на мышях СВА/Н-А nu/nu , не показали разницы в иммунологической реактивности этих животных по сравнению с нормальными мышами СВА/Н- A^{vy} .

Известно сравнительно небольшое количество работ, посвященных вирусному канцерогенезу у бестимусных мышей. Некоторые исследователи [Stutman, 1975a, 1979] считают, что только к вирусу полиомы мыши *nude* обнаруживают повышенную чувствительность, приводящую к более частому возникновению нео-

плазм по сравнению с их нормальными собратьями. Однако существуют и другие мнения [Gerschwin, Ikeda, 1979].

Несколько работ посвящено изучению химического канцерогенеза у мышей nu/nu . Бестимусным nu/nu и иммунологически нормальным $nu/+$ мышам, полученным в результате скрещивания самцов nu/nu с самками СВА/Н, сразу после рождения подкожно вводили по 0,1 мг 3-метилхолантрена [Stulman, 1975в]. Через 180 дней саркомы развивались у 17 из 30 мышей $nu/+$ (56%), у 15 из 30 мышей nu/nu (50%) и у 7 из 12 мышей nu/nu с трансплантатом вилочковой железы (58%). Латентный период развития опухолей у $nu/+$ и у nu/nu был одинаков. В то же время мыши nu/nu не отторгали аллогенного трансплантата кожи. В этом эксперименте выявлена относительно высокая частота развития амилоидоза в селезенке, печени и тонких кишках у мышей nu/nu , получивших 3-метилхолантрен, в отличие от животных $nu/+$. В этой работе не было выявлено существенных различий в частоте развития аденом легких у $nu/+$ и nu/nu , получивших при рождении до 0,5 мг уретана. Лишь лимфомы у мышей nu/nu после введения уретана развивались реже, чем у $nu/+$. Автор делает вывод, что отсутствие зависимой от вилочковой железы иммунной системы не влияет на развитие опухолей, индуцированных химическими канцерогенами.

Уретан обладает преимуществами перед другими химическими канцерогенами при использовании его в опытах на бестимусных мышах. Он сравнительно мало токсичен, водорастворим, наиболее активно вызывает аденомы легких при введении препарата в раннем постнатальном онтогенезе. Индуцированные уретаном аденомы легких макроскопически выявляются уже через 1,5—3 мес после введения. Множественный характер этих опухолей позволяет использовать в опытах сравнительно небольшое число животных. В лаборатории генетики рака Института цитологии и генетики СО АН СССР эксперимент по изучению влияния генотипа nu/nu на уретановый канцерогенез был поставлен на однопометных бестимусных и иммунологически нормальных животных [Каледин и др., 1978]. Мыши nu/nu завезены в 1972 г. из Института генетики животных (Эдинбург, Великобритания) и с тех пор поддерживаются в виварии Института цитологии и генетики СО АН СССР путем скрещивания гетерозиготных особей $+/nu$. Всем безволосым мышатам и равному количеству нормальных мышат того же пола в каждом из 14 пометов был введен уретан внутрибрюшинно по 1 мг/г. Через 7 дней канцероген в той же дозе ввели повторно. Животных наблюдали до момента гибели одного из партнеров (это всегда были мыши $nude$), после чего сразу же забивали и второго. Извлекали легкие и фиксировали в 10%-ном формалине. Аденомы учитывали, исследуя легкие под лупой МБС-1 при увеличении 8×2 . Всего было учтено 10 пар мышей; 6 пар, в которых мыши пали раньше чем через 2 нед после введения канцерогена, были исключены. У 70% нормальных мышей в

Таблица 3

Индукция уретаном опухолей легких у однопаметных иммунологически нормальных и бестимульных мышей

№ пары помета	Пол	Возраст в момент введения уретана, дней	Продолжительность жизни, дней		Число аденом легких на мышь	
			Всего	В том числе после первого введения уретана	У иммунологически нормальных мышей +/+ и +/-	У иммунологически дефицитных мышей +/-
1	Самки	54 и 61	152	98	0	0
2	»	49 и 56	75	25	0	1
3	»	41 и 48	157	116	1	0
4	»	28 и 35	87	59	1	0
5	»	15 и 22	72	57	0	0
6	»	12 и 19	74	62	3	0
7	Самцы	12 и 19	81	69	1	0
8	Самки	11 и 18	80	68	1	0
9	»	8 и 15	57	49	2	0
10	Самцы	8 и 15	67	59	3	1
Всего мышей с аденомами легких					7	2
Общее число аденом					12	2
Среднее число аденом на мышь					$1,2 \pm 0,36$	$0,2 \pm 0,13$
					$P < 0,05$	
					$P < 0,05$	

результате воздействия уретана развились аденомы легких, причем у трех животных было 2—3 опухоли (табл. 3).

Частота развития аденом и их число увеличивались с уменьшением возраста, в котором животные получали канцероген. Что же касается иммунологически дефицитных мышей *pu/pu*, то, в противоречии с теорией иммунологического надзора, число опухолей легких у них было не больше, а достоверно меньше, чем у нормальных животных (у 2 из 10). При объяснении этого факта с иммунологических позиций следует, очевидно, привлекать иммуностимуляционную теорию. Можно допустить, что у нормальных мышей иммунитет стимулирует развитие опухолей легких, а иммунодепрессия, снижающая эту стимуляцию, снижает их частоту. Этому предположению противоречат, однако, данные о том, что ранняя тимэктомия либо не влияет, либо стимулирует уретановый канцерогенез в легких мышей.

Неодинаковая чувствительность нормальных и бестимульных мышей к канцерогенному действию уретана может быть связана с плеiotропным влиянием гена *pu* на легочную ткань, делающим ее менее склонной к неопластическому перерождению, а также на активность систем, осуществляющих метаболические превращения канцерогена. Поскольку непосредственно активным в канцерогенном отношении является сам уретан, а не продукты его метаболизма, увеличение скорости метаболизма уретана в организме

должно приводить к снижению частоты вызываемых им опухолей. Пока нет работ, в которых бы изучалась активность гидроксилирующих уретан ферментов у мышей *nude*.

Нельзя исключить и того, что низкая частота опухолей у мышей *nude* в наших экспериментах является следствием их относительно медленного роста. Так, если в 4—5-дневном возрасте масса использованных нормальных мышей составляла в среднем 3,9 г, то у их однопаметных сибсов она не превышала 2,5 г. Даже в 2-месячном возрасте мыши *nude* были в 1,5—2 раза легче, чем нормальные. Это связано, по-видимому, с нарушением у них функции гипофизарно-адреналовой и тиреоидной систем [Piergalli, Sorkin, 1972], участвующих в контроле роста. Между тем показано, что воздействия, тормозящие рост, угнетают уретановый канцерогенез у мышей [Танненбаум, Сильверстон, 1955], в то время как агенты, стимулирующие его, усиливают. По-видимому, медленный рост мышей явился причиной относительно малого числа индуцированных у них опухолей. Однако независимо от этого полученные данные свидетельствуют, что в определении частоты развития индуцированных уретаном опухолей легких у мышей решающая роль принадлежит не иммунитету.

Изучено развитие папиллом, вызванных диметилбензантраценом (ДМБА) у бестимусных мышей и наследственно безселезеночных (*Dh/+*) мышей [Gerschwin, Ikeda, 1979]. Оказалось, что у иммунологически дефектных мышей *nu/nu* и *Dh/+* латентный период развития папиллом существенно длиннее по сравнению с таковым у контрольных нормальных мышей, однако общая частота возникновения опухолей у *nu/nu* и *Dh/+* была достоверно выше, чем в контроле. Число опухолей на мышью в подопытных группах также больше, чем у иммунологически нормальных контрольных животных. На основании этих, на наш взгляд далеко не однозначных, данных авторы делают выводы о важной роли состояния иммунитета как фактора, влияющего на химический канцерогенез.

Установлено, что ультрафиолетовый канцерогенез у мышей, лишенных Т-клеток, менее выражен по сравнению с таковым у интактных животных [Nurbury, Kripke, 1978]. Индукция опухолевого роста у мышей *nu/nu* онкорнавирусами или характеризуется теми же показателями, что и у нормальных мышей, или показывает большую чувствительность таких животных к индукции новообразований [Stutman, 1975a]. Изучено развитие опухолей у безволосых мышей, зараженных вирусом полиомы [Stutman, 1979]. 15-дневным мышам *nu/nu*, лишенным тимуса, а также контрольным *nu/+*, полученным скрещиванием *nu/nu* с мышами линии СВА, вводили штамм L1D1 вируса полиомы. У мышей *nu/nu* опухоли возникали в 83% случаев, а у *nu/+* — в 5—10%. Трансплантация животным *nu/nu* тимуса новорожденных СВА/Н Т6Т6 снижала процент индукции опухоли до 16. Однако если тимус помещали в диффузную камеру, снижения частоты возникнове-

вения опухолей не отмечалось. При инъекции вируса полиомы мышам *nu/nu* в возрасте 30 дней опухоли возникали у 90% животных, а у *nu/+* не возникали вовсе. При заражении вирусом полиомы 4-месячных *nu/nu* опухоли у реципиентов не развивались. При введении нормальных клеток селезенки 4-месячным *nu/nu* реципиентам, зараженным вирусом полиомы при рождении, процент индукции опухолей у них снижался до 33. Показано, что подобная резистентность передается В-лимфоцитами. Полагают [Minato e. a., 1979], что слабый вирусный канцерогенез у взрослых мышей объясняется развитием у них особой популяции лимфоцитов-естественных киллеров, которая сильно активизируется в присутствии вирусных частиц.

При изучении действия гена *nude* на развитие опухолей, индуцированных вирусом M-M sv у бестимусных мышей, показано, что у *nu/nu*, в отличие от *nu/+* и нормальных животных, возникшие опухоли никогда не регрессируют. В контроле регрессия составила 85—100% [Stutman, 1975a].

Иммунологическая природа регрессии таких опухолей, ее зависимость от Т-системы лимфоцитов установлена. Однако необъяснимо, что время появления опухолей было отсрочено у мышей *nude*, несмотря на то, что опухоли в 100% случаев не давали регрессии. Например, у *nu/+* латентный период возникновения опухолей составил $6,5 \pm 1,9$ дней, тогда как у *nu/nu* мышей — $19,4 \pm 2,8$ дней. Отсроченное появление опухолей, индуцированных вирусом M—MSV, не может быть приписано встречающимся естественным цитотоксическим антителам, обнаруженным в сыворотке у мышей *nude*, поскольку животные с наличием заметного титра естественных антител и животные с малым содержанием таких антител не различались между собой по латентному периоду возникновения опухолей [Stutman, 1975a].

Метастазирование спонтанных опухолей у бестимусных мышей *nude* еще не зарегистрировано. Возможно, это связано с тем, что срок жизни бестимусных мышей не позволяет спонтанно возникающим опухолям достигнуть в своем развитии этапа метастазирования [Nicolson, 1979; Stutman, 1975a]. Следует учитывать также, что спонтанные опухоли животных по каким-то еще не совсем понятным причинам редко метастазируют даже у нормальных животных [Alexander, 1974].

Отмечено, что из многочисленных аллогенных, ксеногенных и сингенных трансплантатов опухолей, перевитых мышам *nude*, метастазируют лишь немногие, хотя эти же опухоли при перевивке нормальным сингенным реципиентам, как правило, дают метастазы [Wiltrout e. a., 1979]. Это непонятное явление продемонстрировано в сингенной, аллогенной [Fidler e. a., 1977] и ксеногенной системах [Gerschwin, Ikeda, 1977; Graham e. a., 1978; Schmidt, Good, 1975]. Даже такой сильно метастазирующий штамм опухолевых клеток, как меланома B-16, у мышей *nude* практически не метастазирует [Fidler, 1977], что тем более непонятно,

поскольку бестимусные мыши не отторгают трансплантаты сильно метастазирующих опухолей человека, включая аденокарциному прямой и толстой кишок, злокачественную меланому, злокачественную тератому, фибросаркому, остеосаркомы и многие другие [Sharkey, Fogh, 1979в]. Отсутствие метастазов характеризует ксеногенные опухоли, трансплантируемые мышам. В одной работе [Stutman, 1975a] наблюдали метастазирование в легкие и печень у 50% мышей *nu/nu* при подкожной перевивке им сингенной метастазирующей аденокарциномы мышей СЗН. Опухоли росли только у сингенных животных. При этом оказалось, что и процент отдаленных метастазов у нормальных и неонатально тимэктомированных мышей СЗН был сравним с таковым у мышей *nude*.

Итак, обычно трансплантированные мышам *nude* опухоли растут локально и не дают метастазов. Но в ряде случаев при перевивке сингенных опухолей удается обнаружить и метастазирование опухолей. Подсадка тимуса, как правило, вызывает регрессию трансплантатов ксеногенных опухолей [Schmidt, Good, 1975]. Так, бестимусным мышам через 1—5 нед после трансплантации им аденокарциномы толстой кишки, злокачественной меланомы и лимфомы Беркита человека имплантировали тимус мышей неонатального возраста [Jacobson *et al.*, 1979]. У всех животных через 2—3 нед после трансплантации тимуса начиналось отторжение опухолей, которое заканчивалось через 3—6 нед. При гистологическом исследовании выявлена корреляция между иммунологическим восстановлением и отторжением опухоли. Наличие иммуноглобулинов в очаге опухоли на ранних стадиях ее отторжения у части мышей указывает на их возможное участие в этом процессе. При изучении роста тератокарцином, развивающихся из эмбрионов, трансплантированных бестимусным мышам, сделан вывод, что отсутствие функционирующих Т-лимфоцитов не только не стимулирует образование тератокарциномы у реципиента, но даже наоборот, подавляет его [Solter, Damiano, 1979]. В течение 30 мес наблюдали рост и метастазирование 106 различных линий злокачественных опухолей человека, трансплантированных 1045 мышам *nude* [Sharkey, Fogh, 1979]. Микроскопические исследования проведены у 77% животных. Метастазы обнаружены только у 14 (1,3%) мышей с трансплантатами 11 различных линий опухолей. Наиболее часто метастазировали опухоли молочной железы (3 и 9 линий клеток). Все линии клеток, вызывающие метастазы у бестимусных мышей, оказались эпителиального происхождения. Саркомы у мышей *nude* не метастазировали. Частота метастазирования при пассивировании метастазирующих опухолей не изменялась. Метастазы локализовались в легких, лимфатических узлах и селезенке. Метастазирование связано с большими опухолями, обладавшими инвазивным ростом. В ряде работ показано, что трансплантаты первичных опухолей человека, не метастазируя у мышей *nude*, приобретают способность к метастази-

рованию у тех же мышей в результате пассирования их клеток *in vitro* [Zamechnik, Long, 1977]. Первичная прививаемость человеческих опухолей бестимусным мышам довольно высока — 35,7%.

Бестимусным мышам линии BALB/c трансплантировано 315 человеческих опухолей различной этиологии [Ревазова, Юдичева, 1980]. В результате серийных трансплантаций получено 10 опухолевых штаммов, обладающих стабильными характеристиками роста. Показано, что трансплантаты из метастазов и рецидивирующих узлов растут у мышей *nude* лучше, чем трансплантаты из первичных опухолевых узлов. Аденокарцинома толстой кишки, рак почки, рак легких и саркомы обладали 50%-ной прививаемостью. Особую группу составляли саркомы, которые, обладая высокой прививаемостью, дифференцировались вплоть до окостенения к 4—7-у пассажу. Низкой степенью прививаемости обладали гормонзависимые опухоли: рак молочной железы, яичников, тела и шейки матки, хоринэпителиомы. Рост этих опухолей в значительной степени определялся гормональным статусом реципиента. Бестимусным мышам трансплантировали 33 раковых опухоли человека. Показано [Makatani e. a., 1979], что прививаемость этих опухолей зависит от степени их дифференцированности: из 45% привившихся опухолей более 70% представляли собой высокодифференцированный рак. Эти опухоли не метастазировали при подкожном способе перевивки. Инвазивный рост опухоли и ее метастазирование можно было зарегистрировать лишь когда она развивалась внутри брюшной полости.

Лоззио с сотрудниками [Lozzio e. a., 1979] изучали воспроизводимый метастатический рост клеток K-562 человеческого миелолейкоза у безволосых мышей *nude*. Несмотря на то, что после подкожной трансплантации клеток K-562 у взрослых мышей развиваются хорошо васкуляризированные миелосаркомы, метастазов у них не наблюдалось, хотя лейкозные клетки высвобождались в систему циркуляции. Трансплантация клеток той же опухоли новорожденным мышам вела впоследствии к развитию у них метастазов в легких, почках, головном мозге и в лимфатических узлах. Обнаружена интересная особенность метастазирования у мышей *nude* BALB/c опухоли ESMТ6 [Courdi, Malaise, 1979]. Частота метастазирования в лимфатические узлы выше у самок, чем у самцов той же линии BALB/c. Приведенные факты лишь раз подтверждают, что далеко не все особенности метастазирования у мышей *nude* объяснимы с позиций иммунологии.

Фридман с сотрудниками (1978) обнаружил так называемое извращенное метастазирование у мышей *nude*. Слабо метастазирующие в сингенной системе опухоли крыс метастазировали у бестимусных мышей, и наоборот, сильно метастазирующие опухоли крыс не давали метастазов у мышей.

В лаборатории генетики рака Института цитологии и генетики СО АН СССР изучалась способность к метастазированию клеток

различных опухолевых штаммов мышей: MM T-1 (перевивная опухоль молочной железы мышей C3H/He), LS (злокачественная сублиния фибробластов мышей C3H, полученная в лаборатории из L-клеток), гепатома 22а. Эксперименты проводились на иммунологически нормальных и бестимусных безволосых мышах nude, частично гибридных по генотипу C3H. Показано, что при внутривенном способе введения опухолевых клеток нормальным мышам метастазы локализуются преимущественно в легких. Штамм MMT-1 давал наибольшее число метастазов в легких, а гепатома 22а — наименьшее. Такую же закономерность наблюдали и на бестимусных мышах nu/nu. Например, внутривенное введение 10^6 клеток MMT-1, LS и гепатомы 22а мышам nu/nu C3H/He приводило к развитию метастазов в легких на 15—16-й день соответственно у 100, 75 и 66% мышей. Среднее число метастазов в легких составило соответственно $173, 3 \pm 84,3$, $8,5 \pm 0,5$ и $2,5 \pm 1,5$. В одном из подобных экспериментов на иммунологически нормальных мышах эти же цифры для MMT-1, LS и гепатомы 22а составили соответственно $100,0 \pm 30,0$, $5,4 \pm 2,3$, $2,4 \pm 1,7$. Таким образом, на основании пока еще предварительных данных можно заключить, что у иммунологически дефектных бестимусных мышей nude интенсивность процесса образования метастазов в легких, вызванных внутривенным введением опухолевых клеток, сходна с таковой иммунологически нормальных животных.

У лимфоидных клеток, взятых от мышей различных гибридных линий, была обнаружена естественная цитотоксичность по отношению к ряду сингенных и аллогенных опухолей [Herberman e. a., 1975]. Наибольшей цитотоксичностью обладали эффектор-ные клетки, взятые у бестимусных мышей nude. Клетками, чувствительными к действию естественных киллеров, оказались клетки опухолей, индуцированных онкогенными вирусами С-типа, а также опухолей, вызванных другими способами, но содержащих эндогенные вирусы С-типа. Уровень естественной цитотоксичности лимфоидных клеток бестимусных мышей зависел от их возраста, достигая максимума у 5—8-месячных животных. Показано, что естественная цитотоксичность связана с функционированием особой популяции лимфоцитов, отличающихся по своим характеристикам от ранее известных [Herberman e. a., 1975].

Клетки культурных линий ВНКИ и HeLa прививали безволосым мышам nude линии BALB/c. Развитие опухолей отмечено у 100% реципиентов при инокуляции им всего 10—100 клеток. Прививка мышам nude клеток ВНКИ и HeLa от мышей, зараженных вирусами кори, паротита, гриппа, везикулярного стоматита и бешенства, не приводила к развитию опухолей даже при инокуляции животным $2 \cdot 10^7$ клеток. Иммунологическая природа непрививаемости зараженных вирусами клеток была доказана тем, что после облучения мышей nude (600R) эти клетки развивались в опухоли. Клетками, ответственными за отторжение инфицированных ВНКИ и HeLa, являлись естественные киллеры, а не В-Т-

клетки или макрофаги. Неинфицированные клетки опухолей, в отличие от инфицированных, не вызывали усиления цитотоксической активности естественных киллеров против интактных неинфицированных клеток-мишеней ВНКИ и HeLa [Minato e. a., 1979].

Клетки селезенки обладали цитотоксичностью для лимфоидных опухолей RBL-S, NAC, FBL-3, EL-4, RL-1; для клеточных линий эмбриональных фибробластов (спонтанных или трансформированных вирусом). 3T12, SV3T3, 3T3, SVA31 C14, T—AL (NCI₃, T-S-1, T-S-3); и лишь некоторой цитотоксичностью для солидных опухолей 75209 и MCAL, индуцированных метилхолантеном. Обнаружены низкая цитотоксичность к аллогенным и сингенным перитонеальным макрофагам, клеткам тимуса, костного мозга и очень слабая цитотоксичность к клеткам рака молочной железы L8a и T43. Клетки селезенки мышей BALB/c совсем не обладали цитотоксичностью *in vitro* по отношению к клеткам селезенки и лимфатических узлов нормальных сингенных мышей [Nunn e. a., 1977].

Было показано [Klein e. a., 1979], что чувствительность опухолевых клеток к действию естественных киллеров *in vitro* не отражает способности этих клеток к формированию опухолей у мышей *nude in vivo*. Кроме того, обнаружено [Fogel e. a., 1979], что клетки метастазов более резистентны к цитотоксическому действию естественных киллеров, чем клетки первичных опухолей. Эти факты косвенно свидетельствуют о том, что НК-клетки не играют определяющей роли в процессе метастазирования у мышей *nude*.

* *

*

Таким образом, из данных, приведенных в этом разделе, можно заключить, что отсутствие Т-системы клеточного иммунитета у бестимусных безволосых мышей *nude*, как правило, не приводит к большей выраженности злокачественных процессов у мышей *nude* по сравнению с нормальными животными. Даже наоборот, в некоторых случаях (при образовании спонтанных опухолей, при некоторых видах канцерогенеза, при метастазировании) у мышей *nude* отмечается ослабление развития этих процессов по сравнению с животными с развитой Т-системой. Далеко не все особенности злокачественных процессов у мышей *nude* могут быть объяснены с позиций иммунологии.

ВЛИЯНИЕ ТИМЭКТОМИИ НА ВОЗНИКНОВЕНИЕ И РОСТ ОПУХОЛЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

Для понимания взаимоотношений между опухолью и лимфоидной системой организма требуется изучение их зависимости от генотипа опухолепосителей и природы онкогенных факторов, способствующих новообразованию. Этому и посвящен данный раздел, суммирующий результаты исследований, проведенных в лаборатории генетики рака Института цитологии и генетики СО АН СССР [Беляев, Груntenко, 1970; Беляев и др., 1970а; Belyaev, Gruntenko, 1972а; Груntenко, 1973а, б, 1975, 1977; Gruntenko, 1973, 1979; Бородин и др., 1976; Груntenко, Матиенко, 1977; Gruntenko, Matienko, 1980].

Задачи исследования: изучение влияния тимусзависимой лимфоидной системы на возникновение и рост опухолей молочной железы у мышей; поиск морфологических и функциональных особенностей лимфоидной системы животных, наследственно предрасположенных к раку; выяснение зависимости эффектов угнетения лимфоидной системы на злокачественные процессы от генотипа животных, присутствия в их организме онкогенного вируса Биттнера (MTV — S) и степени соответствия экспериментальной модели естественным условиям.

В работе использованы мыши линий СЗН/Не, СЗНf, А/HeJ, ДД, ВКР, BALB/с и С57BL. В опытах, в частности при анализе зависимости веса тимуса от генотипа животных, использованы также реципрокные гибриды между мышами этих линий и беспородные животные. Для регистрации спонтанных опухолей молочных желез мышей осматривали раз в неделю, отмечали животных с появившимися опухолями и следили за ростом последних. Выборочно часть опухолей описывали гистологически и проверяли на способность расти при сингенных перевивках. В некоторых экспериментах использовали девственных самок, в других — нормально или форсированно размножавшихся. В части опытов для ускорения возникновения опухолей молочных желез подопытным и контрольным самкам под почечную капсулу трансплантировали дополнительные сингенные гипофизы. После трансплантации опухолей реципиентов осматривали два раза в неделю, учитывали время появления пальпируемых узелков и начало прогрессивного роста неоплазмы. В конце опыта всех животных забивали и опухоли взвешивали. Для трансплантации в большинстве экспериментов использовали спонтанно возникшие или прошедшие не больше 3—5 пассажей опухоли молочных желез мышей СЗН/Не, А/HeJ, СЗНf и С57BLf, СЗН.

Взвесь опухолевых клеток готовили по общепринятым методикам [Беляев, Груntenко, 1970]. Тщательно следили за тем, чтобы животные подопытных и контрольных групп получали одинаковую взвесь опухолевых клеток. Для этого взвесь клеток после каждой инъекции перемешивалась, а животные всех групп все время чередовались при введении клеток. Удаляли тимус у мышей в первые дни после рождения по методу, описанному Миллером [Miller, 1961] и Мартинесом [Martinez, 1964], у взрослых мышей по методу Груntenко (1977). При сравнении средних значений во всех экспериментах достоверность оценивалась по критерию Стьюдента. Для определения достоверности различий между группами по величине доли животных с возникшими опухолями использовался критерий Фишера для малых выборок.

Одной регистрации иммунного ответа опухоленосителя на антигены злокачественной опухоли недостаточно для понимания места иммунных реакций в противоопухолевой резистентности организма. В лабораторном эксперименте *in vivo* и *in vitro* показано, что и гуморальные, и клеточные факторы иммунного ответа могут не только оказывать цитотоксическое и цитостатическое действие на опухолевые клетки, но и стимулировать их пролиферацию [Prehn, 1971; Medina, Herpner, 1973; Jeejeebhoy, 1974; Shearer e. a., 1975; и др.]. Взаимодействие разных факторов иммунного ответа друг с другом (блокирующие антитела, клетки-супрессоры) затрудняет выяснение роли иммунных реакций в возникновении и развитии спонтанных новообразований.

Яркой иллюстрацией неясности в данном вопросе является существование двух во многом противоположных точек зрения на значение иммунных реакций в развитии злокачественных процессов: концепции иммунного надзора [Burnet, 1970; Бернет, 1971] и теории иммуностимуляции развития опухолей [Prehn, 1971; Prehn, Larpe, 1971].

Результаты, полученные в работе Мартинеса [Martinez, 1964], образуют границу между большой группой фактов, положенных в основу концепции иммунного надзора, и экспериментальной базой теории иммуностимуляции развития новообразований. Лабораторная модель опухолей молочных желез у мышей близка к «естественному» канцерогенезу, так как опухоли возникают без всяких дополнительных канцерогенных воздействий со стороны экспериментатора. Выбор этой модели для изучения влияния лимфоидной системы на развитие злокачественных процессов обусловлен ее уникальными особенностями: существованием контрастных по своим генетическим характеристикам мышей высоко- и низко-раковых линий, возможностью сравнить влияние систем организма генетически однородных животных на развитие злокачественных процессов в одном и том же органе, происходящее или с участием MTV-S, или без него, и, наконец, онкогенный вирус вызывает в этой модели злокачественные опухоли у своих природных хозяев. Таким образом, экспериментальная система может быть

отнесена к разряду природных: собственный онкогенный вирус, естественное заражение и развитие опухолей без дополнительных канцерогенных воздействий со стороны экспериментатора.

ИММУНОДЕПРЕССИЯ И ОПУХОЛИ МОЛОЧНЫХ ЖЕЛЕЗ У МЫШЕЙ ВЫСОКОРАКОВЫХ ЛИНИЙ

Самок высокораковой линии СЗН/Не тимэктомировали (ТЭ) на 6-й день после рождения. Интактные самки составили контрольную группу, в которой опухоли молочных желез (ОМЖ) возникали в возрасте 238 ± 15 дней. В подопытной группе 4 самки пали без опухоли, у остальных появились опухоли молочных желез в среднем через 299 ± 17 дней после рождения. Разница между группами — 61 ± 21 день ($P < 0,01$).

Известно, что удаление тимуса у взрослых животных не оказывает такого иммунодепрессивного эффекта, как ТЭ на 1-й нед жизни мышей [Миллер, Дукор, 1967]. Ниже приведены результаты наблюдений за возникновением ОМЖ у самок линии СЗН/Не, часть которых тимэктомирована в 3-месячном возрасте. Латентный период возникновения опухолей молочных желез в контроле и опыте был соответственно равен 313 ± 7 и 311 ± 9 дней. Полученные данные свидетельствуют, что влияние ТЭ на возникновение опухолей молочных желез связано с иммунодепрессивным действием удаления тимуса в первые дни после рождения.

Изучено воздействие ТЭ и других иммунодепрессантов на рост сингенных опухолей молочных желез у мышей высокораковых линий (табл. 4). ТЭ взрослых реципиентов не сказалась на росте опухолей. Ранняя ТЭ и другие иммунодепрессанты тормозят рост сингенных опухолей молочных желез. В других опытах мы применили особенно жесткое иммунодепрессивное воздействие (ТЭ + летальное облучение с защитой сингенным костным мозгом) и сравнили его влияние на рост сингенных опухолей молочных желез и гепатомы. При перевивке опухолей молочных желез иммунодепрессия оказала четкое тормозящее влияние, причем при сочетании облучения с удалением тимуса оно достоверно увеличивалось, что согласуется с представлением об усилении степени иммунодепрессии при сочетании облучения с ТЭ [Ковальчук, 1969]. Те же эффекты не оказали достоверного влияния на рост химически индуцированной гепатомы, что говорит о специфичности эффекта для опухолей молочных желез. Итак, угнетение лимфоидной системы тормозит возникновение и рост MTV-S-индуцированных опухолей молочных желез у факторных мышей высокораковых линий.

Изучен вопрос о роли MTV-S в эффекте ранней ТЭ на возникновение и рост опухолей молочных желез. На 6-й день после рождения удаляли тимус у бесфакторных самок линии СЗНf. Оперированным и интактным девственным самкам в 2,5 мес под

Т а б л и ц а 4

Влияние тимэктоми и других иммунодепрессивных воздействий на рост сингенных опухолей молочной железы мышей высокоракковых линий *

Опыт	Пол	Взаимодействие на реципиентов	Число мышей	Латентный период, дней	Вес опухоли, г	P
1	Самцы	ТЭ взрослых	11	$15 \pm 0,7$	$1,1 \pm 0,3$	Недостоверно
		Контроль	13	$15 \pm 0,6$	$0,8 \pm 0,2$	
2	»	ТЭ взрослых	19	$22,4 \pm 1,3$	$1,7 \pm 0,4$	Недостоверно
		Контроль	19	$21,4 \pm 1,1$	$1,5 \pm 0,4$	
3	Самки	ТЭ на 8-й день	20	$19,7 \pm 1,2$	$1,58 \pm 0,19$	Недостоверно
		Контроль	29	$17,7 \pm 0,9$	$1,78 \pm 0,31$	
4	Самцы	ТЭ на 8-й день	21	$22,4 \pm 0,2$	$0,66 \pm 0,10$	<0,001
		Контроль	34	$19,2 \pm 2,1$	$1,54 \pm 0,24$	
5	Самки	ТЭ на 6-й день	15	$27,2 \pm 2,2$	—	<0,001
		Контроль	32	$17,8 \pm 0,7$	—	
6	Самцы	ТЭ на 3-й день	13	$23,8 \pm 0,8$	$0,13 \pm 0,06$	<0,05
		Контроль	18	$20,5 \pm 1,2$	$0,48 \pm 0,17$	
7	Самки	ТЭ на 3-й день	13	$23,1 \pm 1,4$	$0,45 \pm 0,17$	<0,05
		Контроль	25	$18,8 \pm 0,8$	$0,95 \pm 0,16$	
8	Самцы	ТЭ на 6-й день	20	—	$0,21 \pm 0,04$	<0,05
		Циклофосфамид	28	—	$0,28 \pm 0,04$	<0,05
		300 P	22	—	$0,33 \pm 0,09$	<0,05
		ТЭ на 6-й день + + циклофосфамид	20	—	$0,20 \pm 0,04$	<0,05
		ТЭ на 6-й день + 300 P	16	—	$0,33 \pm 0,4$	<0,05
		Контроль	25	—	$0,57 \pm 0,07$	
9	Самцы	ТЭ взрослых + 360 P	54	—	$2,7 \pm 0,3$	<0,05
		360 P	49	—	$2,9 \pm 0,3$	<0,1
		Контроль	53	—	$3,9 \pm 0,4$	
10	Самцы	АЛС	20	—	$0,93 \pm 0,10$	<0,05
		Контроль	23	—	$1,39 \pm 0,14$	

* В 5-м опыте вес опухоли молочной железы, а в 8—10-м — латентный период развития опухолей молочной железы не учитывали. Циклофосфамид вводили по 2 мг на мышь перед перевивкой опухолей молочной железы. Облучение реципиентов проводили за день до перевивки. АЛС вводили за 2 дня до перевивки, в день перевивки и на 2, 30 и 33 дни после нее.

почечную капсулу трансплантировано по два сингенных гипофиза. Наблюдение вели в течение двух лет, пока у всех доживших до этого возраста мышей не возникли опухоли молочных желез. Ранняя ТЭ не оказала тормозящего действия на развитие опухолей молочных желез у бесфакторных мышей линии С3Нf. Из 25 самок контрольной группы опухоли молочных желез возникли у 15 (60%) со средним латентным периодом 463 ± 17 дней. Опухоли развивались у 12 тимэктомированных самок из 25 (48%) со сред-

Рост сингенных опухолей молочной железы у тимэктомированных на 6-й день и интактных мышей линии С3Нf

Линия реципиентов	Группа	Число мышей в группе	% мышей с привившейся ОМЖ	Вес опухоли, г
С3Нf	ТЭ	23	71	$0,4 \pm 0,1$
	Контроль	26	70	$0,4 \pm 0,1$
С3Н/He	ТЭ	23	83	$0,6 \pm 0,1$
	Контроль	25	84	$0,7 \pm 0,1$
С3Н/He	ТЭ	21	100	$1,2 \pm 0,1$
	Контроль	24	100	$1,2 \pm 0,1$

ним латентным периодом 487 ± 18 дней. Без опухолей в контрольной группе погибло 10 самок, в подопытной 13. Мыши без опухоли в подопытной группе жили почти на 2 мес меньше, чем в контроле ($P < 0,01$). Это, по-видимому, привело к некоторому (недостовверному) снижению общей доли опухолевых животных среди тимэктомированных самок, так как процент мышей с опухолью по отношению к дожившим до данного возраста в этой группе почти все время был выше, чем в контроле. При перевивке опухолей молочных желез линии С3Нf ранняя ТЭ также не тормозит их рост (табл. 5).

Тормозящее влияние ранней ТЭ на возникновение MTV-S индуцированных опухолей молочных желез наблюдается только в том случае, если мыши заражены вирусом в раннем возрасте. Известно, что у самок линии BALB/c, зараженных MTV-S в первые дни после рождения, ранняя ТЭ тормозит возникновение опухолей молочных желез [Heppner e. a., 1968; Squartini, 1971]. Мы заражали тимэктомированных мышей на 6-й день и 3,5-месячных контрольных самок линии BALB/c вирусом Биттнера. Всем самкам трансплантировано по два сингенных гипофиза. В течение 2 лет наблюдения опухоли молочных желез возникли у 34 контрольных самок (97,1%) с латентным периодом 392 ± 24 дня и у 25 тимэктомированных самок (89,2%) с латентным периодом 353 ± 13 дней. У контрольных самок в этом опыте было по одной опухоли молочной железы, а у 39% тимэктомированных мышей за те же сроки возникли по две и больше опухолей на мышь ($P < 0,01$). Следовательно, если мыши заражены вирусом Биттнера в раннем возрасте, как это и происходит в естественных условиях, ранняя ТЭ тормозит злокачественные процессы в молочной железе, но если животных искусственно инфицировали вирусом во взрослом состоянии, та же операция стимулирует развитие таких процессов.

При трансплантации опухолей молочных желез факторных мышей разных генотипов факторным и бесфакторным реципиентам оказалось, что возникшие у MTV-S позитивных мышей опухоли

Рост индуцированных MTV-S опухолей молочной железы у факторных (+) и бесфакторных (—) реципиентов

Опыт	Номер ОМЖ	Донор ОМЖ	Реципиент	Число мышей	Пол	Вес опухоли
1	ОМЖ-6	C3H/He	C3H/He ⁺	10	Самцы	1,17±0,20
			C3Hf ⁻	13		0,54±0,06*
2	ОМЖ-6	C3H/He	C3H/He ⁺	33	»	0,91±0,13
			C3Hf ⁻	11		0,13±0,04 *
3	ОМЖ-4	C3H/He	C3H/He ⁺	41	Самцы и	0,51±0,07
			C3Hf ⁻	41	самки	0,29±0,03 *
4	ОМЖ-5	C3H/He	C3H/He *	40	Самцы и	1,12±0,11
			C3Hf ⁻	40	самки	0,60±0,04 *
5	ММТ **	C3H/He	C3H/He ⁺	20		2,5±0,7
			C3Hf ⁻	29	Самцы	1,4±0,3 *
			C3Hf(C3H/He ⁺	18		3,4±0,6
6	ММТ **	C3H/He	C3H/He ⁺	22	Самки	1,4±0,4
			C3Hf ⁻	24		0,7±0,2 *
			C3Hf(C3H/He ⁺	20		1,9±0,3
7	ОМЖ-2	C3H/He	F ₁ (C3H/He×C57BL) ⁺	20	Самцы	0,79±0,33
			F ₁ (C57BL×C3H/He) ⁻	23		0,34±0,04
	ОМЖ-BL-1	C57BL	F ₁ (C3H/He×C57BL) ⁺	21	Самки	5,9±1,4
			F ₁ (C57BL×C3H/He) ⁻	21		1,2±0,3 *
9	ОМЖ-A-1	A/HeJ	F ₁ (A/He×C57BL) ⁺	15	»	1,11±0,22
			F ₁ (C57BL×A/He) ⁻	16		0,24±0,12 *
10	ОМЖ-A-1	A/HeJ	F ₁ (A/He×C57BL) ⁺	21		1,66±0,22
			F ₁ (C57BL×A/He) ⁻	19	Самцы	0,42±0,12

* Достоверное отличие от средних значений у факторных реципиентов.

** Спонтанно возникшая опухоль молочной железы самки линии C3H/He, поддерживаемая в лаборатории в культуре.

молочных желез всегда быстрее растут у факторных реципиентов (табл. 6). Данные аналогичных опытов, в которых трансплантировали опухоли молочных желез, возникшие у бесфакторных самок C3Hf, свидетельствуют, что опухоли молочных желез, появившиеся без участия MTV-S и не содержащие его антигенов, растут одинаково у факторных и бесфакторных реципиентов (табл. 7). Основная причина разной скорости роста опухолей молочных желез вирусопозитивных мышей у факторных и бесфакторных реципиентов заключена, по-видимому, в особенностях иммунной реакции сравниваемых животных на антигены, связанные с присутствием в опухолевых клетках MTV-S. Такое объяснение подтверждают данные о характере действия иммунодепрессии на рост опухолей молочных желез у факторных и бесфакторных реципиентов. При трансплантации опухолей молочных желез линии C3H/He факторным и бесфакторным реципрокным гибридам первого поколе-

Рост опухолей молочной железы линии СЗНf у факторных (+) и бес-
факторных (—) реципиентов

Номер ОМЖ	Реципиенты	Число мышей	Пол	Вес опухоли
2	СЗН/He ⁺	20	Самцы	2,25±0,37
	СЗНf ⁻	21		2,02±0,37
2	СЗН/He ⁺	25	»	0,7±0,14
	СЗНf ⁻	27		0,7±0,14
3	СЗН/He ⁺	20	»	2,0±0,21
	СЗНf ⁻	20		2,6±0,25
4	СЗН/He ⁺	21	Самцы и самки	1,2±0,10
	СЗНf ⁻	25		1,2±0,17
4	F ₁ (СЗН/He×С57BL) ⁺	20	Самки	2,3±0,22
	F ₁ (С57BL×СЗН/He) ⁻	20		2,2±0,22

ния между мышами линий СЗН/He и С57BL ранняя ТЭ в сочетании с облучением мышей перед перевивкой тормозила рост опухоли только у факторных мышей. Четкие у интактных факторных и бесфакторных реципиентов различия в скорости роста опухоли молочных желез исчезали в случае угнетения тимусзависимой лимфоидной системы (табл. 8).

В других экспериментах (табл. 9) также иммунодепрессивные воздействия, как введение гидрокортизона и облучение, также тормозили рост опухоли только в том случае, когда перевиваемая опухоль молочной железы появлялась у факторных мышей и реципиенты получали с молоком матери вирус Биттнера. На бесфакторную опухоль те же воздействия достоверного влияния не оказывали. Однако при введении реципиентам перед перевивкой 6 мг гидрокортизона наблюдалась тенденция к задержке роста бесфакторной опухоли молочной железы. Возможно, с этим эффектом гидрокортизона на рост опухоли молочной железы связано

Т а б л и ц а 8

Влияние иммунодепрессии на вес трансплантированной опухоли молочной железы линии СЗН/He у факторных и бесфакторных реципрок-
ных гибридов, г

Реципиенты	F ₁ (СЗН×С57BL) ⁺	F ₁ (С57BL×СЗН) ⁻
ТЭ на 6-й день	1,39±0,28	1,53±0,29 *
ТЭ на 6-й день + 300 Р	1,08±0,23 *	1,14±0,26
Интактные	1,94±0,33	0,66±0,20

* P < 0,05 (по сравнению с интактными).

Т а б л и ц а 9

Влияние летального облучения с защитой костным мозгом (КМ), гидрокортизона (ГК) и ГК в сочетании с облучением на рост факторных и бесфакторных опухолей молочной железы (ОМЖ) у факторных и бесфакторных реципиентов

Группа	ОМЖ СЗН/He		ОМЖ СЗНf	
	Реципиенты			
	СЗН/He	СЗНf	СЗН/He	СЗНf
6мгГК	0,2±0,1 *	1,0±0,1	0,7±0,1	0,7±0,1
Интактные	2,0±0,4	1,2±0,3	1,3±0,3	1,2±0,3
400+1мгГК	0,90±0,15 *	1,56±0,20 *	2,1±0,2	2,6±0,2
Интактные	1,70±0,29	1,06±0,10	1,9±0,2	2,3±0,2
750Р+КМ	0,57±0,12 *	1,70±0,21	2,2±0,2	
Интактные	1,30±0,34	0,80±0,15	3,1±0,5	

* Достоверное отличие от контрольной группы.

отсутствие ускорения роста факторной опухоли у бесфакторных реципиентов в этом опыте. Угнетение тимусзависимой лимфоидной системы у факторных мышей снимает возникшую в результате постнатальной инфекции вирусом Биттнера иммуностимулирующую вирус-индуцированных опухолей молочной железы, что и тормозит их рост. У бесфакторных мышей те же воздействия нарушают защитные иммунные реакции на чужеродные для этих животных антигены опухолевых клеток, связанные с присутствием в них MTV-S. В опухолях молочной железы бесфакторных мышей линии СЗНf таких антигенов нет, поэтому и угнетение лимфоидной системы заметно не влияет на их рост. Так же мы объясняем и результаты 4-го опыта.

В пользу предположения о стимулирующем влиянии лимфоидной ткани факторных мышей на развитие вирус-индуцированных злокачественных процессов в молочной железе говорят данные о результатах трансплантации лимфоидных клеток от факторных и бесфакторных доноров. Следили за возникновением опухолей молочной железы у самок линии СЗН, которым было подсажено по два сингенных гипофиза. Мыши 1-й группы другим воздействиям не подвергались, самок 2—4-й групп в 2,5 мес инфицировали MTV-S. 2,5 и 5,5-месячным животным 3-й и 4-й группы внутривенно ввели по 100×10^6 клеток селезенки, мыши 3-й группы получили 200×10^6 спленоцитов доноров линии СЗН/He, а 4-й — линии СЗНf. Наблюдали около 2 лет. На втором году жизни часть самок всех групп погибла от различных причин без опухолей. Опухоли молочной железы у 70% — в 1-й, 86 — во 2-й, 86 — в 3-й и 72% — в 4-й группах. Показателем, на который не повлияла гибель мышей без опухоли, был латентный период развития опухолей молочной железы, возникших у половины животных в группе: 436 ± 9 , 393 ± 18 , 330 ± 12 , 364 ± 10 для 1—4 групп

Рост вирус-индуцированных опухолей молочной железы и химически индуцированной гепатомы у реципиентов, инфицированных MTV-S мышей линий C3H/He или A/He и у бесфакторных животных

Опухоль (генотип)	Реципиенты				Средний вес опухоли
	Генотип	Источник MTV-S	Пол	Число мышей	
ОМЖ (C3H/He)	(C57B1×C3H)F ₁	—	Самцы	14	0,11±0,05
	(A×C3H)F ₁	A		12	1,79±0,76
	(C3H×A)F ₁	C3H		10	2,92±1,10
ОМЖ (C3H/He)	(C57B1×C3H)F ₁	—	Самки	15	0,09±0,04
	(A×C3H)F ₁	A		12	0,58±0,26
	(C3H×A)F ₁	C3H		9	4,82±1,41
ОМЖ (C3H/He)	(C3Hf×A)F ₁	—	»	25	1,07±0,32
	(A×C3H)F ₁	A		28	1,59±0,37
	(C3H×A)F ₁	C3H		9	2,87±1,22
ОМЖ (C3H/He)	(C3H×A)F ₁	—	Самцы	11	1,48±0,37
	(A×C3H)F ₁	A		35	1,78±0,32
	(C3H×A)F ₁	C3H		10	2,46±0,85
ОМЖ (A/HeJ)	(C57BL×A)F ₁	—	Самки	16	0,24±0,12
	(A×C57BL)F ₁	A		15	1,11±0,22
	(A×C3H)F ₁	A		17	1,44±0,30
	(C3H×A)F ₁	C3H		16	0,40±0,11
ОМЖ (AHeJ)	(C57BL×A)F ₁	—	Самцы	19	0,42±0,12
	(A×C57BL)F ₁	A		21	1,66±0,22
	(A×C3H)F ₁	A		20	1,22±0,16
	(C3H×A)F ₁	C3H		21	0,47±0,08
Гепатома (A/HeJ)	(C57BL×A)F ₁	—	Самки	13	0,36±0,10
	(A×C57BL)F ₁	A		13	0,33±0,08
	(A×C3H)F ₁	A		15	0,33±0,13
	(C3H×A)F ₁	C3H		17	0,37±0,07
Гепатома (A/HeJ)	(C57BL×A)F ₁	—	Самцы	12	0,48±0,08
	(A×C57BL)F ₁	A		12	0,49±0,08
	(A×C3H)F ₁	A		12	0,31±0,10
	(C3H×A)F ₁	C3H		12	0,31±0,08

соответственно. Заражение мышей MT даже во взрослом состоянии ускорило появление ОМЖ более чем на месяц. Введение спленоцитов факторных доноров еще на 2 мес сократило латентный период возникновения опухолей молочной железы. Спленоциты бесфакторных доноров достоверного влияния не оказали. Следовательно, увеличение пула лимфоидных клеток факторных мышей стимулирует развитие злокачественных процессов в молочной железе.

Четкое ускорение роста MTV-S-индуцированных опухолей молочной железы у факторных реципиентов (см. табл. 4) и отсутст-

вне такого эффекта при перевивке бесфакторных опухолей молочной железы (см. табл. 5) свидетельствуют о возможности использования трансплантационного теста для сравнения MTV-S из разных источников. В табл. 10 объединены результаты наблюдений за ростом трансплантированных опухолей молочной железы факторных мышей линий СЗН/Не и А/НеJ у гибридов, вскормленных самками той или другой линии. Сравниваются три ситуации: опухоль молочной железы растет у мышей, инфицированных тем же вариантом MTV-S, который участвовал в развитии опухоли; та же опухоль молочной железы у мышей, зараженных MTV-S другой линии мышей; опухоль у бесфакторных мышей. Кроме того, в двух опытах таким же реципиентам трансплантировали не опухоль молочной железы, а химически индуцированную гепатому, не содержащую антигенов MTV-S. Гепатома одинаково росла у всех групп реципиентов. Вирус-индуцированные опухоли молочной железы всегда быстрее росли у факторных реципиентов, а среди них — у зараженных MTV-S, участвовавшим в развитии данной опухоли и присутствовавшим в ее клетках. Сопоставление всех данных табл. 10 свидетельствует о том, что вирусы Биттнера мышей линий СЗН/Не и А/НеJ отличаются друг от друга связанной с их присутствием суммарной антигенностью опухолевых клеток.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ТИМУСА МЫШЕЙ В СВЯЗИ С ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К ЗЛОКАЧЕСТВЕННОМУ РОСТУ

Выше были приведены данные о влиянии тимуса на MTV-S-индуцированный канцерогенез в молочной железе. Высказано предположение [Грунтенко, 1977], что при селекции мышей на высокую или низкую частоту возникновения опухолей молочной железы созданы линии животных, имеющие различающиеся генетически детерминированные особенности тимуса как органа, влияющего на процессы канцерогенеза в молочной железе. Экспериментальная проверка подтвердила это предположение.

Вес тимуса — один из показателей его функциональной активности (табл. 11). Следовательно, линии мышей, различающиеся между собой по частоте возникновения спонтанных опухолей молочной железы существенно отличны и по весовой характеристике тимуса. У мышей линий АКР, С57ВL, а также у беспородных мышей, т. е. у животных с низкой частотой возникновения спонтанных опухолей молочной железы, вес тимуса достоверно больше, чем у высокоракковых мышей линий СЗН/Не и А/НеJ.

Изучено наследование веса тимуса у мышей. Анализ этих данных [Бородин и др., 1976] позволяет считать, что в генофонде мышей линий АКР и С57ВL сконцентрированы гены, детерминирующие больший тимусный индекс. Эти гены характеризуются

Таблица 11

Линейные различия по величине тимусного индекса у самок

Линия	Общее число мышей	Условный средний тимусный индекс, %	Попарное сравнение линий	Достовер- ность
AKR	174	5,3	AKR > б/п	<0,001
			AKR > C57BL	<0,001
Беспородные (б/п)	145	4,1	б/п > BALB/c	<0,001
C57BL	155	4,2	C57BL > BALB/c	<0,001
BALB/c	80	3,6	BALB/c > C3H/He	<0,001
C3H/He	141	2,6	C3H/He > A/HeJ	<0,06
A/HeJ	149	2,3	—	—

определенной степенью рецессивности по отношению к генам, детерминирующим низкий тимусный индекс. Наибольшая концентрация «плюс» и «минус» генов наблюдается соответственно в генофонде линий AKR и C3H/He. Значения тимусного индекса у реципрокных гибридов существенно различаются. По тимусному индексу гибриды обычно более сходны с материнской линией.

При обнаружении значительных различий по весу тимуса между животными некоторых гибридных линий возник вопрос, не являются ли наблюдаемые различия отражением наследственно детерминированных особенностей гормонального баланса мышей исследованных генотипов. Изучена продукция 11-оксикортикостероидов (11-окс) корой надпочечников *in vitro* и уровень 11-окс в крови у мышей нескольких линий, различающихся по онкологической характеристике и весу тимуса (табл. 12).

Сопоставление тимусного индекса с уровнем продукции 11-окс и их содержанием в крови у мышей исследованных линий показывает отсутствие простой корреляции между этими параметрами. Проведено сравнение реакции тимуса мышей тех же линий на повышение уровня 11-окс в крови, вызываемого введением 2 ME АКТГ. Уровень 11-окс в крови у мышей всех линий через 70 мин

Таблица 12

Функциональная активность коры надпочечников и вес тимуса у линейных мышей

Линия	Число мышей	Вес тела, г	Тимусный индекс	Надпочечни- ковый индекс	Продукция 11-окс, мгк/ч 100мг	Уровень 11-окс в крови, мкг %
C57BL	16	13,4±1,5	4,67±0,30	0,17±0,03	7,07±0,83	22,8±4,2
AKR	10	19,2±1,1	4,63±0,37	0,16±0,03	1,74±0,40	5,6±1,5
C3H/He	10	17,4±0,8	2,51±0,09	0,15±0,01	5,9±1,23	10,6±0,7
C3Hf	10	17,4±0,6	2,61±0,08	0,15±0,01	3,75±0,77	8,4±1,5

после инъекции АКТГ резко повысился: у мышей АКР в 13 раз по сравнению с нормой, у С57ВL — в 4, у С3Н/Не и С3Нf — в 7 раз. Введение АКТГ нивелировало межлинейные различия по этому показателю. Увеличение было кратковременным, так как уже через 24 ч уровень содержания 11-окс в крови возвращался к норме. Тимусный индекс у подопытных мышей не изменился ни через 70 мин, ни через 24 ч после введения препарата АКТГ. Через 48 ч после инъекции обнаружено достоверное снижение веса тимуса у мышей линий С57ВL, С3Н/Не и С3Нf, но не АКР. Эти данные позволяют предполагать, что величина тимуса определяется не только уровнем 11-окс, но и генетически контролируемой чувствительностью к действию кортикостероидов самой ткани тимуса.

Проведено сравнительное изучение гистоструктурных особенностей тимуса, селезенки и лимфоузлов, а также лейкоцитарного состава периферической крови у мышей высокоракковых линий С3Н/Не, и А/НеJ, бесфакторных мышей линии С3Нf, беспородных животных и мышей низкоракковой линии С57ВL. Установлено, что условия инбридинга изменяют соотношение функциональных зон в вилочковой железе линейных мышей по сравнению с беспородными в сторону преобладания кортикального слоя. Наблюдаются выраженные межлинейные различия по ряду признаков в морфологии лимфоидных органов и составу клеточных элементов периферической крови. Некоторые из них могут быть связаны с наследственной предрасположенностью к раку. Морфологическими особенностями тимуса генетически высокоракковых мышей С3Н/Не, С3Нf, А/Неf являются: деафатизация коркового слоя, гипертрофия эпителиальных элементов стромы с появлением в клетках большого количества гликопротеидных включений, усиленные некробиотические процессы в тельцах Гассала и образование в них кистозных полостей, повышенное количество малодифференцированных клеток и макрофагов. У мышей А/НеJ в паренхиме железы обнаруживается много тучных клеток. В селезенке генетически высокоракковых мышей выявляется большое количество мегакариоцитов, что свидетельствует о повышенной реактивности ретикуло-эндотелиальной системы у этих животных [Алексеева и др., 1976а; Грунтенко, 1977].

Корреляция между морфологическими особенностями лимфоидной системы и наследственной предрасположенностью к раку косвенно свидетельствует о связи изучаемых показателей. Поэтому проведено сравнение развития опухолей молочной железы у сингенных мышей, которым трансплантировали тимусы от доноров высоко- или низкоракковых линий. Все эксперименты объединяет общий методический прием: трансплантация тимусов мышей высоко- и низкоракковых линий одинаковым реципиентам, которым перевивалась сингенная или совместная опухоль молочной железы факторных доноров. Чтобы избежать искажения результатов за счет несовместимости трансплантированных тимусов и реципиен-

тов, использовали три возможности: реципиентами были гибриды между донорскими линиями; аллогенные тимусы трансплантировались в миллипористой камере, защищающей их от атаки лимфоцитами реципиента; реципиентов сильно иммунодепрессировали.

В одном из опытов 18 мышам первой группы на 5-й день после рождения собственный тимус заменили тимусом животных СЗН/Не, животным второй группы — тимусом линии С57ВL, третью группу составили интактные гибриды. Опухоль молочной железы СЗН/Не перевита подопытным мышам в 2-месячном возрасте. У контрольных животных и у мышей с тимусом СЗН/Не опухоли развивались в одни и те же сроки. На 25-й день после перевивки в обеих группах опухоли росли у 90% мышей, а к 33-у дню — у всех животных. В группе гибридов с тимусами С57ВL на 33-й день после перевивки опухоли прощупывались лишь у 75% мышей. Разница по сравнению с первой и третьей группами достоверна ($P < 0,05$). Средняя величина латентного периода в группах составила: в первой — $17,55 \pm 1,3$ дня; во второй — $25,4 \pm 3,9$; в третьей — $18,1 \pm 1,3$ дня. Разница между второй (с тимусом С57ВL) и первой (с тимусом СЗН/Не) составляла $8,9 \pm 4,2$ дня ($P < 0,05$); между второй и третьей — $8,2 \pm 4,1$ ($P = 0,05$). Среднее время жизни мышей после перевивки равнялось 81 ± 9 ; 97 ± 9 и 78 ± 5 дней в первой — третьей группах соответственно.

В другой серии опытов использовано большее количество животных. Из мышей F_1 (СЗН/Не \times С57ВL) также составлено три группы (по 38—43 в каждой группе), выравненных по полу и возрасту. Животных первой и второй групп тимэктомировали на 5-й день после рождения и сразу же на место удаленного органа мышам трансплантировали тимус от доноров того же возраста. В первой группе донорами служили мыши СЗН/Не, во второй — мыши С57ВL. Третью группу составили интактные гибриды. Опухоли молочной железы перевили, когда реципиентам было 2—3 мес. Пересадка тимуса высокоракковой линии СЗН/Не не оказала влияния на перевиваемость опухолей молочной железы, в то же время пересадка тимуса низкоракковой родительской линии С57ВL привела к достоверному снижению прививаемости опухоли. У 14 мышей из 40 в этой группе (35%) опухоли не развились вовсе, причем у трех мышей начинали развиваться, но затем регрессировали. Десяти мышам второй группы, у которых опухоли не развивались, через 2 мес после первой перевивки была сделана повторная трансплантация той же опухоли молочной железы. Опухоли не развились и в этот раз (наблюдали в течение 2 мес), тогда как у пяти интактных мышей, которым введена та же опухолевая суспензия, они появились в обычные сроки (на 13—20-й день после перевивки).

В двух сериях опытов тимусы высоко- и низкоракковых доноров трансплантировали взрослым, предварительно тимэктомированным на 5—6-й день после рождения, реципиентам СЗН/Не. Тимусы

для трансплантации брали от 1,5-месячных доноров СЗН/Не, С57ВL и А/НеJ. Перед трансплантацией тимус помещали в миллипористую камеру. Каждой мыши трансплантировано по одному тимусу. Сингенную опухоль молочной железы перевивали месяцем позже. В обеих сериях опыта отмечено различное действие трансплантата тимуса высокоракковых линий (СЗН/Не или А/НеJ) и низкоракковой линии (С57ВL) на развитие трансплантированной сингенной опухоли молочной железы у мышей СЗН/Не. И сингенный, и аллогенный тимусы мышей высокоракковых линий стимулируют рост опухоли у тимэктомированных реципиентов, а тимус мышей низкоракковой линии такого эффекта не оказывает.

Мышей высокоракковой линии А/НеJ тимэктомировали в 2—3-месячном возрасте. Спустя 10 дней всех животных облучали дозой 750 Р и защищали внутривенным введением $30 \cdot 10^6$ клеток сингенного костного мозга. На следующий день мышам первой группы трансплантировали под кожу груди по 2 тимуса от месячных доноров СЗН/Не, а мышам второй группы — С57ВL. Животных третьей группы тимусы не трансплантировали. Еще через 10 дней всем животным под кожу спины перевивали клетки спонтанных опухолей А/НеJ. Трансплантация иммунодепрессированным реципиентам тимусов низкоракковой линии С57ВL не оказала существенного влияния на развитие опухоли. В то же время пересадка тимусов высокоракковой линии СЗН/Не стимулировала рост сингенной опухоли молочной железы. Доля мышей с развившимися опухолями достоверно больше ($P < 0,05$) в этой группе по сравнению с данным показателем второй и третьей групп.

Итак, во всех опытах отмечена разница в действии трансплантатов тимуса низкоракковой линии С57ВL по сравнению с трансплантатами тимуса мышей высокоракковых линий СЗН/Не и А/НеJ на рост MTV-S-индуцированных опухолей молочной железы мышей высокоракковых линий. Трансплантация ткани тимуса мышей высокоракковых линий стимулировала рост опухолей, тимусная ткань С57ВL таким эффектом не обладала. Разница в действии тимусов сохранялась при трансплантации органа в миллипористой камере. Последнее, однако, не является убедительным аргументом в пользу гормонального механизма влияния тимуса на рост опухоли в противовес иммунологическому, так как известно, что тимус, трансплантированный в миллипористой камере, восстанавливает иммунореактивность тимэктомированных животных.

ЗАВИСИМОСТЬ ДЕЙСТВИЯ РАННЕЙ ТИМЭКТОМИИ НА РАЗВИТИЕ ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ОТ ГЕНОТИПА МЫШЕЙ

Чтобы выяснить, как ранняя тимэктомия влияет на возникновение опухолей молочной железы у мышей высокоракковой линии ДД, не родственной линиям СЗН и BALB/c, поставлен экспери-

мент. Часть самок ДД тимэктомирована на 6-й день после рождения. Оперированные и контрольные мыши содержались в условиях формируемого размножения. Ранняя тимэктомия мышей линии ДД оказала четкое тормозящее действие на возникновение опухолей молочной железы (см. рис. 5а). Доля мышей с возникшими опухолями молочной железы в группе тимэктомированных самок достоверно больше, чем в контроле.

Особый интерес представляет изучение действия тимэктомии на индукцию вирусом Биттнера опухолей молочной железы у мышей низкоракковых линий, не содержащих в норме MTV-S и элиминирующих его после искусственного заражения в течение нескольких (2—3) поколений. Такой линией, в частности, является C57BL [Heston *et al.*, 1945, 1956]. Поставлено две серии экспериментов по изучению влияния тимэктомии на индукцию опухолей молочной железы вирусом Биттнера у мышей C57BL. Подопытных самок тимэктомировали на 6-й день после рождения. Всех животных с 6-го дня жизни вскармливали самки C3H/He, молоко которых содержит MTV-S. В первой серии экспериментов самки содержались вместе с самцами. Рождавшихся мышат сразу же убивали, не позволяя самкам вскармливать их. Во второй серии экспериментов использованы девственные самки C57BL C3H, которым в возрасте 2 мес было трансплантировано под почечную капсулу по 2 сингенных гипофиза.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что ранняя тимэктомия снижает количество возникающих опухолей молочной железы у факторных самок C57BLfC3H. В то же время можно отметить одну особенность действия ранней тимэктомии на возникновение опухолей молочной железы у самок C57BLfC3H. У мышей высокоракковых линий ранняя тимэктомия не только снижает количество возникающих опухолей молочной железы, но и значительно удлиняет латентный период развития опухолей, а у факторных самок низкоракковой линии наблюдалась даже тенденция к сокращению латентного периода развития возникших опухолей молочной железы у тимэктомированных мышей. Возможно, эта особенность действия тимэктомии на возникновение индуцированных вирусом Биттнера опухолей у мышей C57BLfC3H/He не отражает своеобразие генетически детерминированных взаимоотношений опухоль — организм у животных низкоракковых линий. В существовании отличий в действии ранней тимэктомии на развитие вирус-индуцированных опухолей молочной железы у мышей высокоракковой линии C3H/He и низкоракковой линии C57B убеждают результаты, полученные на факторных гибридах от скрещивания этих линий. Половина гибридных самок тимэктомирована на 6-й день после рождения. В 2-месячном возрасте всем животным трансплантировали под почечную капсулу по 2 гипофиза от сингенных доноров. Опухоли совершенно синхронно возникали в обеих группах. Таким образом, если у самок C3H/He тимэктомия значительно удлиняет латентный период развития

неоплазм и почти не влияет на процент развившихся опухолей, а у факторных самок C57BL, наоборот, резко снижается доля мышей, у которых возникают опухоли, но латентный период не изменяется, то у гибридных самок ранняя тимэктомия не влияет ни на процент мышей с опухолями, ни на величину латентного периода развития опухолей молочной железы. Отличие взаимоотношений между индуцированными вирусом Биттнера опухолями молочной железы и тимусзависимой системой мышей линий C3H/He и C57BL демонстрируются и при перевивке сингенных опухолей. Ранняя тимэктомия тормозит рост таких опухолей у мышей C3H/He, но, как показано в четырех опытах, не оказывает влияния на рост сингенных опухолей молочной железы у мышей C57BL/C3H и F_1 (C3H \times C57BL).

Обнаружение влияния ранней тимэктомии на возникновение индуцированных вирусом Биттнера опухолей молочной железы у мышей высокорасовой линии C3H/He, низкорасовой — C57BL и их гибридов позволяет заключить, что данный эффект контролируется генетически и что в механизме эффекта у мышей различных генотипов есть различия.

ПОВЫШЕНИЕ ЧАСТОТЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У КРЫС, ИНФИЦИРОВАННЫХ МЫШИНЫМ ВИРУСОМ БИТТНЕРА

Считается, что вирус Биттнера (MTV-S) обладает предельно узким видо- и цитотропизмом действия: он вызывает только опухоли молочных желез и только у мышей [Зильбер и др., 1975]. Это мнение утвердилось в начале 50-х гг. после неудачных попыток индуцировать вирусом Биттнера опухоли у нескольких видов животных [Ambrus, Harrison, 1952]. Однако в цитируемой работе животные были инфицированы вирусом в возрасте 3 нед, тогда как в последние годы показано, что ряд онкогенных вирусов приводит к индукции неоплазм лишь при заражении животных в первые 3—5 дней после рождения. Кроме того, опухоли не были выявлены потому, что зараженные вирусом животные находились под наблюдением в течение года, в то время как известно, что даже у естественных хозяев латентный период возникновения опухолей, индуцированных вирусом Биттнера, в некоторых случаях составляет 1,5—2 года [Грунтенко, 1977].

С учетом этих обстоятельств предпринята попытка изучить влияние MTV на развитие опухолей молочной железы у крыс в условиях, благоприятствующих развитию онкогенных свойств этого онкорнавируса [Грунтенко, Матпенко, 1977].

Исследование проведено на самках крыс Sprague Dawley, характеризующихся определенной наследственной предрасположенностью к развитию опухолей молочной железы. Для заражения вирусом Биттнера готовили экстракт спонтанных опухолей

молочной железы, возникших у самок мышей СЗН/Не. К измельченной пожницами ткани опухолей молочной железы добавляли физиологический раствор из расчета 1 мл на 1 г опухоли. Полученную взвесь растирали в ступке с предварительно прокаленным кварцевым песком. Гомогенат центрифугировали 30 мин при 3500 об/мин. Надосадочную жидкость разливали по флаконам и хранили в замороженном состоянии при -20° . Экстракт размораживали непосредственно перед введением; каждому крысенку второй и четвертой подопытных групп в первый день после рождения вводили по 0,05 мл, а во 2-й и 4-й дни по 0,1 мл подкожно. Поскольку известно, что иммунодепрессия способствует преодолению вирусами видовых барьеров, часть животных была тимэктомизирована на 3-й день после рождения (группа 3 и 4). Все животные содержались на режиме форсированного размножения без вскармливания потомства, поскольку гормональный статус таких животных способствует канцерогенезу в молочной железе. Наблюдение за крысами вели до достижения ими 900-дневного возраста.

Показано, что у самок крыс линии Sprague Dawley развиваются главным образом опухоли молочной железы и именно частота этих опухолей определяет основные различия между группами (табл. 13). Спонтанные опухоли молочных желез возникали у 22% самок крыс этой линии в возрасте около 2 лет. Ранняя тимэктомия стимулирует появление опухолей молочной железы у этих животных начиная с 700-го дня; различия по доле крыс с опухолями молочной железы в первой и третьей группах достоверны ($P < 0,05$) (табл. 14). Заражение крыс в первые дни после рождения мышинным вирусом Биттнера вызывает существенное увеличение частоты возникновения опухолей молочной железы у старых (возраст свыше 600 дней) крыс. Из данных, представленных в табл. 14, видно, что, начиная с 700-го дня, доля крыс с опухолями молочной железы в группе животных, инфицированных MTV, достоверно выше, чем в контроле ($P < 0,05$). Удаление у зараженных вирусом Биттнера крыс тимуса на 3-й день после рождения достоверно ускоряет возникновение опухолей молочной железы (разница в латентном периоде развития опухолей молочной железы у крыс второй и четвертой групп равна 104 ± 49) и приводит к более частому возникновению этих опухолей в 600-дневном возрасте ($P < 0,05$).

Как указано выше, у природных хозяев вируса Биттнера — мышей высококорковых линий — ранняя тимэктомия снижает частоты возникновения спонтанных опухолей молочной железы и к торможению их роста при сингенной трансплантации. Следовательно, одно и то же воздействие на лимфоидную систему приводит к прямо противоположным эффектам на индуцированный вирусом Биттнера канцерогенез в молочной железе у мышей и крыс. Это свидетельствует в пользу сформулированного ранее [Груntenко, 1975, 1977] представления об эволюционной приспособленности

Т а б л и ц а 13

Влияние вируса Биттнера, тимэктомии и сочетания этих воздействий на частоту опухолей различных локализаций у самок крыс линии Sprague Dawley

Воздействие	Число крыс в группе	Число крыс с опухолями						
		1	2	3	4	5	6	7
Контроль	64	14 (22)	1 (2)	—	1 (2)	—	5 (8)	21 (33)
MTV	58	24 (41)	1 (2)	6 (10)	—	2 (3)	4 (7)	30 (52)
ТЭ	44	16 (36)	2 (5)	1 (2)	—	—	2 (5)	21 (48)
MTV+ТЭ	25	15 (60)	1 (4)	2 (8)	—	3 (12)	3 (12)	18 (72)

П р и м е ч а н и е. Опухоли: 1 — молочной железы, 2 — слухового прохода, 3 — легкого, 4 — тонкого кишечника, 5 — матки, 6 — других локализаций; 7 — суммарное число крыс с опухолями всех локализаций (в некоторых случаях у одной и той же крысы были опухоли разных локализаций). В скобках — доля крыс с опухолями по отношению к общему числу животных в группе в процентах.

онкорнавирусов к действию иммунного надзора у природных хозяев.

Кроме уже указанных особенностей постановки экспериментов по заражению вирусом Биттнера крыс (неонатальное инфицирование MTV, иммунодепрессия, использование генетически предрасположенной к возникновению опухолей молочной железы ли-

Т а б л и ц а 14

Влияние заражения вирусом Биттнера, ранней тимэктомии и сочетания этих воздействий на возникновение опухолей молочной железы у самок крыс линии Sprague Dawley

Возраст, дней	Контроль 64		MTV 58		ТЭ 44		MTV+ТЭ 25	
	1	2	1	2	1	2	1	2
300	1	1,6	—	—	—	—	—	—
400	—	1,6	—	—	3	6,8	3	12,0
500	1	3,2	—	—	—	6,8	3	24,0
600	4	9,5	6	10,3	6	20,5	2	32,0 ^{аб}
700	2	12,5	10	27,6 ^а	4	29,5 ^а	4	48,0 ^а
800	1	14,1	7	39,7 ^а	3	36,4 ^а	3	60,0 ^а
900	5	21,9	1	41,4 ^а	—	36,4 ^а	—	60,0 ^а
	14	21,9	24	41,4 ^а	16	36,4 ^а	15	60,0 ^а
В с е г о				41,4 ^а		36,4 ^а		60,0 ^а
Латентный период, дней	653±44		706±17		626±23		609±32 (P ₂₋₄ 0,01	

П р и м е ч а н и е: 1 — суммарное число крыс, у которых возникли опухоли молочной железы в соответствующем возрасте, 2 — суммарная доля крыс с опухолями молочной железы в группе, %. Индекс «а» обозначает, что доля крыс с опухолями молочной железы в группе достоверно больше, чем в контроле; индекс «б» — доля крыс с опухолями молочной железы в группе достоверно больше, чем в группе с ТЭ.

нии крыс, благоприятный для развития опухолей гормональный фон и длительное наблюдение за животными), еще одно обстоятельство могло привести к повышению частоты неоплазм у инфицированных крыс. После проведения работ, в которых проверяли онкогенность вируса Биттнера для животных разных видов, прошло уже четверть века. Нет сомнений в том, что все это время при селекции лабораторных животных и линий мышей на высокораковость среди MTV шел косвенный отбор на повышение онкогенного потенциала. Возможно, что использованный штамм MTV-S уже существенно отличается по этому показателю от тех, которыми заражали крыс, хомячков и животных других видов в 50-х гг.

У мышей некоторых линий удаление тимуса в первые три дня после рождения приводит к нарушению функции яичников [Sakakura, Nishizuka, 1967, 1972]. Эти данные свидетельствуют о том, что в тормозящем действии ранней тимэктомии на возникновение опухолей молочной железы, вероятно, участвует, эндокринная система организма. Не исключая возможного существования гормональной компоненты в эффекте ранней тимэктомии, мы считаем, что помимо эндокринного механизма, а у животных некоторых генотипов и главным образом, действие удаления тимуса связано с изменением иммунного ответа на антигены опухолевых клеток, связанные с присутствием в них MTV-S [Груntenко, 1977].

Кратко суммируем аргументы в пользу такого утверждения. Тимэктомированные на 6-й день самки были так же плодовиты, как и контрольные. При трансплантации сингенных опухолей молочной железы ранняя тимэктомия задерживала рост опухолей молочной железы не только у самок, но и у самцов, хотя у последних не найдено изменений в структуре эндокринных органов даже при неонатальной тимэктомии. Угнетение Т-системы иммунитета во взрослом состоянии введением препаратов АЛС, кортизона, облучением или сочетанием этих воздействий также тормозит возникновение опухолей молочной железы и их рост у сингенных факторных реципиентов высокораковых линий. В пользу иммунного механизма тормозящего действия ранней тимэктомии на злокачественные процессы в молочной железе говорят данные об ускорении возникновения этих опухолей при введении животным больших количеств лимфоцитов от сингенных факторных доноров и связь эффекта с присутствием вируса Биттнера в опухоли и организме животных. У бесфакторных мышей ранняя тимэктомия не задерживает, а у мышей некоторых линий даже ускоряет возникновение опухолей. Иммунодепрессивные воздействия не оказывают влияния на рост перевитых опухолей бесфакторных мышей СЗНf. Не удалось обнаружить каких-либо изменений в строении молочной железы у тимэктомированных в раннем возрасте самок BALB/cf СЗН, хотя операция и приводила к четкой задержке возникновения опухолей [Herperger, 1970]. Еще одним аргументом против доминирующей роли эндокринного механизма в действии

угнетения Т-системы на возникновение опухолей являются данные о том, что эффект наблюдается не только у интактных самок, но и на фоне введения экзогенных половых гормонов или при трансплантации дополнительных гипофизов.

Каковы чисто иммунные механизмы различий в возникновении и пролиферации опухолевых клеток у интактных и иммунодепрессированных мышей? Здесь могут быть три возможности. Первая базируется на механизме классического феномена усиления. Показано, что у опухолевых самок BALB/c f СЗН лимфоциты ингибируют образование клетками опухоли молочной железы колоний *in vitro*. В то же время в сыворотке таких мышей систематически обнаруживаются факторы, блокирующие цитотоксическую и цитостатическую активность лимфоцитов. У тимэктомированных мышей они были в такой же степени активны *in vitro* по отношению к клеткам опухолей молочной железы, как и интактных животных, но при этом блокирующих факторов у оперированных животных не было [Herper, 1973]. Другая точка зрения высказана авторами теории иммуностимуляции [Pfehn, Larpe, 1971]. Полагают, что данные, полученные на модели MTV-S-индуцированных опухолей молочной железы у факторных мышей, объясняются иммуностимуляционным действием Т-лимфоцитов. Депрессия Т-системы отменяет иммуностимуляцию инфицированных вирусом Биттнера клеток молочной железы и тем самым тормозит возникновение неоплазм и скорость пролиферации их клеток. Наконец, возможно, что используемые методы депрессии тимусзависимой системы в первую очередь уничтожают популяцию Т-супрессоров, обеспечивающих толерантность факторных мышей к антигенам MTV-S. В результате развивается активный иммунный ответ по отношению к клеткам, инфицированным вирусом. Он тормозит развитие и рост индуцированных MTV-S опухолей молочной железы у факторных мышей.

Какой из этих механизмов имеет место на самом деле — покажут дальнейшие экспериментальные исследования. Однако из полученных данных ясно, что иммунодепрессивные воздействия, обычно стимулирующие в других системах развитие неоплазм, при канцерогенезе в молочной железе мышей тормозят развитие злокачественных процессов только тогда, когда последние индуцируются MTV-S и когда животные в раннем возрасте заражены этим же вирусом. Следовательно, именно естественное заражение животных онкогенным вирусом, приспособленным к паразитированию у особей данного вида, обуславливает отличие результатов, полученных в этой системе, от данных, регистрируемых на других экспериментальных моделях. Возможно, что в результате совместной эволюции онкорнавирусов и организмов, у которых они паразитируют, у вирусов возникли такие свойства (путь распространения, степень чужеродности для организма и т. д.), которые приводят к иммуностимуляции размножения инфицированных клеток в организме природных хозяев.

ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО РОСТА

Влияние иммунодепрессии на злокачественные процессы в решающей степени определяется тем, какая из составляющих иммунного ответа затронута в большей степени [Петров, Манько, 1971] и каков характер взаимоотношений между опухолью и лимфоидной системой организма [Грунтенко, 1977].

Учитывая генетически детерминированную неответаемость организма на конкретные антигены, Р. В. Петров (1976) считает, что организм резистентен к возникающим в нем антигенно измененным раковым клеткам до тех пор, пока не появляются такие аномальные клетки, на специфический опухолевый антиген которых данный индивидуум не способен отвечать эффективной иммунной реакцией.

А. С. Шевелев (1978) допускает, что осуществление цензорной функции организма не является привилегией только иммунной системы. Он считает, что эти задачи выполняют: тимусзависимая иммунная система; тимуснезависимая иммунная система; система надзора на молекулярном уровне, связанная с синтезом интерферона; механизмы, обеспечивающие аллогенную ингибицию и инактивацию песингенных стволовых клеток. Последнее явление открыто и детально изучено Р. В. Петровым и возглавляемой им школой [Петров, Сеславина, 1967; Манько и др., 1972; Петров, 1976]. Экспериментальный анализ отдельных этапов иммунопоэза при опухолевом росте проведен Р. М. Хайтовым (1979). Получены данные, показывающие, что иммунологическая несостоятельность при опухолевом росте является результатом нарушения процессов миграции и дифференцировки стволовых клеток, угнетения миграции и кооперации Т- и В-лимфоцитов, активации клеток-супрессоров. Генетические аспекты иммунных реакций мышей при химическом канцерогенезе рассмотрены Ю. А. Уманским (1975). Критический анализ методов иммунотерапии злокачественных опухолей человека дан В. И. Говалло (1977).

Оригинальную концепцию о существовании двух систем защиты млекопитающих от возникновения спонтанных опухолей предложила и разрабатывает Г. И. Дейчман (1979). Опираясь на существование феномена «проскальзывания» и иммунологически неспецифического характера последнего, автор постулировала наличие независимой от тимуса системы естественной резистентности. Предполагается, что в основе естественной резистентности лежит функционирование системы макрофагов и натуральных киллеров. Объясняя локальный характер роста опухолевых трансплантатов и отсутствие метастазирования у бестимусных мышей, автор предполагает, что эти мыши имеют развитую систему естест-

венной резистентности. Г. И. Дейчман указывает, что бестимусные мышцы могут оказаться очень удобным объектом для анализа связи естественной резистентности с тимусзависимой системой. В цитируемой работе обосновано существование системы естественной резистентности как наиболее древней и первой, с которой сталкиваются трансформированные клетки. Важными преимуществами ее автор считает способность реагировать на единичные опухолевые клетки, иммунологическую неспецифичность реакции и независимость от специфического опухолевого трансплантационного антигена в злокачественных клетках. Особое значение имеет то, что автор предлагает путь для экспериментальной проверки выдвинутой концепции. Л. Н. Фонталин [Фонталин, Певницкий, 1978] указывает на сходство природы феномена «проскользывания» с процессами индукции толерантности.

Группа исследователей Института цитологии и генетики СО АН СССР развивает представления о том, что клетки каждой опухоли индивидуальны в отношении двух основных иммунологических характеристик: иммуногенности (способности вызывать продукцию цитотоксических и блокирующих антител, клеток эффекторов и супрессоров) и иммуночувствительности (чувствительности к лизирующему действию антител и комплемента, Т-клеткам, макрофагам, Нк- и К-лимфоцитам). Иммунологическая индивидуальность каждой опухоли является следствием того, что названные параметры складываются из комбинации более мелких свойств [Лавровский, Викслер, 1981]. С этих позиций можно объяснить, почему опухоли образуют очень большое разнообразие иммунологических взаимоотношений с их хозяевами. Для прогнозирования поведения злокачественных клеток в тех или иных экспериментальных и клинических условиях необходима всесторонняя количественная оценка выраженности перечисленных иммунологических свойств опухолевых клеток. При таком подходе можно обнаружить «слабые» и «сильные» стороны разных опухолей, что необходимо для компетентного иммунотерапевтического вмешательства в злокачественный процесс.

Авторы изложенной точки зрения изучили свойства опухолевых клеток, способные влиять на иммунологические взаимоотношения опухоли и хозяина [Лавровский, Викслер, 1981]. Эти работы продемонстрировали большие резервы в изменчивости иммуногенности и иммуночувствительности опухолевых клеток в процессе злокачественной прогрессии. Так, показано, что степень иммунного ответа мышей на сильные трансплантационные антигены комплекса H-2 зависит от гистологического типа клеток, взятых в качестве трансплантата [Lavrovsky e. a., 1979]. При этом установлено, что эффективность иммунного ответа на клетки разных гистологических типов генетически детерминирована. Авторы считают, что степень иммунологического надзора за клетками одного фенотипа неодинакова у разных линий животных. Это может быть причиной варьирования частоты возникновения опухолей по

тканям у животных разных генотипов. Резервы изменчивости степени иммуногенности злокачественных клеток могут определяться не только изменчивостью опухолевых трансплантационных антигенов, но и другими возможными фенотипическими изменениями клеток, аналогичными тем, которые сопутствуют их дифференцировке.

В другой работе [Лавровский и др., 1977] было показано, что опухолевые клетки могут существенно повышать свою резистентность к эффекторам Т-клеточной иммунной реакции за счет снижения на них сорбции лимфоцитов-киллеров. Было установлено, что у разных клеток-мишеней сильно варьирует способность неспецифически сорбировать на своей поверхности неиммунные сингенные и аллогенные лимфоциты, причем степень сорбции иммунных (анти-Н-2) аллогенных лимфоцитов на клетках-мишенях прямо коррелирует с чувствительностью последних к лизирующему действию лимфоцитов.

Эти исследователи получили интересные данные о механизмах резистентности клеток опухолей к другим эффекторам иммунной системы — НК-лимфоцитам.

Клетки различных мышинных опухолей существенно различаются по чувствительности к естественным киллерам. В сыворотке крови взрослых крыс и человека (видов с особенно высокой НК-активностью) присутствует недиализабельный, чувствительный к трипсину фактор, блокирующий активность естественных киллеров [Lavrovsky, Viksler, 1980a]. Приобретение в результате селекции трансформированными, но незлокачественными клетками устойчивости к лизирующему действию НК-лимфоцитов может переводить неопухолеродные клетки в ранг злокачественных [Lavrovsky, Viksler, 1980b]. Даже незначительное повышение НК-активности у мышей СЗН под влиянием персистенции в их организме вируса Биттнера может быть причиной более медленного роста ряда опухолей у этих животных [Лавровский, Викслер, 1980]. Клетки многих опухолей способны выделять в окружающую среду вещества, неспецифически подавляющие цитотоксическую реакцию лимфоцитов и макрофагов, а также вещества, ускоряющие миграцию последних [Лавровский и др., 1976; Разворотнев и др., 1977]. Таким образом, клетки-мишени могут «регулировать» степень направленной на них иммунной реакции через продукты метаболизма, причем злокачественные клетки, как правило, подавляют эту реакцию.

Авторы цитируемых работ продемонстрировали не только большую изменчивость клеток-мишеней в отношении их иммунологических свойств, но и экспериментально подтвердили конструктивность предложенной ими точки зрения. Они показали, что из пяти изученных ими штаммов клеток иммунологически наименее уязвимые (низкая иммуногенность, высокая резистентность к Т- и НК-лимфоцитам, выделение веществ, подавляющих эффекторную функцию лимфоцитов) обладают наибольшей злокачествен-

ностью, и напротив, клетки наиболее уязвимые (высокая иммуногенность, высокая чувствительность к Т- и НК-лимфоцитам, выделение веществ, усиливающих эффекторную функцию Т-лимфоцитов и макрофагов) не прививаются у интактных реципиентов вообще и растут лишь у половины иммуносупрессированных животных [Лавровский, Викслер, 1981]. Точка зрения, развиваемая В. А. Лавровским с соавт, согласуется с представлениями Фулдса [Foulds, 1954] об опухолевой прогрессии.

Опираясь на представления Фулдса, Дж. Клейн [Klein, 1979] предложил концепцию, объясняющую роль цитогенетических изменений в неопластическом процессе. Согласно этой концепции индуцирующий агент любой природы (химические или физические канцерогены, вирусы) приводит к возникновению пренеопластических клеток, сходных с трансформированными *in vitro* «бессмертными» клеточными линиями, которые являются опухолеродными *in vivo*. Превращение пренеопластических клеток в истинно раковые происходит под влиянием специфических генетических изменений. Последние в некоторых системах экспрессируются в цитогенетически различимые хромосомные аномалии. Появляются эти изменения случайно, но затем селективно фиксируются в силу преимущественного роста клона, который их несет. Такое преимущество основано на уменьшении чувствительности к ростоконтролирующим сигналам организма. Этот селекционный процесс ответствен за цитогенетическую конвергентность пренеопластических клеток, возникающих под действием самых разнообразных индуцирующих агентов к одному и тому же неслучайному хромосомному изменению.

Обсуждению генетических механизмов устойчивости злокачественных опухолей к иммунологическим, физическим и химиотерапевтическим воздействиям посвящена монография Г. Н. Лобко и Т. М. Порубовой (1980). Авторы приводят многочисленные данные о том, что под влиянием иммунологических факторов изменяется генетический профиль популяции опухолевых клеток, что вносит большой вклад в формирование резистентности опухолей к этим воздействиям. В предыдущей главе рассматривалось влияние иммунодепрессии на развитие опухолей молочной железы у экспериментальных животных. Эта модель близка к естественному канцерогенезу, так как у животных определенных генотипов (высокоракковые линии) опухоли возникают без всяких дополнительных канцерогенных воздействий со стороны экспериментатора. Основные итоги ее изучения таковы.

Влияние угнетения тимусзависимой лимфатической системы на развитие опухолей молочной железы у мышей зависит от присутствия в организме животных и в опухоли вируса Биттнера, а также возраста, в котором мыши инфицированы.

Результаты, описанные выше, свидетельствуют, что у мышей генетическая предрасположенность к развитию индуцированных вирусом Биттнера опухолей молочной железы включает в себя

последственную детерминацию морфологических и функциональных свойств тимуса.

При вирусном канцерогенезе угнетение тимусзависимого иммунитета приводит к различным результатам в природных (собственный онкогенный вирус, естественное заражение) и неприродных (ксеногенный вирус, экспериментальное заражение) системах. В неприродных системах иммунодепрессия, как правило, стимулирует развитие злокачественных процессов, в природных — или не оказывает существенного влияния на них, или тормозит возникновение и рост неоплазм. Анализ этих фактов привел к предположению, что иммунный надзор препятствует развитию антигенных неоплазм в результате мутаций, действия эндогенных химических канцерогенов и канцерогенного влияния внешней среды. В то же время в результате эволюционной приспособленности онкорнавирусов к существованию в организме природных хозяев иммунный надзор не эффективен по отношению к вирус-ассоциированным опухолевым антигенам при вирусном канцерогенезе в природных системах [Грунтенко, 1975, 1977].

В результате сделан вывод о том, что методы иммунотерапии и иммунопрофилактики должны быть различны для этих двух классов неоплазм.

В основе теории иммунного надзора лежит постулат об эволюционном формировании системы иммунитета для поддержания антигенного постоянства тканей организма. Предполагается, что ее основной функцией является элиминация всех отклоняющихся от нормы (в том числе и потенциально злокачественных) вариантов соматических клеток с антигенно измененной поверхностью [Бернет, 1971; Burnet, 1970].

Дж. Клейн и Е. Клейн [Klein, Klein, 1977] считают, что эффективная иммунная реакция возможна только на те опухолевые антигены, в отношении которых прошел отбор макроорганизмов на наличие соответствующих генов иммунного ответа. Такого отбора по отношению к антигенам опухолей, индуцированных химическими канцерогенами, быть не могло, и поэтому такие опухоли, как правило, не находятся в сфере действия иммунологического надзора. По мнению Клейновых, иммунный надзор прежде всего эффективен в отношении тех опухолей, которые индуцируются широко распространенными ДНК-содержащими онкогенными вирусами, поскольку длительное сосуществование с их природными хозяевами привело к такому отбору среди последних, что их потомки способны к эффективному ответу на клеточные антигены, индуцируемые этими вирусами.

Нетрудно заметить, что позиции Бернета и Клейна существенно различаются: Бернет постулировал, что иммунный надзор направлен против всего «не своего» в организме, тогда как в представлении Клейна иммунный надзор более конкретен и эффективен лишь в отношении определенных опухолевых антигенов, постоянно возникающих у данного вида. Фактически речь идет об обыч-

ном для эволюционных представлений отборе на устойчивость к постоянно действующему вредному фактору внешней среды. Вред состоит в том, что данные вирусы индуцируют злокачественные опухоли. Отбор среди природных хозяев, по-видимому, мог быть возможен только в случае, если эти вирусы были исходно онкогенны для данных организмов. Тогда неясно, как естественный отбор мог сохранить такие вирусы — они должны были элиминироваться, ибо гибель хозяина является одновременно гибелью и для паразита. Эволюционным преимуществом обладают «мирные» паразиты. Представляется, что паразиты приводят к гибели только неприродных хозяев.

Необходимо, однако, отметить, что у природных хозяев эти вирусы неонкогенны лишь при естественном заражении. Выше приводилось большое количество данных литературы о том, что депрессия Т-системы у мышей способствует возникновению опухолей, индуцируемых экспериментально вводимым вирусом полиомы. Наследственно обусловленное отсутствие тимуса также приводит к более частому развитию неоплазм при экспериментальном заражении мышей вирусом полиомы. А ведь вирус полиомы — это мышинный вирус. Он нормально присутствует в организме мышей многих генотипов. Однако одной иммунодепрессии (экспериментальной или наследственной) недостаточно, чтобы вызвать массовое возникновение полиомных опухолей. Следовательно, дело не только в эффективности иммунного надзора у этих животных, а прежде всего в том, что при естественном заражении этот вирус не онкогенен для животных данного вида. Для эффективной индукции опухолей используются крайне искусственные чисто лабораторные приемы: доза вируса, пути введения, возраст животных; применяются отселекционированные в лабораториях штаммы вирусов, и т. д. Построениям Клейна противоречит, на наш взгляд, и факт клеточного происхождения онкогенов онковиромов [Альтштейн, 1973, 1979]. Это означает, что исходно вирусы онкогена не имели. Включение в их геном клеточного гена возможно было только в том случае, если это событие не снижало вероятность распространения вируса у природных хозяев. Другими словами, этот клеточный ген может быть онкогенен только у неприродных хозяев, или у природных при искусственном заражении.

Таким образом, нам представляется, что для объяснения отсутствия опухолей у природных хозяев онковиромов допущения Клейна недостаточно обоснованы.

Необходимо выяснить, каковы конкретные механизмы иммунного надзора, какие эффекторы в зависимости от этиологии опухоли, стадий развития злокачественного процесса, иммунологического статуса организма выполняют основную роль в иммунном надзоре, как взаимодействуют эти эффекторы. Ответ на эти вопросы покажет новые пути борьбы со злокачественными новообразованиями.

ЛИТЕРАТУРА

- Абронина И. Ф., Караулов А. В., Брондз Б. Д. Характеристика Т-супрессоров, концентрированных с помощью элюции с монослоя аллогенных клеток-мишеней.— Бюл. эксп. биол. мед., 1980, т. 89, № 2, с. 202.
- Агеевко А. И. Молекулярная биология и иммунология вирусного канцерогенеза. М.: Медицина, 1974. 328 с.
- Агеевко А. И. Механизмы вирусного онкогенеза. М.: Медицина, 1978, 384 с.
- Альтштейн А. Д. Онкогены опухолеродных вирусов.— Журн. Всесоюз. хим. об-ва им. Менделеева, 1973, № 18, с. 630.
- Альтштейн А. Д. Механизм трансформирующего действия опухолеродных вирусов на клетку.— В кн.: Опухолевый рост как проблема биологии развития. М.: Наука, 1979, с. 5.
- Беляев Д. К., Груntenко Е. В. Генетическая дифференциация тимуса у мышей разных линий в связи со злокачественным ростом. I. Влияние трансплантации изологичной тимусной ткани мышам линии С3Н/He на развитие изологичной опухоли молочной железы.— Генетика, 1970, т. 6, № 1, с. 56.
- Беляев Д. К., Груntenко Е. В., Виделец И. Ю. Генетическая дифференциация тимуса в связи со злокачественным ростом. II. Различие в весе тимуса у мышей разных линий.— Генетика, 1970а, т. 6, № 1, с. 64.
- Беляев Д. К., Груntenко Е. В., Виделец И. Ю. Генетическая дифференциация тимуса в связи со злокачественным ростом. III. Различное действие трансплантатов тимуса высоко- и низкоракowych мышей на развитие опухоли молочной железы.— Генетика, 1970б, т. 6, № 2, с. 64.
- Бернет Ф. Клеточная иммунология, М.: Мир, 1971. 542 с.
- Бесси М. Электроно-микроскопическая анатомия. Лимфоидная ткань. М.: Мир, 1967. 100 с.
- Бородин П. М., Мюллер Л., Виделец И. Ю. и др. Генетическая дифференциация тимуса в связи со злокачественным ростом. 4. Генетический анализ тимусного индекса у мышей.— Генетика, 1976, т. 12, № 7, с. 68.
- Брондз Б. Д. Субпопуляции Т-лимфоцитов человека и их супрессорные функции.— Тер. арх., 1980, т. 52, № 9, с. 120.
- Брондз Б. Д., Абронина И. Ф., Зайцева М. Б. и др. Ia-антигены — маркеры специфических Т-супрессоров, иммунных к антигенам комплекса H-2.— Генетика, 1981.
- Брондз Б. Д., Караулов А. В. Иммунологическая специфичность, природа и свойства клеток-супрессоров, индуцированных в смешанных культурах лимфоцитов.— Бюл. эксп. биол. мед., 1980, т. 89, № 3, с. 315.
- Брондз Б. Д., Караулов А. В., Абронина И. Ф. Обнаружение рецепторов специфических Т-клеток супрессоров, иммунных к антигенам H-2, и их обогащение с помощью фракционирования на монослои клеток-мишеней.— Мол. биол., 1979, т. 13, № 6, с. 1257.
- Брондз Б. Д., Караулов А. В., Абронина И. Ф. Иммунологическая специфичность и кинетика индукции Т-супрессоров при иммунизации мышей аллогенной селезенкой.— Цитология, 1980, т. 22, № 5, с. 383.

- Брондз Б. Д., Караулов А. В., Аброшина И. Ф. и др. Генетические условия индукции и реализации действия специфических Т-супрессоров, иммунных к антигенам Н-2.— Генетика, 1979, т. 15, № 12, с. 2119.
- Брондз Б. Д., Караулов А. В., Бландова З. К. Подавление специфическими Т-супрессорами синтеза ДНК в смешанной культуре лимфоцитов на «посторонние» антигены системы Н-2 при условии локализации обоих антигенов на одних и тех же клетках-стимуляторах.— Иммунология, 1980, т. 1, № 1, с. 43.
- Брондз Б. Д., Рохлин О. В. Молекулярные и клеточные основы иммунологического распознавания. М.: Наука, 1978, с. 335.
- Брондз Б. Д., Сура С. И., Снегирева А. Е. Морфологические и автордиографические изменения иммунных лимфоцитов при взаимодействии с аллогенными клетками-мишенями.— Бюл. эксп. биол. мед., 1972, № 1, с. 70.
- Быковская С. И., Быковский А. Ф., Сергеев А. В. и др. Электронно-микроскопическое изучение взаимодействия цитолитических Т-лимфоцитов и клеток-мишеней.— Бюл. эксп. биол. мед., 1977, т. 84, № 10, с. 443.
- Быковская С. И., Комиссарова И. А., Кадагидзе З. Г. Изучение активности кислой фосфатазы и дегидрогеназ сукцината и дегидрооротата при взаимодействии аллогенных лимфоцитов и клеток-мишеней в культуре ткани.— Бюл. эксп. биол. мед., 1975, т. 80, № 7, с. 64.
- Быковская С. И., Раушенбах М. О. Антигензависимая дифференцировка эффекторных Т-лимфоцитов. IX. Междунар. симп. сравнит. изуч. лейкоза и родственных заболеваний. Сухуми, 1979, с. 10.
- Быковская С. И., Рытенко А. И., Раушенбах М. О. и др. Обнаружение гипертрофии комплекса Гольджи в цитолитических Т-лимфоцитах при взаимодействии их с клетками-мишенями.— Докл. АН СССР, 1977, т. 235, № 6, с. 1462.
- Быковская С. И., Сергеев А. В., Лучанская Л. М. и др. Пролиферация и цитотоксичность лимфоцитов тимуса *in vitro*.— Бюл. эксп. биол. мед., 1977, № 9, с. 330.
- Быковская С. И., Шевелев А. А., Рытенко А. И. и др. Шеддинг компонентов плазматической оболочки Т-лимфоцитов киллеров.— Иммунология, 1980, № 4, с. 31.
- Быковский А. Ф., Раушенбах М. О., Быковская С. И. Случивание (shedding) плазмалеммы Т-лимфоцита в процессе взаимодействия с клеткой-мишенью. Обнаружение и ультраструктура «мембраносом».— Докл. АН СССР, 1978, т. 242, № 4, с. 971.
- Войтенок Н. И. Современные представления о механизмах развития иммунного ответа.— Тер. арх. 1980, т. 52, № 9, с. 132.
- Говалло В. И. Иммунитет к трансплантатам и опухолям. Киев: Вища школа, 1977, с. 384.
- Голубев Л. Б., Шляпкевич М. А. Современные аспекты вирусной теории происхождения злокачественных новообразований. Л.: Медицина, 1972. 200 с.
- Городилова В. В. Вопросы онкоиммунологии. М., 1977.
- Городилова В. В. Иммунология и вирусный канцерогенез.— В кн.: Сб. науч. труд., Моск. науч. иссл. ин-т им. П. А. Герцена, 1978.
- Городилова В. В., Ключкин Б. М., Мандрик Э. В. Иммунологический контроль у онкологических больных. Томск, 1978.
- Грунтенко Е. В. Тимус и канцерогенез. Генетический аспект проблемы.— Усп. совр. биол., 1973а, т. 75, № 2, с. 278.
- Грунтенко Е. В. Влияние тимэктомии облучения и иммунизации мышей линии СЗН/Не на развитие сингенной опухоли молочной железы.— Вопр. онкол., 1973б, т. 19, № 9, с. 102.
- Грунтенко Е. В. Эволюционная приспособленность онкорнавирусов к действию иммунологического надзора (гипотеза).— В кн.: Иммунология опухолей. Киев, 1975, с. 70.
- Грунтенко Е. В. Иммунитет и возникновение злокачественных опухолей. Новосибирск: Наука, 1977, с. 272.

- Груштейн Е. В., Матвеев Н. А. Повышение частоты возникновения опухолей молочной железы у крыс, инфицированных вирусом Биттнера. — Докл. АН СССР, 1977, с. 237, № 4, с. 987.
- Дейчман Г. И. Современные концепции иммунологических взаимоотношений опухоли и организма. — В кн.: Опухолевый рост как проблема биологии развития. М.: Наука, 1979, с. 208.
- Зильбер Л. А., Ирли И. С., Киселев Ф. Л. Эволюция вирусо-генетической теории возникновения опухолей. М.: Наука, 1975, с. 199.
- Ирли И. С., Киселев Ф. Л. Биология онкорнавирусов. — В кн.: Итоги науки и техники. Вирусология. Т. 4. М., 1972, с. 112.
- Каледин В. И., Груштейн Е. В., Морозова Т. С. Более низкая канцерогенность уретана для легких бестимусных мышей nude по сравнению с однопаметными иммунологически нормальными мышами. — Бюл. эксп. биол. мед., 1978, № 11, с. 574.
- Каулен Д. Р. Пассивный и адаптивный иммунитет у облученных животных. Автореф. докт. дис. М., 1967.
- Кауленд Д. Р., Голованова Т. А., Пятыгина Д. П. и др. Угнетение стволовых гемопоэтических клеток сингенными лимфоцитами. — Бюл. эксп. биол. мед., 1974, № 2, с. 64.
- Ковальчук Л. В. Роль тимуса в иммунитете у взрослых животных. — Изв. АН СССР. Сер. биол., 1969, № 2, с. 259.
- Красковский Г. В. Иммуногенетические основы раковой апергии. Минск: Наука и техника, 1970, с. 264.
- Круглова Г. В., Каверзнева М. М., Раушенбах М. О. и др. Функциональная активность Т-лимфоцитов при гемобластозах. — Вестн. АМН СССР, 1978, № 5, с. 47.
- Лавровский В. А., Викслер В. Х. Повышенная иммунологическая реактивность против клеток гепатомы 22а у «факторных» мышей С3Н по сравнению с «бесфакторными». — Бюл. эксп. биол. мед., 1980, № 10, с. 467.
- Лавровский В. А., Викслер В. Х. Иммунологические свойства опухолевых клеток, определяющие степень их злокачественности. — Усп. совр. биол., 1981, № 1 (в печати).
- Лавровский В. А., Викслер В. Х., Разворотнев В. А. и др. Свойства клеток, определяющие их иммуночувствительность. — Цитология, 1977, т. 9, № 9, с. 1018.
- Лавровский В. А., Тихонов В. Я., Рубцов Н. Б. и др. Выделение клетками-мишенями веществ, модифицирующих степень их лизиса иммунными лимфоцитами и макрофагами. — Журн. микробиол., 1976, № 12, с. 77.
- Лобко Г. Н., Порубова Г. М. Иммуногенетические основы резистентности опухолей. Минск: Высшая школа, 1980, с. 176.
- Мавько В. М. Патология иммунной системы у бестимусных животных. — В кн.: Итоги науки и техники. Иммунология, Т. 8. М., 1979, с. 117.
- Мавько В. М., Михайлова А. А., Сеславина Л. С. Эффекты и механизмы взаимодействия аллогенных клеток. — В кн.: Общие вопросы патологии. М., ВИНТИ, 1972, с. 154.
- Марчук Г. И. Математические модели в иммунологии. М.: Наука, 1980. 264 с.
- Маянский Д. Н., Каулен Д. Р. Трансплантационная болезнь. Новосибирск: Наука, 1978. 255 с.
- Миллер Дж., Дукор П. Биология тимуса. М.: Мир, 1967. 112 с.
- Михайлова А. А., Захарова Л. А., Петров Р. В. Синтез антигенов и неспецифических γ-глобулинов в смешанных культурах сингенных и аллогенных лимфоидных клеток. — Докл. АН СССР, 1972, т. 203, № 4, с. 948.
- Петров Р. В. Генетический контроль иммунного ответа. — Вест. АМН СССР, 1974, № 1, с. 41.
- Петров Р. В. Иммунология и иммуногенетика. М.: Медицина, 1976а.
- Петров Р. В. Т- и В-системы иммунитета. М.: Медицина, 1976б.
- Петров Р. В. Клеточный иммунитет. Биологическая активность Т- и В-лимфоцитов. М.: Медицина, 1977.
- Петров Р. В. Регуляторные клетки иммунной системы. М.: Медицина, 1978.
- Петров Р. В. Патология иммунной системы. М.: Медицина, 1979.

- Петров Р. В., Сеславина Л. С. Инактивация «стволовых» клеток при контакте генетически несовместимых клеточных взвесей из лимфоидных тканей.— Докл. АН СССР, 1967, т. 176, № 5, с. 1170.
- Петров Р. В., Хантов Р. М. Лимфоциты — супрессоры В-ряда — В-супрессоры.— Усп. совр. биол., 1981, т. 91, с. 8.
- Петров Р. В., Хантов Р. М., Манько В. М., Михайлова А. А. Контроль и регуляция иммунного ответа. М.: Медицина, 1981. 312 с.
- Петров Р. В., Чередеев А. Н. Т- и В-лимфоциты.— Усп. совр. биол., 1974, т. 77, вып. 1, с. 90.
- Радзиховская Р. М. Некоторые закономерности противоопухолевого иммунитета. М.: Медицина, 1971. 224 с.
- Разворотнев В. А., Лавровский В. А., Висклер В. Х. Выделение опухолевыми и неопухолевыми клетками веществ, модифицирующих миграцию макрофагов и цитотоксическое действие иммунных лимфоцитов *in vitro*.— Журн. микробиол., 1977, № 6, с. 48.
- Раушенбах М. О., Быковская С. Н. Проллиферация и механизм взаимодействия Т-лимфоцита киллера с опухолевой клеткой-мишенью.— Эксп. онкология, 1979, т. 1, с. 29.
- Ревазова Е. С., Юдичева Т. В. Трансплантация опухолей человека бестимусным мышам и получение опухолевых штаммов.— Вест. АМН СССР, 1980, № 11, с. 64.
- Степина В. И. Роль тимуса в генезе лейкозов у экспериментальных животных.— В кн.: Научный обзор. Вып. 1. Лейкозы. М., 1966, с. 81.
- Сура С. И., Быковский А. Ф., Черняховская И. Ю. и др. Электронно-микроскопическое и автордиографическое изучение взаимодействия лимфоцитов и клеток-мишеней в культуре ткани.— Бюл. эксп. биол. мед., 1970, с. 98.
- Таппебаум А., Сильверстон Г. Питание и рак.— В кн.: Успехи в изучении рака. Т. 1. М., 1955, с. 437.
- Фонталип Л. Н., Певницкий Л. А. Иммунологическая толерантность. М.: Медицина, 1978. 285 с.
- Фридман В., Шпи С., Ким У. Извращенное метастазирование опухолей молочной железы крыс у бестимусных мышей *nude*.— В кн.: XIV Международный генетический конгресс. М., 1978.
- Хантов Р. М. Патология иммунной системы при опухолевом росте.— В кн.: Итоги науки и техники. Иммунология. Т. 8. М., 1979, с. 92.
- Чертков И. Л., Фриденштейн А. Я. Клеточные основы кроветворения. М.: Медицина, 1977. 272 с.
- Шевелев А. С. Противоречия иммунологии. М.: Медицина, 1978, 255 с.
- Allison A. C. The role of microfilaments and microtubules in cell movement, endocytosis and exocytosis.— In: Locomotion of tissue cells.— Ciba Found. Symposium, 1973, v. 14, p. 109.
- Allison A. C., Ferluga J. How lymphocytes kill tumor cells.— New Engl. J. Med., 1976, v. 295, p. 165.
- Alter B. J., Bach F. H. Lymphocyte phenotypes of responding cells in secondary allo-antigen responses.— J. Immunol., 1979, v. 123, p. 2599.
- Alter B. J., Grillo-Courvalin C., Bach M. L. e. a. Secondary cell mediated lymphocytes: Importance of H-2LD and SD factors.— J. Exptl. Med., 1976, v. 143, p. 1005.
- Altman A., Bechtold T. E., Cardenas J. M. e. a. The biological effects of allogeneic effect factor on T-lymphocytes: In vitro induction of cytotoxic T-lymphocytes manifesting preferential lytic activity against H-2 identical tumor cells.— Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979a, v. 16, p. 3477.
- Altman A., Bechtold T. E., Katz D. H. Manipulation of cytotoxic T-lymphocyte responses to syngeneic tumors. I. Haptenreactive helper T-lymphocytes augment tumor-specific CTL responses in vitro.— J. Immunol., 1979b, v. 122, p. 2484.
- Altman A., Cardenas J. M., Bechtold T. E. e. a. The spontaneous induction of primary cytotoxic T-lymphocyte responses in vitro by allogeneic effect

- factor.— In: Proceedings of the Second International Lymphokine Workshop./Eds. by de Weck, A. L., Landy M. N. Y. Acad. Press, 1979.
- Altman A., Cardenas J. M., Bechtold T. E. e. a. The biological effects of allogeneic effect factor on T-lymphocytes. I. The mitogenic activity and the autonomous induction of cytotoxic T-lymphocytes by AEF.— *J. Immunol.*, 1980a, v. 124, p. 105.
- Altman A., Cardenas J. M., Bechtold T. E. e. a. The biological effects of allogeneic effect factor on T-lymphocytes. II. The specificity of AEF-induced cytotoxic T-lymphocytes.— *J. Immunol.*, 1980b, v. 124, p. 114.
- Altman A., Cohen I. R. Cell-free media of mixed lymphocyte cultures augmenting sensitisation in vitro of mouse T-lymphocytes against allogeneic fibroblasts.— *Eur. J. Immunol.*, 1975, v. 5, p. 457.
- Altman A., Katz D. H. Production and isolation of helper and suppressor factors.— *J. Immunol. Methods*, 1980, v. 38, p. 9.
- Ambrus C. M., Harrison J. W. Effect of the mammary tumor agent on species other than mouse.— *Experientia*, 1952, v. 8, p. 469.
- Amos D. B. The use of simplified systems as to the interpretation of mechanism of graft rejection.— *Prog. Allergy*, 1962, v. 6, p. 468.
- Amsterdam A., Schramm M., Ohad I. e. a. Concomitant synthesis of membrane protein and exportable uroetin of the secretory granule in rat parotid gland.— *J. Cell Biol.*, 1971, v. 50, p. 187.
- Andersson L. C. Size distribution of killer cells during allograft response.— *Scand. J. Immunol.*, 1973, v. 2, p. 75.
- Andersson J., Buxbaum J., Citronbaum R. e. a. IgM-Producing tumours in the BALB/c mouse. A model for B-cell maturation.— *J. Exptl. Med.*, 1974, v. 140, p. 742.
- Andersson L. C., Häyry P. Specific priming of mouse thymus—dependent lymphocytes to allogeneic cells in vitro.— *Eur. J. Immunol.* 1973, v. 3, p. 595.
- Andersson L. C., Häyry P. Clonal isolation of alloantigen-reactive T-cells and characterization of their memory functions.— *Transplant. Rev.*, 1975, v. 25, p. 121.
- Andersson J., Sjöberg O., Möller G. Mitogenes as probes for immunocyte activation and cellular cooperation.— *Transplant. Rev.*, 1972, v. 11, p. 131.
- Antakly T., Pelletier G., Zeytinogly F. e. a. Changes of cell morphology and prolactin secretion induced by 2-br-ergo-cryptine, estradiol and thyrotropin releasing hormone in rat anterior pituitary cells in culture.— *J. Cell Biol.*, 1980, v. 86, p. 377.
- Antoine J. C., Avrameas S. Surface immunoglobulins of rat immunocytes: quantitation and fate of cell — bound peroxidase-labeled antibody and Fab fragment.— *Eur. J. Immunol.*, 1974, v. 4, p. 468.
- Aoyama T., Kihara K., Nishigachi K. Dual effects of thymic substance (s) on growth of cultures mammalian cells.— *Exptl. Cell Res.*, 1975, v. 93, p. 427.
- Argyris B., Horowitz M. Cell interaction in tumor allograft immunity. Suppressor cell in the spleen of allogeneic tumor sensitized mice.— *Transplantation*, 1976, v. 22, p. 112.
- Armerding D., Ebshar Z., Katz D. H. Activation of T- and B-lymphocytes in vitro. VI. Biochemical and physicochemical characterization of the allogeneic effect factor.— *J. Immunol.*, 1977, v. 119, p. 1468.
- Armerding D., Katz D. H. Activation of T- and B-lymphocytes in vitro II Biological and biochemical properties of and allogeneic effect factor (AEF) active in triggering specific B lymphocytes.— *J. Exptl. Med.*, 1974, v. 140, p. 19.
- Armerding D., Kubo R. T., Grey H. M. e. a. Activation of T-and B-lymphocytes in vitro: Presence of β 2-microglobulin determinants on allogeneic effect factor.— *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1975, v. 72, p. 4577.
- Armerding D., Sachs D. H., Katz D. H. Activation of T- and B-lymphocytes in vitro III Presence of Ia-determinants on allogeneic effect factor (AEF).— *J. Exptl. Med.*, 1974, v. 140, p. 1717.

- Aunus D., Hesketh J. R., Devilliers G. Freeze-fracture study of choromaffin cell during exocytosis evidence for connections between the plasma membrane and secretory vesicles and for movements of plasma membrane associated particles.— *Cell Tissue Res.*, 1979, v. 197, p. 433.
- Bach F. H. Donor-recipient pairing for MHC LD and CD determinants.— *Transplant. Proc.*, 1978, v. X, p. 327.
- Bach F. H., Amos D. H. Hu-1: Major histocompatibility locus in man.— *Science*, 1967, v. 156, p. 1506.
- Bach F. H., Bach M. L., Soudel P. M. Differential function of major histocompatibility complex antigens in T-lymphocyte activation.— *Nature*, 1976, v. 259, p. 273.
- Bach F. H., Grillo-Courvalin C., Kuperman O. J. e. a. Antigenic requirements for triggering of cytotoxic T-lymphocytes.— *Immunol. Rev.*, 1977, v. 35, p. 76.
- Bach F. H., Hirschhorn K. Lymphocyte interaction: A potential histocompatibility test in vitro.— *Science*, 1964, v. 143, p. 813.
- Bach F. H., Segall M., Zier K. S. e. a. Cell-mediated immunity: separation of cells involved in recognitive and destructive phases.— *Science*, 1973, v. 180, p. 403.
- Bach F. H., Voynow N. K. One-way stimulation in mixed leukocyte culture.— *Science*, 1966, v. 153, p. 545.
- Bain B., Vaz M. R., Lowenstein L. The development of large immature mononuclear cells in mixed leukocyte culture.— *Blood*, 1964, v. 23, p. 108.
- Baker P. E., Gillis S., Smith K. A. Monoclonal cytolytic T-cell lines.— *J. Exptl. Med.*, 1979, v. 149, p. 273.
- Baldwin R. W. Immunological aspects of chemical carcinogenesis.— In: *Advances in cancer research*/Ed. by G. Klein. S. Weinhouse A. Haddow. N. Y.: Acad. Press. 1973, p. 1.
- Balner H., Dersjant H. Neonatal thymectomy and tumor induction with methylcholanthrene in mice.— *J. Nat. cancer Inst.*, 1966, v. 36, p. 513.
- Balner H. Immunosuppression and neoplasia.— *Rev. Eur. Stud. Clin. Biol.*, 1970, v. 15, p. 599.
- Barber T. A., Alter B. I. Ultrastructure of effector — target cell interaction in secondary cell mediated lympholysis.— *Scand. J. Immunol.*, 1978, v. 7, p. 57.
- Baum L. L., Pilarski L. M. In vitro generation of antigen — specific helper T cells that collaborate with cytotoxic T-cell precursors.— *J. Exptl. Med.*, 1978, v. 148, p. 1579.
- Bearle M. G., McDermott R. P., Stacey M. C. e. a. Stimulating cell types in the autologous mixed leukocyte reaction in man.— *J. Immunol.*, 1980, v. 124, p. 227.
- Beisson J., Cohen J., Lefort-Tran M. e. a. Control of membrane fusion in exocytosis. (Physiological studies on a paramecium mutant broked in the final step of the trichocyst extrusion process).— *J. Cell Biol.*, 1980, v. 85, p. 213.
- Belyaev D. K., Gruntenko E. V. The influence of the thymus on the development of transplanted mammary tumour in mice.— *Int. J. Cancer*, 1972a, v. 9, p. 1.
- Belyaev D. K., Gruntenko E. V. Strain differences in thymus weight in mice with different predispositions to spontaneous mammary cancer.— *Nature*, 1972b, v. 237, p. 401.
- Bennett G., Leblond C. P., Haddad A. Migration of glycoprotein from the Golgi apparatus to the surface of various cell types as shown by radioautography after labeled fucose injection into rats.— *J. Cell Biol.*, 1974, v. 60, p. 258.
- Berg N. B., Young R. W. Sulfate metabolism in pancreatic acinar cells.— *J. Cell Biol.*, 1971, v. 50, p. 469.
- Berke G. Some recent advances and questions in lymphocytotoxicity.— In: *Regulatory mechanisms in lymphocyte activation*.— N. Y.: Acad. Press, 1977, p. 809.

- Berke G. Interaction of cytotoxic T-lymphocytes and target cells.— *Prog. Allergy*, 1979, v. 27, p. 3.
- Berke G., Amos D. B. Cytotoxic lymphocytes in the absence of detectable antibody.— *Nature, New Biol.*, 1973a, v. 242, p. 237.
- Berke G., Amos D. B. Mechanism of Lymphocyte-mediated cytotoxicity. The CML cycle and its role in transplantation immunity.— *Transplant. Rev.*, 1973b, v. 17, p. 71.
- Berke G., Fishelson Z. Localization of aggregate cell surface antigens of target cells bound to cytotoxic T-lymphocytes.— *J. Exptl. Med.*, 1975, v. 142, p. 1011.
- Berke G., Fishelson Z. A possible role of nucleus-membrane interaction in capping of surface membrane receptors.— *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1976, v. 73, p. 4580.
- Berke G., Fishelson Z. T-lymphocyte-mediated cytotoxicity. Contribution of intracellular components to target cell susceptibility.— *Transplant. Proc.*, 1977, v. 9, p. 671.
- Berke G., Fishelson Z., Schik B. Hyperthermia and formaldehyde can dissociate the binding and killing activities of cytolytic T-lymphocytes.— *Transplant. Proc.*, 1979, v. 11, N 1, p. 804.
- Berke G., Gabison D. Energy requirements for the binding and lytic steps of T-lymphocytes mediated cytotoxicity of leukemic cells in vitro.— *Eur. J. Immunol.*, 1975, v. 5, p. 671.
- Berke G., Gabison D., Feldman M. The frequency of effector cells in populations containing cytotoxic T-lymphocytes.— *Eur. J. Immunol.*, 1975, v. 5, p. 813.
- Berke G., Ax W., Ginsburg H., et al. Graft reaction in tissue culture. II. Quantification of the lytic action on mouse fibroblasts by rat lymphocytes sensitized on mouse embryo monolayers.— *Immunology*, 1969, v. 16, p. 643.
- Berke G., Sullivan K. A. Temperature control of lymphocyte-mediated cytotoxicity in vitro.— *Transplant. Proc.*, 1973, v. 5, p. 421.
- Berke G., Sullivan K. A., Amos D. B. Rejection of ascite tumor allografts. I. Isolation characterization and in vitro reactivity of peritoneal lymphoid effector cells from BALB/c mice immune to EL4 leukemia.— *J. Exptl. Med.*, 1972a, v. 135, p. 1334.
- Berke G., Sullivan K. A., Amos D. B. Rejection of ascites tumor allograft. II. A pathway for cell mediated tumor destruction in vitro by peritoneal exudate lymphoid cells.— *J. Exptl. Med.*, 1972b, v. 136, p. 1594.
- Berke G., Sullivan K. A., Amos D. B. Tumor immunity in vitro: destruction of a mouse ascites tumor through a cycling pathway.— *Science*, 1972c, v. 177, p. 433.
- Berke G., Yagil G., Ginsburg H., et al. Kinetic analysis of a graft reaction induced in cell culture.— *Immunology*, 1969, v. 17, p. 723.
- Bevan M. J. The major histocompatibility complex determines susceptibility to cytotoxic T-cell directed against minor histocompatibility antigens.— *J. Exptl. Med.*, 1975, v. 142, p. 1349.
- Bevan M., Langman R. E., Cohn M. H-2 antigen-specific cytotoxic T-cells induced by concanavalin A: estimation of their relative frequency.— *Eur. J. Immunol.*, 1976, v. 6, p. 150.
- Beverly P., Woody J., Dunkley M., et al. Separation of suppressor and killer T-cells by surface phenotype.— *Nature*, 1976, v. 202, p. 495.
- Biberfeld P. Endocytosis and lysosome formation in blood lymphocytes transformed by phytohemagglutinin.— *J. Ultrastr. Res.*, 1971, v. 37, p. 41.
- Biberfeld P., Johansson A. Contact areas of cytotoxic lymphocytes and target cells: an electron microscopic study.— *Exptl. Cell Res.*, 1975, v. 94, p. 79.
- Binz H., Frischknecht H., Mercolli C., et al. Binding of purified, soluble major histocompatibility complex polypeptide chains onto isolated T cell receptors.— *J. Exptl. Med.*, 1979, v. 150, p. 1084.

- Birnbaum G., Swiek L. Human suppressor lymphocytes induction and characterization.— *Cell. Immunol.*, 1978, v. 40, p. 16.
- Blank K. J., Freedman H. A., Lilly F. T-lymphocyte response to Friend virus-induced tumor cell lines in mice of strains congenic at H-2c.— *Nature*, 1976, v. 260, p. 250.
- Blomgren H., Anderson B. Evidence for a small pool of immunocompetent cells in the mouse thymus.— *Exptl. Cell. Res.*, 1969, v. 57, p. 185.
- Bloom B. R., Stoner G., Shevach E. e. a. Production of migration inhibitory factor and lymphotoxin by non-T cells.— *Eur. J. Immunol.*, 1975, v. 5, p. 218.
- Bohmer H., Haas W. Distinct Ir-genes for helper and killer cells in the cytotoxic response to H-2 antigen.— *J. Exptl. Med.*, 1979, v. 150, p. 1134.
- Bohmer H., Haas W., Pohlitz H. e. a. T-cell clones: their use for the study of specificity, induction and effector-function of T-cells. *Springer Semin.— Immunopathol.*, 1980, v. 3, p. 23.
- Bolender R. P., Weibel E. R. Amorphometric study of the removal of phenobarbital-induced membranes from hepatocytes after cessation of treatment.— *J. Cell. Biol.* 1973, v. 56, p. 746.
- Bonavida B. Concanavalin A-mediated activation of antigen-primed lymphocytes into secondary cytotoxic lymphocytes.— *J. Exptl. Med.*, 1977, v. 145, p. 293.
- Bonavida B., Kedar E. Transplantation of allogeneic lymphoid cells specifically depleted of graft versus host reactive cells.— *Nature*, 1974, v. 249, p. 658.
- Borum K. Influence of neonatal thymectomy on the development of primary Rous sarcomas in two inbred strains of rats.— *Lymphology*, 1971, v. 4, p. 150.
- Bouteille M. Marquage simultané des protéines (anticorps) et de L'incorporation d'acides anunés (leucine) par cytochimie et autoradiographie ultrastructurales dans les plasmocytes de Lapin.— *Biol. cellulaire*, 1970, v. 271. p. 1697.
- Boyer P. J. J., Fahey J. L. Stimulation of lymphoid cells from normal and immune mice by syngeneic BALB/c plasma cell tumors.— *J. Immunol.*, 1976, v. 116, p. 202.
- Boyse E. A., Itakura K., Stockert E. e. a. A third locus specifying alloantigens expressed only on thymocytes and lymphocytes.— *Transplantation*, 1971, v. 11, p. 351.
- Boyse E. A., Miyazawa M., Aoki T., e. a. Ly-A and Ly-B: Two systems of lymphocyte isoantigens in the mouse.— *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)* v. 170, p. 175.
- Boyse E. A., Old L. J., Chouroulinkov I. Cytotoxic test for the demonstration of mouse antibody.— *Methods Med. Res.*, 1964, v. 10, p. 39.
- Boyse E. A., Old L. Some aspects of normal and abnormal cell surface genetics.— *Ann. Rev. Gen.*, 1969, v. 3, p. 276.
- Boyse E. A., Stockert E., Old L. J. Properties of four antigens specified by the Tla locus. Similarities and differences.— In: Rose N. R., Milgrom F. eds. *International convocation on immunology*. Karger, Basel, 1969, p. 353.
- Braunsteiner H., Fellingner K., Pakesch F. Demonstration of a cytoplasmic structure in plasma cells.— *Blood*, 1953, v. 8, p. 916.
- Brondz B. D. Complex specificity of immune lymphocytes in allogeneic cell cultures.— *Folia Biol. (Prague)*, 1968, v. 14, p. 115.
- Brondz B. D., Karaulov A. V., Abronina G. E. e. a. Biological, immunological and genetic characterization of specific suppressor T-cells and their of receptors immune to antigens of the H-2 complex, clonal, structure, narrow specificity of receptors and genetic restriction for specific T — suppressor function.— *Molecular Immunology*, 1980, v. 17, p. 833.
- Brondz B. D., Snegiröva A. F. Effect of some enzymes, polysaccharides, and lysosome — active drugs on interaction of immune lymphocytes with al-

- logeneic target cells.— In: Progress in Immunology/Ed. Amos. N. Y.: Acad. Press, 1971, v. 1, p. 447.
- Brondz B. D., Snegiröva A. F., Basulin J. A. e. a. Modification of in vitro immune lymphocyte-target cell interaction by some biologically active drugs.— Immunochimistry, 1973, v. 10, p. 175.
- Brown E. M., Gardner D. G., Aurbach G. D. Effects of the calium Ionophore A23187 on dispersed bovine parathyreoid cells.— Endocrinology, 1980, v. 106, p. 133.
- Brunner K. T., McDonald H. R., Cerrotini J. C. Antigenic specificity of the cytolytic T-lymphocyte (CTL) response to murine sarcoma virus-induced tumors. II. Analysis of the clonal progeny of CTL precursors stimulated in vitro with syngeneic tumors cells.— J. Immunol., 1980, v. 124, p. 1627.
- Brunner K. T., Mauel J., Cerottini J. C. e. a. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ⁵¹Cr labeled allogeneic target cells in vitro inhibition by isoantibody and by drugs.— Immunology, 1968, v. 14, p. 181.
- Brunner K. T., Mauel J., and Schindler R. In vitro studies of cell-bound immunity; cloning assay of the cytotoxic action of sensitized lymphoid cells on allogeneic target cells.— Immunology, 1966, v. 11, p. 499.
- Buffit R. F., Ito M., Cairo A. M. e. a. Antiproliferative activity of highly purified mouse interferon: Brief communication.— J. Natl. Cancer Inst., 1978, v. 60, p. 243.
- Burakoff S. J., Martz E., Benacerraf B. Is the primary complement lesion insufficient for lysis? Failure of cells damaged under osmotic protection to lyse in EDTA or at low temperature after removal of osmotic protection.— Clin. Immunol. Immunopathol., 1975, v. 4, p. 108.
- Burnet F. M. The concept of immunological surveillance.— In: Progr. Exp. Tumor Res. Karger — Basel — München — New York, 1970, v. 13, p. 1.
- Burwell R. G., Gowland G. Lymph node reactivity to homografts of cancellous bone.— Nature, 1960, v. 188, p. 159.
- Burwen S. J., Satir H. B. Plasma membrane folds on the mast cell surface and their relationship to secretory activity.— J. Cell Biol., 1977, v. 74, p. 690.
- Bykovskaya S. N., Rytenko A. N., Rauschenbach M. O. e. a. Ultrastructural alteration of cytolytic T-lymphocytes following their interaction with target cells. I. Hypertrophy and change of orientation of the Golgi apparatus.— Cell. Immunol., 1978a, v. 40, p. 164.
- Bykovskaya S. N., Rytenko A. N., Rauschenbach M. O. e. a. Ultrastructural alteration of cytolytic T-lymphocytes following their interaction with target cells. II. Morphogenesis of secretory granules and intracellular vacuoles.— Cell Immunol., 1978b, v. 40, p. 175.
- Bykovskaya S. N., Rytenko A. N., Rauschenbach M. O. e. a. Ultrastructural alteration of cytolytic T-lymphocytes following their interaction with target cells. III Plasmalemma. membranosomas.— Cell Immunol., 1979, v. 42, p. 197.
- Bykovskaya S. N., Sergeev A. V., Rauschenbach M. O. e. a. The ultrastructure of the tubular complex in the cytoplasm of cytolytic T-lymphocytes.— Scand. J. Immunol., 1980, v. 11, p. 261.
- Bykovskaya S. N., Rauschenbach M. O. Antigen-dependent differentiation of effector T-lymphocytes.— In: Adv. Comp. Leukemia Res./Ed. by Lapin B. 1980.
- Cantor H., Asofsky R. Synergy among lymphoid cell mediating the graft — versus host response. III Evidence for interaction between two types of thymus derived cells.— J. Exptl. Med., 1972, v. 135, p. 764.
- Cantor H., Boyse E. A. Functional subclasses of T-lymphocytes bearing different Ly-antigens I-Generation of functionally distinct T cell subclasses in a differentiative process independent of antigen.— J. Exptl. Med., 1975a, v. 141, p. 1376.

- Cantor H., Boyse E. A. Functional subclasses of T-lymphocytes bearing different Ly antigens. II. Cooperative between subclasses of Ly + cells in the generation of killer activity.— *J. Exptl. Med.*, 1975, v. 141, p. 1390.
- Cantor H., Boyse E. Regulation of cellular and humoral immune responses by T cell subclasses, Cold Spring Harbor — Symp. Quant. Biol., 1977a, v. 41, p. 23.
- Cantor H., Boyse E. Lymphocytes as models for the study of mammalian cellular differentiation.— *Immunol. Rev.*, 1977b, v. 33, p. 105.
- Cantor H., Hugenberg J., McVay-Bondrean L., e. a. Immunoregulatory circuits among T cell sets. Identification of a subpopulation of T-helper cells that induces feed-back inhibition.— *J. Exptl. Med.*, 1978, v. 148, p. 871.
- Cantor H., Jandinski J. The relationship of cell division to the generation of cytotoxic activity on mixed lymphocyte culture.— *J. Exptl. Med.*, 1974, v. 140, p. 1712.
- Cantor H., Kasai M., Shen F. W., e. a. Immunogenetic analysis of «Natural killer» activity in the mouse.— *Immunol. Rev.*, 1979, v. 44, p. 3.
- Cantor H., Shen T. W., Boyse E. A. Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly-components. II. Activation by antigens, after immunization, antigen specific suppressor and helper activities are mediated by distinct T cell subclasses.— *J. Exptl. Med.*, 1976, v. 143, p. 1391.
- Cantor H., Simpson E. Regulation of the immune response by subclasses of T lymphocytes. I Interaction between pre-killer T cells and regulatory T cells obtained from peripheral lymphoid tissue of mice.— *Eur. J. Immunol.*, 1975, v. 5, p. 330.
- Canty T. G., Wunderlich. Quantitative in vitro assay of cytotoxic cellular immunity.— *J. Natl. Cancer Inst.*, 1970, v. 45, p. 761.
- Capaldi R. A. A dynamic model of cell membranes.— *Sci. America*, 1974, v. 230, p. 27.
- Cepellini R., Franceshini P., Miggiano V. C. e. a. Directional activation of mixed lymphocyte cultures.— In: *Histocompatibility testing*. Munksgaard. Copenhagen, 1965, p. 225.
- Cerottini J.—C., Brunner K. T. Cell — mediated cytotoxicity, allograft rejection and tumor immunity.— *Adv. Immunol.*, 1974, v. 18, p. 67.
- Cerottini J. C., Brunner K. T. Mechanism of T and B cell — mediated cytotoxicity. Immune recognition/Ed. by F. Loores and G. E. Roelants Wiley and Sons. England, 1977, p. 319.
- Cerottini J. C., McDonald H. R., Engers H. D. e. a. Determination pathway of cytolytic T-lymphocytes: in vivo and in vitro studies.— *Progr. in Immunol.*, 1974, v. 11, p. 153.
- Chandler D. E., Heuser J. Membrane fusion during secretion cortical granule exocytosis in sea urchin eggs as studied by quickfreezing and freeze fracture.— *J. Cell Biol.*, 1979, v. 83, p. 91.
- Chandler D. E., Heuser J. E. Arrest of membrane fusion events in mast cells by quick — freezing.— *J. Cell Biol.*, 1980, v. 86, p. 666.
- Cheers C., Sprent J., Miller J. F. A. P. Interaction of thymus lymphocytes with histocompatible cells. IV. Mixed lymphocyte reactions of activated thymus lymphocytes.— *Cell Immunol.*, 1974, v. 10, p. 57.
- Chen D. M., Di Sabato G. Further studies on the thymocyte stimulating factor.— *Cell Immunol.*, 1976, v. 22, p. 211.
- Chi E. Y., Lagunoff D., Koehler J. K. Freeze — fracture study of mast cell secretion.— *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1976, v. 73, p. 2823.
- Cioli D., Lennox E. S. Immunoglobulin nascent chains on membrane bound ribosomes of myeloma cells.— *Biochemistry*, 1973, v. 12, p. 3211.
- Clark W., Nedrud J. Effect of BUdR on proliferation and development of cytotoxicity in mixed leukocyte culture.— *Cell Immunol.*, 1974, v. 10, p. 159.
- Cohen G., Douglas S. G., König E. e. a. Acid phosphatase cytochemistry of mitogen — transformed normal and chronic lymphocytic leukemia lymphocytes.— *Exptl. Cell Res.*, 1973, v. 80, p. 297.

- Cohen L., Howe M. L. Cynergism between subpopulations of thymus-derived cells mediating the proliferative and effector phases of the mixed lymphocyte reaction.— *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973, v. 70, p. 2702.
- Cone R. E., Marchalonis J. J., Rolley R. T. Lymphocyte membrane dynamics. Metabolic release of cell surface proteins.— *J. Exptl. Med.*, 1971, v. 134, p. 1373.
- Cooley M. Effect of in vivo exposure to allogeneic cells upon subsequent in vitro T-cell responses and upon allograft rejection.— *Scand. J. Immunol.*, 1978, v. 7, p. 371.
- Courdi A., Malaise E. Lymph node metastases of EMT6 tumor in nude mice.— *Experientia*, 1979, v. 35, p. 1499.
- Coutinho A., Larsson E. L., Grönvik, e. a. Studies on T-lymphocyte activation. II The target cells for Con A-induced growth factors.— *Eur. J. Immunol.*, 1979, v. 9, p. 587.
- Creitz C. E., Pozoles C. J., Pollard H. P. Self-association of synexin in the presence of calcium. Correlation with synexin-induced membrane fusion and examination of the structure of synexin aggregates.— *J. Biol. Chem.*, 1979, v. 254, p. 553.
- Dameshek W. «Immunoblasts» and «Immunocytes» an attempt at a functional nomenclature.— *Blood*, 1963, v. 21, p. 243.
- Dauwander M., Whaley W. G., Kephart J. E. Functional aspects of the Golgi apparatus.— *Sub-Cell. Biochem.*, 1972, v. 1, p. 225.
- Davidson W. F. Cellular requirements for the induction of cytotoxic T-cells in vitro.— *Immunol. Rev.*, 1977, v. 35, p. 263.
- Defendi V., Roosa R. A. The role of the thymus in carcinogenesis.— In: *The thymus*/Ed. Defendi V.; Metcalf M., Philadelphia, Wistar Institute Press, 1964, p. 121.
- Delovitch T. L., McDevitt H. O. In vitro analysis of allogeneic lymphocyte interaction. I. Characterization and cellular origin of an Ia-positive helper factor allogeneic effect factor.— *J. Exptl. Med.*, 1977, v. 146, p. 1019.
- Delovitch T. L., Sohn U. In vitro analysis of allogeneic lymphocyte interaction. III Generation of a helper allogeneic effect factor (AEF) across an I — J subregion disparity.— *J. Immunol.*, 1979, v. 122, p. 1528.
- Dennert G. Cytolytic and proliferative activity of permanent T killer cell line.— *Nature*, 1979, v. 81, p. 476.
- McDevitt H. O., Delovitch T. L., Press J. L., e. a. Genetic and functional analysis of the Ia-antigens: their possible role in regulating the immune response.— *Transplant. Rev.*, 1976, v. 30, p. 81.
- Doherty P. C., Blanden R. V., Zinkernagel R. M. Specificity of virus-immune effector T-cells for H-2K and H-2D compatible interactions: implications for H-antigen diversity.— *Transplant. Rev.*, 1975, v. 29, p. 89.
- McDonald H. R. Energy metabolism and T cell-mediated cytotoxicity II. Selective inhibition of cytotoxicity by 2-deoxy-D-glucose.— *J. Exptl. Med.*, 1977, v. 146, p. 710.
- McDonald H. R., Cerottini J. C., Brunner K. T. Generation of cytotoxic T-lymphocytes in vitro. III Velocity sedimentation studies of the differentiation and fate of effector cells in longmixed leucocyte culture.— *J. Exptl. Med.*, 1974, v. 140, p. 1511.
- McDonald H. R., Cerottini J. C., Ryser Y. E., e. a. Quantitation and cloning of cytolytic T-lymphocytes and their precursors.— *Immunol. Rev.*, 1980, v. 51, p. 93.
- McDonald H. R., Engers H. D., Cerottini J. C. e. a. Generation of cytotoxic T-lymphocytes in vitro. II. Effect of repeated exposure to alloantigens on the cytotoxic activity of long-term mixed leucocyte cultures.— *J. exptl. Med.*, 1974, v. 140, p. 718.
- McDonald H. R., Lees R. K., Dissociation of differentiation and proliferation in the primary induction of cytolytic T lymphocytes by alloantigens.— *J. Immunol.*, 1980, v. 124, p. 1308.
- McDonald H. R., Phillips R. A., Miller R. G. Allograft immunity in the mouse. II. Physical studies of the development of cytotoxic effector cells from their immediate progenitors.— *J. Immunol.*, 1973, v. 111, p. 575.

- McDonald H. R., Sordat B., Cerottini J. C. e. a. Generation of cytotoxic T lymphocytes in vitro. IV. Functional activation of memory cells in the absence of DNA synthesis.— *J. Exptl. Med.*, 1975, v. 142, p. 622.
- Durda P. J., Shapiro C., Gottlieb P. D. Partial molecular characterization of the Ly-1 alloantigen on mouse thymocytes.— *J. Immunol.*, 1978, v. 120, p. 53.
- Eardley D., Hugenberger J., Movay-Bondrean L., e. a. Immunoregulatory circuits among T-cell sets. I. T-helper cells induce other T-cell sets to exert feed-back inhibition.— *J. Exptl. Med.*, 1978, v. 147, p. 1106.
- East J., Harvey J. J. The differential action of neonatal thymectomy in mice infected with murine sarcoma virus — Harvey (MSV-H). *Int. J. Cancer*, 1968, v. 3, p. 614.
- Eccles S., Styles J., Hobbs S., e. a. Metastasis in the nude rat associated with lack of immune response.— *Brit. J. Cancer.*, 1979, v. 40, 5, p. 803.
- Edidin M., Henney C. S. The effect of capping H-2 antigens on the susceptibility of target cells to humoral and T-cell mediated lysis.— *Nature, New Biol.*, 1973, v. 246, p. 47.
- Eggers A., Wunderlich J. Suppressor cells in tumor — bearing mice capable of nonspecific blocking of in vitro immunization against transplant antigens.— *J. Immunol.*, 1976, v. 114, p. 1554.
- Eisenthal A., Nachtigal D., Feldman M. Induction of allospecific suppressor T cells in vitro.— *Cell Immunol.*, 1977, v. 34, p. 112.
- Elliott B. E., Nagy Z., Nabholz M., e. a. Antigen recognition by T-cells activated in the mixed lymphocyte reaction: specific binding of allogeneic cell material after removal of surfacebound antigen by trypsin.— *Eur. J. Immunol.*, 1977, v. 7, p. 287.
- Ellner J., Spagnuolo P. Suppression of antigen and mitogen induced human T-lymphocytes DNA synthesis by bacterial lipopolysaccharide: mediation by monocyte activation and production of prostaglandins.— *J. Immunol.*, 1979, v. 123, p. 2689.
- Elves M. W., Gough J., Chapman J. A. e. a. Electron microscopy studies of lymphocytes. Transformation under influence of phytohemagglutinin.— *Lancet*, 1964, v. 1, p. 306.
- McEndy D. P., Boon M. C., Furth J. On the role of thymus, spleen and gonads in the development of leukemia in a highleukemia stock of mice.— *Cancer Res.*, 1974, v. 4, p. 377.
- Engers H. D., Thomas K., Cerottini J. C., e. a. Generation of cytolytic T-lymphocytes in vitro. V. Response of normal and immune spleen cells to subcellular allogeneic antigen.— *J. Immunol.*, 1975, v. 115, p. 356.
- Ericson L. E. Vinblastine-induced inhibition of protein transport in the mouse thyroid in vivo.— *Endocrinology*, 1980, v. 106, p. 833.
- Farrar J. J. The xenogeneic effect of antigen and mitogen — stimulated human lymphocytes produce a non. antigen-specific factor which reconstitutes the antibody responses of T-cell deficient mouse spleen cells.— *J. Immunol.*, 1975, v. 115, p. 1295.
- Farrar J. J., Koopman W. J. Characterization of macrophage and lymphocyte — derived mitogenic factors and their effect on the antibody response in vitro.— In: *Biology of the lymphokines.*/Ed. by S. Cohen. E. Pick, J. J. Oppenheim. N. Y.: Acad. Press.
- Farrar J. J., Simon P. L., Koopman W. J. e. a. Biochemical relationship of thymocyte mitogenic factor and factors enhancing humoral and cell mediated immune responses.— *J. Immunol.*, 1978, v. 121, p. 1355.
- Fathman C. G., Cone J. L., Scharrow S. O. e. a. Ia-alloantigens detected on thymocytes by use of a fluorescence-activated cell sorter.— *J. Immunol.*, 1975, v. 115, p. 584.
- Fathman C. G., Hengartner H. Clones of alloreactive T-cells.— *Nature*, 1972, v. 272, p. 617.
- Fathman C. G., Small M., Herzenberg L. A., e. a. Thymus cell maturation. II Differentiation of three «mature» subclasses in vivo.— *Cell Immunol.*, 1975, v. 15, p. 109.

- Fawcett D. W. Physiologically significant specializations of the cell surface.— *Circulation*, 1962, v. 26, p. 1105.
- Ferluga J., Allison A. C. Cytotoxicity of isolated plasma membranes from lymphonode cells.— *Nature*, 1975, v. 255, p. 708.
- Ferluga J., Asherson G. L., Becker E. L. The effect of organophosphorus inhibitors p-nitrophenol and cytochalasin B on cytotoxic killing of tumor cells by immune spleen cells, and the effect of shaking.— *Immunology*, 1972, v. 23, p. 577.
- Festenstein H. Pertinent features of M locus determinants including revised nomenclature and strain distribution.— *Transplantation*, 1974, v. 18, p. 555.
- Filder I., Gersten M., Riggs W. Quantitative analysis of tumor host interaction and the outcome of experimental metastasis.— In: *Cancer Invasion and metastasis: Biologic mechanisms and therapy*/Ed. by S. B. Day. N. Y., 1977, p. 277.
- Finke J. H., Orosz C. G., Battisto J. R. Splenic T-killer cells can be generated by allogeneic thymic cells in conjunction with assisting factor.— *Nature (Lond.)*, 1977, v. 267, p. 353.
- Finke J. H., Ponzio N. M., Battisto J. R. Isogeneic and allogeneic lymphocyte interactions may be controlled by cell surface. Immunoglobulin tropism.— *Cell Immunol.*, 1976, v. 26, p. 284.
- Finn O. J., Boniver J., Kaplan H. S. Induction, establishment in vitro, and characterization of functional, antigen-specific, carrier-primed murine T-cell lymphomas.— *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, v. 76, p. 4033.
- Fishelson L., Berke G. T-lymphocyte-mediated cytolysis. Dissociation of the binding from the lytic mechanism of the effector cells.— *J. Immunol.*, 1978, v. 120, p. 1121.
- Fitch F. W., Roseman J. M., Rowley D. A. Cell espersion as a requirement for antibody release in vitro.— *Nature*, 1968, v. 218, p. 972.
- Flanagan S. Nude, a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse.— *Genet. Res., Camb.*, 1966, v. 8, p. 295.
- Fogel M., Gorelik E., Segal S., e. a. Demonstration of antigenic differences between a local tumor of Lewis lung carcinoma (3LL) and its pulmonary metastases. III. Different susceptibility to NK cells activity.— *Isr. J. med. Sci.*, 1979, v. 15, p. 885.
- Ford W. L., Simmonds S. I., Atkins R. C. Early cellular events in a systemic graft — host reaction. II. Autoradiographic estimates of the frequency of donor lymphocytes which respond to each Ag-B-determined antigenic complex.— *J. Exptl. Med.*, 1975, v. 141, p. 681.
- Forman J., Klein J. Analysis of H-2 mutants: Evidence for multiple CML target specificities controlled by the H-2Kb gene.— *Immunogenetics*, 1975a, v. 1, p. 469.
- Forman J., Klein J. Immunogenetic analysis of H-2 mutants. II. Cellular immunity to the H-2da mutation.— *J. Immunol.*, 1975b, v. 115, p. 711.
- Forman J., Möller G. Generation of cytotoxic lymphocytes in mixed lymphocyte reactions. II. Importance of private and public H-2 alloantigens on the expression of cytotoxicity.— *Immunogenetics*, 1974, v. 3, p. 211.
- Foulds L. The experimental study of tumor progression: a review.— *Cancer Res.* 1954, v. 14, p. 327.
- Franke W. W., Scheer U. Structural details of dictyosomal pores.— *J. Ultrastruct. Res.*, 1972, v. 40, p. 132. Frey — Wyssling A. Comparative organellography of the cytoplasm Springer — Verlag Wien — New York, 1973.
- Fridman W., Fradelizi A., Quinezanes C., e. a. The role of the Fc receptor (Fc R) of thymus-derived lymphocytes. II. Presence of FcR on suppressor cells and direct involvement in suppression.— *Eur. J. Immunol.*, 1977, v. 7, p. 349.
- Friedman H. I., Cardell R. R. Jr. Effects of puromycin on the structure of rat intestinal epithelial cells during fat absorption.— *J. Cell Biol.*, 1972, v. 52, p. 15.

- Frye L. D., Friou G. J. Inhibition of mammalian cytotoxic cells by phosphatidylcholine and its analogue.— *Nature*, 1975, v. 258, p. 333.
- Fujimoto S., Greene M. L., Schom A. H. Regulation of the immune response to tumor antigens. I. Immunosuppressor cells in tumorbearing hosts.— *J. Immunol.*, 1976, v. 116, p. 791.
- Fumarola D., Giordano D. Influenza della timectomia e della ipertimoraxione sulla insorgenza e sullo sviluppo del sarcoma de 3—4 debsopirene del ratto.— *Tumori*, 1962, v. 48, p. 5.
- Furth J. Prolongation of life with prevention of leukemia by thymectomy in mice.— *J. Gerontol.*, 1946, v. 1, p. 46.
- Gately M. K., Mayer M. M., Henney C. S. Effect of anti-lymphotoxin on cell-mediated cytotoxicity: evidence for two pathways, one involving lymphotoxins and the other requiring internate contact between the plasma membrane of killer and target cells.— *Cell Immunol.*, 1976, v. 23, p. 82.
- Gaugas J. M., Allison A. C., Chesterman F. C. e. a. Immunological control of polioma virus oncogenesis in mice.— *Brit. J. Cancer*, 1973, v. 27, p. 10.
- Gautvik K. M., Tashjian A. H. Effects of cations and colchicine on the release of prolactin and growth hormone by functional pituitary tumor cells in culture.— *Endocrinology*, 1973, v. 93, p. 793.
- Germain R., Benacerraf B. Antigen specific T cell — mediated suppression. III. Subaction of antigen-specific-suppressor T cells (T_{s2}) in l-glutamine acid⁶⁰-l-alanine³⁰ l-tyrosine¹⁰(GAT) responder mice by nonresponder-derived GAT-suppressor factor (GAT — TsF).— *J. Immunol.*, 1978, v. 121, p. 608.
- Germain R., Theze J., Kapp J. e. a. Antigen-specific T-cell-mediated suppression. I. Induction of l-glutamine acid⁶⁰-l-alanine³⁰-l-tyrosine⁶⁰-specific suppressor T cells in vitro requires both antigen-specific T-cell suppressor factor and antigen.— *J. Exptl. Med.*, 1978, v. 147, p. 123.
- Germain R., Vu S. T., Kipps T., e. a. Shared idiotypic determinants on antibodies and T-cell derived suppressor factor specific for the random polymer l-glutamine acid⁶⁰-l-alanine³⁰-l-tyrosine.— *J. Exptl. Med.*, 1979, v. 149, p. 613.
- Gershon R. T-cell control of antibody production.— In: *Contemp. Top. in Immunobiol*/Ed. by Cooper M., Warner N. Plenum. V. 3. N. Y., 1974, p. 1.
- Gershon R. K., Gery I., Waksman B. H. Suppressive effects of in vivo immunization on PHA responses in vitro.— *J. Immunol.*, 1974, v. 112, p. 215.
- Gershon R. K., Liebhaver S., Rya S. T-cell regulation of T-cell responses to antigen.— *Immunology*, 1974, v. 26, p. 909.
- Gershon R. K., Maurer P. H., Merryman C. F. A cellular basis for genetically controlled immunologic unresponsiveness in mice: tolerance induction in T-cells.— *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973, v. 70, p. 250.
- Gershwin E., Ikeda R. Immunology of heterotransplanted human tumors in nude mice.— *J. Natl. Cancer Inst.*, 1977, v. 58, p. 1455.
- Gershwin E., Ikeda R. DMBA induced papillomas in congenitally athymic (nude) and hereditary asplenic (Dh/+) mice. Contrasts and comparisons with immunologically intact littermates.— In: *Developm. and Compar Immunol.*, 1978, v. 2, p. 529.
- Gery I., Handschumacher R. E. Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. III. Properties of the mediator (s) from adherent cells.— *Cell Immunol.*, 1974, v. 11, p. 162.
- Gillespie E., Levine R. J., Malavista S. E. Histamine release from rat peritoneal mast cells: inhibition by colchicine and potentiation by deuterium oxide.— *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1968, v. 164, p. 158.
- Gillette R. W. Studies of the T-lymphocytes resident in the spleens of thymectomized, irradiated bone-marrow-reconstituted (TXB) mice.— *Cell Immunol.*, 1976, v. 27, p. 200.
- Gillis S., Baker P. E., Ruscetti F. W., e. a. Long-term culture of human antigen-specific cytotoxic T-cell lines.— *J. Exptl. Med.*, 1978, v. 148, p. 1093.

- Gillis S., Grabtree G. R., Smith K. A. Glucocorticoid — induced inhibition of T-cell growth factor production. II. The effect on the in vitro generation of cytolytic T-cells.— *J. Immunol.*, 1979, v. 123, p. 1623.
- Gillis S., Ferm M. M., Wu O., e. a. T-cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity.— *J. Immunol.*, 1978, v. 120, p. 2027.
- Gillis S., Smith K. A. Long-term culture of tumor-specific cytotoxic T-cells. *Nature*, 1977a, v. 268, p. 154.
- Gillis S., Smith K. A. In vitro generation of tumor specific cytotoxic lymphocytes. Secondary allogeneic mixed tumor lymphocytes culture of normal murine spleen cells.— *J. Exptl. Med.*, 1977b, v. 146, p. 468.
- Gillis S., Smith K. A., Watson J. Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. II. Purification of a class of rat and human lymphokines.— *J. Immunol.*, 1980, v. 124, p. 1954.
- Ginsburg H. Graft-versus-host reaction in tissue culture. I. Lysis of monolayers of embryo mouse cells from strains differing in the H-2 histocompatibility locus by rat lymphocytes sensitized in vitro.— *Immunology*, 1968, v. 14, p. 621.
- Giovanella B., Stehlin I., Williams L. Heterotransplantation of human malignant tumors in «nude» mice. II. Malignant tumors induced by injection of cell cultures derived from solid tumors.— *J. Nat. Cancer Inst.* 1974, v. 52, p. 921.
- Gisler R., Fridman W. Inhibition of the in vitro 19S and 7S antibody response by immunoglobulin — binding factor (IBF) from alloantigen-activated T-cells.— *Cell Immunol.*, 1976, v. 23, p. 99.
- Glaserbrook A. L. Conjugate formation by primary and secondary populations of murine immune T-lymphocytes.— *J. Immunol.*, 1978, v. 121, p. 1870.
- Glaserbrook A., Fitch F. T-cell lines which cooperate in generation of specific cytolytic activity.— *Nature*, 1979, v. 278, p. 171.
- Gleichman H., Gleichman E. Immunosuppression and neoplasia. I. A critical review of experimental carcinogenesis and immunosurveillance theory.— *Klin. Wschr.*, 1973, v. 51, p. 255.
- Goding J. W., White E., Marchalonis J. J. Partial characterisation of Ia-antigens on murine thymocytes.— *Nature*, 1975, v. 257, p. 230.
- Golstein P. Sensitivity of cytotoxic T-cells to T cell-mediated cytotoxicity.— *Nature*, 1974, v. 252, p. 81.
- Golstein P., Smith E. T. The lethal hit stage of mouse T-and non-T cell-mediated cytotoxicity: differences in cation requirements and characterization of an analytical «Cation pulse» method.— *Eur. J. Immunol.*, 1976, v. 6, p. 31.
- Golstein P., Smith E. T. Mechanism of T-cell mediated cytotoxicity: the lethal hit stages.— *Contemp. Top. Immunobiol.*, 1977, v. 7, p. 273.
- Golstein P., Svedmyr E. A. J., Blomgren H. Specific adsorption of cytotoxic thymus-processed lymphocytes (T-cells) on glutaraldehyde-fixed fibroblast monolayers.— *Eur. J. Immunol.*, 1972, v. 2, p. 380.
- Golstein P., Svedmyr E. A. J., Wigzell H. Cells mediating specific in vitro cytotoxicity. I. Detection of receptor bearing lymphocytes.— *J. Exp. Med.*, 1971, v. 134, p. 1385.
- Gorzynski R. M., Tigelaar R. E. Cell-mediated immunity to murine tumor allografts. Increase in the activities of activated thymus— derived cells following in vitro incubation.— *Cell Immunol.*, 1975, v. 18, p. 121.
- Gordon J., Sagman U., Rode H. Prolonged exposure to antigen induces specific unresponsiveness of mixed leukocyte culture-activated cells.— *Eur. J. Immunol.*, 1980, v. 10, p. 66.
- Goward E., Duprez V., Reme T. e. a. Exclusive involvement of H-2Db or H-2Kd product in the interaction between T-killer lymphocytes or syngeneic H-2b or H-2d viral lymphomas.— *J. Exptl. Med.*, 1977, v. 146, p. 909.
- Graham S., Mickey D., Paulson D. Detecting metastatic tumors in nude mice.— *J. Nat. Cancer Inst.*, 1978, 60, p. 715.

- Granger G. A., Daynes R. A., Runge P., e. a. Lymphocyte effector molecules and cell mediated immune reactions. *Contemp. Top. in Molecular Immunol.* Ed. by F. P. Inman, W. J. Mandy. Plenum Publ. Corp. N. Y., 1975, v. 4, p. 205.
- Granger G. A., Kolb W. P. Lymphocyte in vitro cytotoxicity. Mechanisms of immune and non-immune small lymphocyte mediated target cell destruction.— *J. Immunol.*, 1968, v. 101, p. 111.
- Granger G. A., Moore G. E., White J. G. e. a. Production of lymphotoxin and migration inhibitory factor by established human lymphocytic cell lines.— *J. Immunol.*, 1970, v. 104, p. 1476.
- Granger C. A., Yamamoto R. S., Fair D. S. e. a. The Human LT system. I. Physical-chemical heterogeneity of LT molecules released by mitogen activated human lymphocytes in vitro.— *Cell Immunol.*, 1978, v. 38, p. 388.
- Grant G. A., Miller J. P. A. P. Effect of neonatally thymectomy on the induction of sarcoma in C57B1 mice.— *Nature*, 1965, v. 205, p. 1124.
- Grant G. A., Roe F. J. C. Effect of gormfree status and antilymphocyte serum on induction of various tumors in mice by a chemical carcinogen given in birth.— *Nature*, 1969, v. 223, p. 1060.
- Gresser I. On the varied biologic effects of interferon.— *Cell Immunol.*, 1977, v. 34, p. 406.
- Grimm E., Bonavida B. Mechanism of cell — mediated cytotoxicity at the single cell level. I. Estimation of cytotoxic T-lymphocyte frequency and relative lytic efficiency.— *J. Immunol.*, 1979, v. 123, p. 2861.
- Grimm E., Price Z., Bonavida B. Studies on the induction and expression of T-cell-mediated immunity. VIII. Effector target junctions and target cell membrane disruption during cytolysis.— *Cell Immunol.*, 1979a, v. 46, p. 77.
- Grimm E. A., Thoma J. A., Bonavida B. Mechanism of cell-mediated cytotoxicity at the single cell level. II. Evidence for first-order kinetics of T cell-mediated cytolysis and for heterogeneity of lytic rate.— *J. Immunol.*, 1979b, v. 123, p. 2870.
- Grönvic K.— O., Andersson I. The role of T-cell growth stimulating factor in T-cell triggering.— *Immunol. Rev.*, 1980, v. 51, p. 35.
- Gross L. Effect of thymectomy on development of leukemia in C3H mice inoculated with leukemic «Passage» virus.— *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.*, 1959, v. 100, p. 325.
- Gruntenko E. V. Influence of immunosuppression on the growth of transplants of spontaneous mammary tumors in mice.— *Folia Biol.*, 1973, v. 18, p. 414.
- Gruntenko E. V. Immunological aspects of neoplastic growts.— In: *Modeling and optimisation of complex systems*. Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg. N. Y., 1979, p. 95.
- Gruntenko E. V., Matienko N. A. Effect of Bittner virus on the immune response C3H/He and BALB/c mice and Spaque — Dawly rats.— In: *12th meeting on mammary cancer in experimental animals and man*. Maastricht, 1980, p. 52.
- Habener J. F., Stevens T. D., Ravazzola T. e. a. Effect of calcium ionophores on the synthesis and release of parathyroid hormone.— *Endocrinology*, 1977, v. 101, p. 1524.
- McHado E., Lair S., Gregory R. Spontaneous fibrosarcoma in a thymus — transplanted nude mice.— *J. Nat. Cancer Inst.*, 1977, v. 58, p. 1863.
- Hakura K., Hutton J., Boyse E., e. a. Genetic linkage relationships of loci specifying differentiation alloantigens in the mouse.— *Transplantation*, 1972, v. 13, p. 239.
- Hämmerling G. J., Deak B. D., Mauve G. e. a. B lymphocyte alloantigens controlled by the I-region of the major histocompatibility complex in mice.— *Immunogenetics*, 1974, v. 1, p. 68.
- Hämmerling U., Mack C., Pickel H. Immunofluorescence studies of Ig determinants of mouse thymocytes and T-cell.— *Immunochemistry*, 1976, v. 13, p. 525.

- Harrison M. R. Thymus independent stimulator cells in the mixed lymphocyte reaction.— *J. Immunol.*, 1973, v. 111, p. 1270.
- Haynes B. F., Fauci A. S. Mechanisms of corticosteroid action on lymphocyte subpopulations. IV. Effect of in vitro hydrocortisone on naturally occurring and mitogen-induced suppressor cells in man.— *Cell. Immunol.*, 1979, v. 44, p. 157.
- Haynes B. F., Katz P., Fauci A. S. Mechanisms of corticosteroid action on lymphocyte subpopulations. V. Effects of in vivo hydrocortisone on the circulatory kinetics and function of naturally occurring and mitogen-induced suppressor cells in man.— *Cell Immunol.*, 1979, v. 44, p. 169.
- Häyry P., Andersson L. C. T-cell synergy in mixed lymphocyte culture. induced cytotoxicity.— *Eur. J. Immunol.*, 1974a, v. 4, p. 145.
- Häyry P., Andersson L. C. Generation of T memory cells in one-way mixed lymphocyte culture. II. Anamnestic responses of «secondary» lymphocytes.— *Scand. J. Immunol.*, 1974b, v. 3, p. 823.
- Häyry P., Andersson L. C., Nordling S. e. a. Allograft response in vitro.— *Transplant. Rev.*, 1972, v. 12, p. 91.
- Hayward A., Layward L., Layward P. e. a. Fc-receptor heterogeneity of human suppressor T-cells.— *J. Immunol.*, 1978, v. 121, p. 1.
- Heath E. C. Complex polysaccharides.— *Ann. Rev. Biochem.*, 1971, v. 40, p. 29.
- Heynen C. J., Uytendaele F., Gmelig — Meiling F. H. J. Localization of human antigen-specific helper and suppressor function in distinct T-cell subpopulations.— *Cell Immunol.*, 1979, v. 43, p. 282.
- Helminen H. J., Erickson J. L. E. Studies on mammary gland involution. I. On the ultrastructure of the lactating mammary gland.— *J. Ultrastruct. Res.*, 1968, v. 25, p. 193.
- Herman P. Ultrastructure of membrane lesions in immune lysis, osmotic lysis and drug induced lysis.— *Fed. Proc.*, 1974, v. 33, p. 2116.
- Henney C. S. Studies on the mechanism of T cell mediated cytotoxicity.— *Transplant. Rev.*, 1973a, v. 17, p. 37.
- Henney C. S. Studies on the mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. II. The use of various target cell markers to study cytotoxic events.— *J. Immunol.*, 1973b, v. 110, p. 73.
- Henney C. S. Estimation of the size of a T-cell induced lytic lesion.— *Nature*, 1974, v. 295, p. 456.
- Henney C. S. T cell-mediated cytotoxicity: an overview of some current issues.— In: *Contemp. Top. in Immunobiol.*/Ed. by A. Stutman, 1977, p. 245.
- Henney C. S., Bourne H. R., Lichtenstein L. M. The role of cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate in the specific cytotoxic activity of lymphocytes.— *J. Immunol.*, 1972, v. 108, p. 1526.
- Henney C. S., Bubbers J. E. Antigen — T-lymphocyte interactions: inhibition by cytochalasin B.— *J. Immunol.*, 1973a, v. 111, p. 85.
- Henney C. S., Bubbers J. E. Studies on the mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. I. The role of divalent cations in cytotoxicity by T-lymphocytes.— *J. Immunol.*, 1973b, v. 111, p. 63.
- Heppner G. H. Neonatal thymectomy and mouse mammary tumorigenesis.— In: *Immunity and tolerance in oncogenesis*/Ed. by Severy L., Perugia, 1970, p. 503.
- Heppner G. H. Is there evidence that immunity influences tumor-host balance in breast cancer? — In: *Recent results cancer research*, 1973, v. 42, p. 63.
- Heppner G. H., Wood R. C., Weiss D. W. Studies on the role of the thymus in viral tumorigenesis. I. Effect of thymectomy on induction of hyperplastic alveolar nodules and mammary tumors in BALB/cf C3H mice.— *Israel. J. Med. Sci.*, 1968, v. 4, p. 1195.
- Herberman R. B., Djeu J. Y., Kay H. D. e. a. Natural killer cells: characteristics and regulation of activity.— *Immunol. Rev.*, 1979, v. 44, p. 43.
- Herberman R., Nunn M., Holden H. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells.— *Int. J. Cancer*, 1975, v. 16, p. 230.

- Herberman R., Nunn M., Lavrin D. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity.— *Intern. J. Cancer*, 1975, v. 16, p. 216.
- Herzenberg L. A. Immunoglobulin-producing hybrid cell lines.— In: *Selected methods in cellular immunology*/Ed. by Mishell B. B., Shiji S. M., 1979, Chapter 17, W. H. Freeman: San Francisco.
- Heston W. E., Deringer M. K., Amderwont H. B. Gene-milk agent relationship in mammary tumor development.— *J. Nat. Cancer Inst.*, 1945, v. 5, p. 289.
- Heston W. E., Deringer M. K., Dunn T. B. Further studies on the relationship between the genotype and mammary tumor agent in mice.— *J. Nat. Cancer Inst.* 1956, v. 16, p. 1309.
- Hirai J., Nisonoff A. Selective suppression of the major idiotypic component of an antihapten response by soluble T-cell derived factors with idiotypic or anti-idiotypic receptors.— *J. Exp. Med.*, 1980, v. 151, p. 1213.
- Hirano T., Nordin A. Cell-mediated immune response in vitro. I. The development of suppressor cells and cytotoxic lymphocytes in mixed lymphocyte cultures.— *J. Immunol.*, 1976, v. 116, p. 1115.
- Hirshberg H., Thorsby E. Activation of human suppressor cells in mixed lymphocyte culture.— *Scand. J. Immunol.*, 1977, v. 6, p. 809.
- Hiserodt J. C., Yamamoto R. S., Granger G. A. The human LT-system. III Characterization of a high molecular weight LT-class (complex) composed of the various smaller MW LT-classes and subclasses in association with Ig-like molecules.— *Cell Immunol.*, 1978a, v. 38, p. 417.
- Hiserodt J. C., Yamamoto R. S., Granger G. A. The human LT-system. IV Studies on the large MW LT-complex class: association of these molecules with specific antigen binding receptor(s) in vitro.— *Cell Immunol.*, 1978b, v. 41, p. 380.
- Hodes R., Heathcock K. In vitro generation of suppressor cell activity: suppression of in vitro induction of cell — mediated cytotoxicity.— *J. Immunol.*, 1976, v. 116, p. 167.
- Hokin L. E. Dynamic aspects of phospholipids during protein secretion.— *Int. Rev. Cytol.*, 1968, v. 23p, 187.
- Holtzman E. Stimulation dependent alterations in peroxidase uptake by lobster neuromuscular junctions.— *Science*, 1971, v. 173, p. 733.
- Holtzman E., Teichberg S., Abrahams S. J., e. a. Notes on synaptic vesicles and related structures, endoplasmic reticulum, lysosomes and peroxisomes in nervous tissue and adrenal medulla.— *J. Histochem. Cytochem.* 1973, v. 21, p. 349.
- Howe M., Berman L., Cohen L. Relationship between proliferative and effector phases of the mixed lymphocyte reaction and graft-versus-host reaction.— *J. Immunol.*, 1973, v. 111, p. 1243.
- Huber B., Devinsky O., Gershon R. K., e. a. Cell-mediated immunity delayed-type hypersensitivity and cytotoxic responses are mediated by different T-cell subclasses.— *J. Exp. Med.*, 1976, v. 143, p. 1534.
- Huber L., Miller G., Schimpl A., e. a. Partial characterization and purification of murine T-cell replacing factor, TRF. II. Biochemical characteristics.— *Immunochemistry*, 1978, v. 15, p. 33.
- Hirschhorn R., Hirschhorn K., Veissman G. Appearance of hydrolase rich granules in human lymphocytes induced by phytohemagglutinin and antigens.— *Blood*, 1967, v. 30, p. 84.
- Hiserodt J. C., Ford S. C., Harris P. C., e. a. The human LT-system. VII. Release of soluble forms delivery to target L-929 cells by lectin-preactivated human lymphotoxin in the absence of protein synthesis and secretory processes.— *Cell Immunol.*, 1979a, v. 47, p. 32.
- Hiserodt C., Granger A., Bonavida B. Specific target cell lysis by supernatants derived from alloimmune murine cytotoxic T-lymphocytes: possible role of a lymphotoxin T-cell receptor complex. T-and B-lymphocytes: recognition and function. ICN-UCLA Symposia on Molecular and cellular biology VXVI/Ed. by F. H. Bach, B. Bonavida, E. S. Vietta, C. F. Fox. Acad. Press, 1979b.

- Hiserodt G. C., Tiangco G. J., Granger G. A. The LT-system in experimental animals. I. Rapid release of high levels of lymphotoxin (LT) activity from murine lymphocytes during the interaction with lectin — treated allogeneic or xenogeneic target cells in vitro.— *J. Immunol.*, 1979a, v. 123, p. 311.
- Hiserodt G. C., Tiangco G. J., Granger G. A. The LT-system in experimental animals. II. Physical and immunologic characteristics of molecules with LT activity rapidly released by murine lymphoid cells activated on lectin-coated allogeneic monolayers in vitro.— *J. Immunol.*, 1979r, v. 123, p. 317.
- Hiserodt J. C., Tiangco G. J., Granger G. A. The LT-system in experimental animals. IV. Rapid specific lysis of ⁵¹Cr-labeled allogeneic target cells by highly unstable high m. w. Lymphotoxin — receptor complex(es) released in vitro by activated alloimmune murine T lymphocytes.— *J. Immunol.*, 1979d, v. 123, p. 332.
- Ishikawa H., Dutton R. W. Primary in vitro cytotoxic response of F₁ T-lymphocytes against parental antigens.— *J. Immunol.*, 1979, v. 122, p. 529.
- Ishimura K., Egawa K., Fujita H. Freeze-fracture images of exocytosis and endocytosis in anterior pituitary cells of rabbits and mice.— *Cell Tiss. Res.*, 1980, v. 206, p. 233.
- Ishimura K., Okamoto H., Fujita H. Freeze — etching observations on the characteristic arrangement of intramembranous particles in the apical plasma membrane follicular cell in TSH-treated mice.— *Cell Tiss. Res.*, 1976, v. 171, p. 297.
- Jacobson G., Poulsen C., Rygaard J. Effects of thymus grafts in nude mice transplanted with human malignant tumors.— *Exptl. Cell. Biol.*, 1979, v. 47, p. 409.
- Jamieson J. D., Palade G. E. Role of the Golgy complex in the intracellular transport of secretory proteins.— *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 1966, v. 55, p. 424.
- Jamieson J. D. Transport and discharge of exportable proteins in pancreatic exocrine cells; in vitro studies.— *Current Top in Membranes and Transport*, 1972, v. 3, p. 273.
- Jamieson J. D., Palade G. E. Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. I. Role of the peripheral elements of the Golgy complex.— *J. Cell. Biol.*, 1967a, v. 34, p. 577.
- Jamieson J. D., Palade G. E. Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. II. Transport to condensing vacuoles and zymogen granules.— *J. Cell. Biol.*, 1967b, v. 34, p. 597.
- Jandinski J., Cantor H., Tadakuma T. Separation of helper T cells from suppressor T-cells expressing different Ly components. I. Polyclonal activation: suppressor and helper activities are inherent properties of distinct T-cell subclasses.— *J. Exptl. Med.*, 1976, v. 143, p. 1382.
- Janossy G., Greaves F. Lymphocytic activation. I. Response of T- and B-lymphocytes to phytomitogens.— *Clin. Exp. Immunol.*, 1971, v. 2, p. 483.
- Jeejeebhoy H. F. Stimulation of tumor growth by the immune response.— *Int. J. Cancer*, 1974, v. 13, p. 665.
- Johnson S. Effect of thymectomy and the doze on the induction and antigenic properties of sarcomas in C57BL mice.— *Brit. J. Cancer*, 1968a, v. 22, p. 93.
- Johnson S. The effect of thymectomy on the induction of skin tumors by dimethylbenzanthracene in mice of the IF strain.— *Brit. J. Cancer*, 1968b, v. 22, p. 755.
- Johnson F. R., Roberts K. B. The growth and division of human small lymphocytes in tissue culture: an electron microscopic study.— *J. Anat.*, 1964, v. 98, p. 303.
- Joskowicz M., Rabourdin-Combe C., Neauport-Santes C. e. a. Characterization of suppressive immunoglobulin — binding factor (IBE). III. Biochemical and immunochemical characteristics of IBE produced by activated T cells.— *J. Immunol.*, 1978, v. 121, p. 777.

- Kahn-Perles B., Golstein P. Cell membrane-mediated cytolysis by membranes from noncytolytic cells.— *Eur. J. Immunol.*, 1978, v. 8, p. 71.
- Kalina M., Berke G. Contact regions of cytotoxic T-lymphocyte-target cell conjugates.— *Cell Immunol.*, 1976, v. 25, p. 41.
- Kalina M., Ginsburg H. Ultrastructural aspects of the adherence to target cells of in vitro differentiated.— *Proc. Soc. Exptl. Biol., Med.*, 1975, v. 149, p. 796.
- Kamat R., Henney C. S. Studies on T-cell clonal expansion I. Suppression of killer T-cell production in vivo.— *J. Immunol.*, 1975, v. 115, p. 1592.
- Kamat R., Henney C. S. Studies of T-cell clonal expansion. II. The in vitro differentiation of pre-killer and memory T-cells.— *J. Immunol.*, 1976, v. 116, p. 1490.
- Kapeller M., Gal-Oz R., Grover N. B. e. a. Natural shedding of carbohydrate-containing macromolecular cell surfaces.— *Exptl. Cell Res.*, 1973, v. 79, p. 152.
- Kaplan H. S. Influence of thymectomy, splenectomy and gonadectomy on incidence of radiation-induced lymphoid tumors in strain C57BL mice.— *J. Nat. Cancer Inst.*, 1950, v. 11, p. 83.
- Kaplan H. S., Brown M. B., Paull J. Influence of postirradiation thymectomy and of thymus implants on lymphoid tumor incidence in C57BL mice.— *Cancer Res.*, 1953, v. 13, p. 677.
- Kapp J. A., Pierce C. W., De La Croix e. a. Immunosuppressive factor extracted from lymphoid cells in nonresponder mice primed with L-glutamine acid⁶⁰ — 2 allonine³⁰ — L-tyrosine¹⁰ (GAT).— *J. Immunol.*, 1976, v. 116, p. 305.
- Kasakura S., Lowenstein L. A factor stimulating DNA synthesis derived from the medium of leucocyte culture.— *Nature*, 1965, v. 208, p. 794.
- Katz D. H. Lymphocyte differentiation, recognition and regulation. N. Y., 1977.
- Kaufmann Y., Berke G., Eshhar Z. Cytotoxic T-lymphocyte hybridomas which mediate specific tumor — cell lysis in vitro.— *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981.
- Kemp A., Berke G. Inhibition of lymphocyte-mediated cytolysis by the local anaesthetics benzyl and salicyl alcohol.— *Eur. J. Immunol.*, 1973, v. 3, p. 647.
- Kersey J. H., Spector B. D., Good R. A. Immunodeficiency and cancer.— *Advances in cancer research*, 1973, v. 18, p. 211.
- Kiessling R., Wigzell H. An analysis of the murine NK cell as to structure, function and biological relevance.— *Immunol. Rev.*, 1979, v. 44, p. 165.
- Kimura A. K. Inhibition of specific cell-mediated cytotoxicity by anti-T-cell receptor antibody.— *J. Exptl. Med.*, 1974, v. 139, p. 888.
- Kimura A. K., Clark W. R. Functional characteristics of T cell receptors during sensitization against histocompatibility antigens in vitro.— *Cell Immunol.*, 1974, v. 12, p. 127.
- Kimura A. K., Wigzell H. Cytotoxic T-lymphocyte membrane components: an analysis of structures related to function.— *Contemporary Top. in Mol. Immunol.*, 1978, v. 7, p. 209.
- Kishimoto T., Ishizaka K. Regulation of antibody response in vitro. VIII. Multiplicity of soluble factors released from carrier-specific cells.— *J. Immunol.*, 1974, v. 112, p. 1685.
- Kishimoto S., Tomino S., Mitsuya H. e. a. Age-related changes in suppressor functions of human T-cells.— *J. Immunol.*, 1979, v. 123, p. 1586.
- Kisielow P., Hirst J., Shiku H. e. a. Ly-antigen as markers for functionally distinct subpopulations of thymus-derived lymphocytes of the mouse.— *Nature (Lond.)* 1975, v. 253, p. 219.
- Klein A., Plata F., Jakson M. e. a. Cellular tumorigenicity in nude mice. Role of susceptibility to natural killer cells.— *Exp. Cell Biol.*, 1979, v. 47, p. 430.
- Klein E., Klein G. Specificity of homograft rejection in vivo, assessed by inoculation of artificially mixed compatible and incompatible tumor cells.— *Cell. Immunol.*, 1972, v. 5, p. 201.

- Klein G. Tumor antigens.— *Ann. Rev. Microbiol.*, 1966, v. 10, p. 223.
- Klein G. Tumor-specific transplantation antigens: G. H. A. clowes memorial lecture.— *Cancer Res.*, 1968, v. 28, p. 625.
- Klein G. The major histocompatibility complex of the mouse.— *Science*, 1979a, v. 203, p. 516.
- Klein G. Lymphoma development in mice and humans: Diversity of initiation is followed by convergent cytogenetic evolution.— *Proc. Nat. Acad. sci. USA*, 1979b, v. 76, p. 2442.
- Klein G., Hauptfield M., Gieb R. e. a. Immunogenetic analysis of H-2 mutations. V. Serological analysis of mutations H-2^{da}, H-2^{fa}, and H-^{ka} — *Transplantations*, 1976, v. 22, p. 572.
- Klein G., Klein E. Immune surveillance against virus induced tumors and non-rejectability of spontaneous tumors. Contrasting consequences of host versus tumor evolution.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, p. 2121.
- Klein P. A. Problems with and approaches to specificity in the serologic measurements of histocompatibility and tumor-associated antigens on tumor cell surfaces.— *Transplantation Proc.*, 1980, v. XII, p. 16.
- Koldovsky P., Svoboda J. Induction of tumors by Rous sarcoma virus in adult mice.— *Folia Biol. (Pragua)*, 1965, v. 11, p. 203.
- Komatsy J., Nawa J., Bellamy A. R. e. a. Clones of cytotoxic lymphocytes can recognize uninfected cells in primary response against influenza virus.— *Nature*, 1978, v. 274, p. 802.
- Konttinen S., Feldman M. Suppressor cell induction in vitro III. Antigen specific suppression by supernatants of suppressor cells.— *Eur. J. Immunol.*, 1977, v. 7, p. 310.
- Koprowski H., Fernandes M. V. Autosensitization reaction in vitro contactual agglutination of sensitized lymph node cells in brain tissue culture accompanied by destruction of glial elements.— *J. Exptl. Med.*, 1962, v. 116, p. 467.
- Koren H. S., Ax W., Freund-Moelbert E. Morphological observations on the contact induced lysis of target-cells.— *Eur. J. Immunol.*, 1973, v. 3, p. 1.
- Koren H. S., Farber E., Fischer H. Changes in phospholipid metabolism of a tumor target cell during a cell-mediated cytotoxic reaction.— *Bioch. Bioph. Act.*, 1971, v. 231, p. 520.
- Kout R., Herzenberg L. The Fc-receptor on thymus-derived lymphocytes I. Detection of a subpopulation of murine T-lymphocytes bearing the Fc-receptor.— *J. Exptl. Med.*, 1975, v. 142, p. 611.
- Kunitz M. M., Innes J. B., Weksler M. E. Lymphocyte transformation induced by autologous cells. IV. Human T-lymphocyte proliferation induced by autologous or allogeneic non-T-lymphocytes. — *J. Exptl. Med.*, 1976, v. 143, p. 1042.
- Kuppers R. C., Henney C. S. Studies on the mechanism of lymphocyte — mediated cytotoxicity. IX. Relationships between antigen recognition and lytic expression in killer T cells.— *J. Immunol.*, 1977, v. 118, p. 71.
- Kurth R., Medley G. A membrane permeability test for the detection of cell surface antigens.— *Immunology*, 1975, v. 29, p. 803.
- Lacy P. E. Endocrine secretory mechanisms.— *Am. J. Pathol.*, 1975, v. 79, p. 170.
- Lacy P. E., Howell S. L., Young D. A. e. a. New hypothesis of insulin secretion.— *Nature*, 1968, v. 219, p. 1177.
- Lafferty K. J., Andrus L., Prowse S. J. Role of lymphokine and antigen in the control of specific T-cell responses.— *Immunol. Rev.*, 1980, v. 51, p. 280.
- Lafferty K. J., Walker K. Z., Scollay R. G. e. a. Allogeneic interactions provide evidence for a novel class of immunological reactivity.— *Transplant. Rev.*, 1972, v. 12, p. 198.
- Lalande M. E., McCutcheon M. J., Miller R. G. Quantitative studies on the precursors of cytotoxic lymphocytes. VI. Second signal requirements of specifically activated.— *J. Exptl. Med.*, 1980, v. 151, p. 12.

- Larsson E., Blomgren H. Evidence that soluble products released by PHA-stimulated human lymphoid cells activate immunosuppressive monocytes.— *Scand. J. Immunol.*, 1979, v. 9, p. 53.
- Lavrovsky V. A., Viksler V. Kh. Natural activity of Wistar rat spleen cells: blocking effect of homologous sera.— *Immunology*, 1980a, v. 41, p. 541.
- Lavrovsky V. A., Viksler V. Kh. Possible mechanism of target cells resistance in antibody-dependent cellular cytotoxicity.— *Eur. J. Immunol.*, 1980b, v. 10, p. 483.
- Lavrovsky V. A., Viksler V. Kh. Immunological properties of malignant and nonmalignant sublines of L-cells.— *Cancer Res.*, 1980b, v. 40, p. 3252.
- Lavrovsky V. A., Viksler V. Kh., Yurchenko J. A., e. a. Genetic determination of the immune response in mice to cells of different histological type.— *Immunology*, 1979, v. 36, p. 835.
- Law L. W. Studies of thymic function which emphasis on the role of the thymus in oncogenesis.— *Cancer Res.*, 1966, v. 26, p. 551.
- Law L. W. Function of the thymus in tumor induction by viruses.— In: *Perspectives in virology*. N. Y.: Acad. Press, 1967, v. 5, p. 229.
- Law L. W. Studies of the significance of tumor antigens in induction and regression of neoplastic disease: Presidential Address.— *Cancer Res.*, 1969, v. 29, p. 1.
- Law L. W. Influence of immune suppression on the induction of neoplasms by NIV and MSV.— *Biol. Hematol.*, 1973, N 39, p. 662.
- Law L. W., Ting R., Stanton M. Some biologic, immunogenic and morphologic effects in mice after infection with a murine sarcoma virus. I. Biologic and immunogenic studies.— *J. Nat. Cancer Inst.*, 1968, v. 40, p. 1101.
- Lawrence H., Landy M. (Eds.) Mediators in cellular immunity.— N. Y.: Acad. Press, 1971.
- Lawson D., Raff M. C., Comperts B. e. a. Molecular events during membrane fusion. A study of exocytosis in rat peritoneal mast cells.— *J. Cell Biol.*, 1977, v. 72, p. 242.
- Ledbetter J. A., Evans R. L., Lipinski M., e. a. Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T-lymphocyte helper/inducer and cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man.— *J. Exptl. Med.*, 1981, v. 153, p. 310.
- Ledbetter J. A., Herzenberg L. A. Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigen.— *Immunol. Rev.*, 1979, v. 47, p. 63.
- Ledbetter J. A., Rouse R. V., Micklem H. S. e. a. T-cell subsets defined by expression of Lyt-1, 2, 3 and Thy-1 antigens. Two-parameter immunofluorescence and cytotoxicity analysis with monoclonal antibodies modifies current views.— *J. Exptl. Med.*, 1980, v. 152, p. 280.
- Lee S. C., Lucas Z. J. Regulatory factors produced by lymphocytes. I. The occurrence of multiple — lymphotoxin associated with ribonuclease activity.— *J. Immunol.*, 1976, v. 117, p. 283.
- Lerman S. P., Chapman J. M., Carswell E. A. e. a. Properties of reticulum cell sarcomas in SGL/g mice. 1. Proliferative response of T-derived lymphoid cells from normal mice to tumor cells.— *Int. J. Cancer*, 1979, v. 14, p. 808.
- Levy J. P., Leclerk J. C. The murine sarcoma virus-induced tumor: exceptions or general model in tumor immunology? — *Adv. Cancer Res.*, 1977, v. 24, p. 1.
- Levy J., Maier T., Rilburu D. Further characterization of thymic suppressor cells and a factor that suppress the generation of cells cytotoxic for a syngeneic tumor in DBA/2 mice.— *J. Immunol.*, 1979, v. 123, p. 766.
- Lichtenstein L. M., Henny C. S., Bourne H. R. e. a. Effects of cholera enterotoxin on in vitro models of immediate and delayed hypersensitivity: further evidence for the role of cyclic AMP.— *Clin. Invest.*, 1973, **PPP**, v. 52, p. 691.
- Liepins A., Faanes R. B., Lieter J. e. a. Ultrastructural Changes during T-lymphocyte mediated cytotoxicity.— *Cell Immunol.*, 1977, v. 23, p. 109.

- Lilly F. Fv-2: identification and location of a second gene governing the spleen focus response to Friend leukemia virus in mice.— *J. Nat. Cancer Inst.*, 1970, v. 45, p. 163.
- Lilly F. Mouse leukemia: a model of a multiple-gene disease.— *J. Nat. Cancer Inst.*, 1972, v. 49, p. 927.
- Lindahl K. F., Wilson D. B. Histocompatibility antigen-activated cytotoxic T-lymphocytes. II. Estimates of the frequency and specificity of precursors.— *J. Exptl. Med.*, 1977, v. 145, p. 508.
- Ling N. R., Kay J. E. (Eds.) Lymphocyte stimulation. North — Holland, Amsterdam, 1975.
- Lipscomb T. F., Holmes K. V., Vitetta E. G., e. a. Cell surface immunoglobulin. XII Localization of immunoglobulin on murine lymphocytes by scanning immunoelectronmicroscopy.— *Eur. J. Immunol.* 1975, v. 5, p. 255.
- Lipsky P., Ginsburg W., Fineman F., e. a. Control of human B-lymphocytes responsiveness: enhanced suppressor T cell activity after in vitro incubation.— *J. Immunol.*, 1978, v. 120, p. 902.
- Lonai P. Genetic control of the stimulator and effector function in allogeneic lymphocyte interaction: The expression of I-region gene products on T- and B-lymphocytes.— In: Immune recognition. Proc. of the Ninth Leukocyte Culture Conference/Ed. Rosenthal A. S. N. Y. Acad. Press Inc., 1975, p. 683.
- Loor F. Structure and dynamic of the lymphocyte surface in relation to differentiation, recognition and activation; in Kallos et al.— *Progr. Allergy*; v. 23, p. 1 (Karger, Basel, 1977).
- Loor F., Hägg L. B. The modulation of microprojections on the lymphocyte membrane and the redistribution of membrane-bound ligands.— *Eur. J. Immunol.*, 1975, v. 5, p. 854.
- Lozzio B., Machado E., Lair S. e. a. Reproducible metastatic growth of K-562 human myelogenous leukemia cells in nude mice.— *J. Nat. Cancer Inst.*, 1979, v. 63, p. 295.
- Maca R. D., Bonnard G. D., Herberman R. B. The suppression of mitogen- and allo-antigen stimulated peripheral blood lymphocytes by cultured human T-lymphocytes.— *J. Immunol.*, 1979, v. 123, p. 246.
- Maki T., Howe M. L. Primary in vitro sensitization of murine lymphocytes against isogeneic and allogeneic cells transformed by SV 40.— *J. Immunol.*, 1976, v. 117, p. 1398.
- Malaisse — Lagae F., Malaisse W. J. Stimulus — secretion coupling of glucose — induced insulin release. III. Uptake of ^{45}Ca by isolated islets of Langerhans.— *Endocrinology*, 1971, v. 88, p. 72.
- Malawista S. E., Bodel P. T. The dissociation by colchicine of phagocytosis from increased oxygen consumption in human leukocytes.— *J. Clin. Invest.*, 1967, v. 46, p. 786.
- Margolis R. L., Wilson L. Addition of colchicine — tubulin complex to microtubule ends: The mechanism of substoichiometric colchicine poisoning.— *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, p. 3466.
- Martinez C. Effect of early thymectomy on development of mammary tumors in mice.— *Nature*, 1964, v. 203, p. 4949.
- Martz E. Early steps in specific tumor cell lysis by sensitized mouse T-lymphocytes. I. Resolution and characterization.— *J. Immunol.*, 1975, v. 115, p. 261.
- Martz E. Early steps in specific tumor cell lysis by sensitized mouse T-lymphocytes. II. Electrolytic permeability in the target membrane concomitant with programming for lysis.— *J. Immunol.*, 1976a, v. 117, p. 1023.
- Martz E. Sizes of isotopically-labeled molecules released during lysis of tumor cells labeled with ^{61}Cr and (^{14}C) nicotinamide.— *Cell Immunol.*, 1976b, v. 26, p. 313.
- Martz E. Mechanism of specific tumor-cell lysis by alloimmune T lymphocytes: resolution and characterization of discrete steps in the cellular interaction.— *Contem. Top. in Immunobiol*/Ed. by A. Stutman, 1977, v. 7, p. 301.

- Martz E., Benacerraf B. An effector cell independent step in target cell lysis by sensitized mouse lymphocytes.— *J. Immunol.*, 1973, v. 111, p. 1538.
- Martz E., Benacerraf B. T-lymphocyte mediated cytolysis: Temperature dependence of killer cell dependent and independent phases and lack of recovery from the lethal hit at low temperatures.— *Cell. Immunol.*, 1975, v. 20, p. 81.
- Martz E., Burakoff B., Benacerraf B. Interpretation of the sequential release of small and large molecules from tumore cells by low temperature during cytolysis mediated by immune T cell.— *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1974, v. 71, p. 177.
- Maryanski J. L., Cerottini J. C., Brunner K. T. Generation of cytolytic T-lymphocytes in vitro. X Induction of primary and secondary CTL responses by the mitogen sodium periodate.— *J. Immunol.*, 1979, v. 122, p. 342.
- Maryanski J. L., MacDonald R., Cerottini J.— C. Limiting dilution analysis of alloantigen-reactive T-lymphocytes. IV. Frequency of cytolytic T-lymphocyte precursor cells in MLC blasts separated by velocity sedimentation.— *J. Immunol.*, 1980, v. 121, p. 42.
- McMaster R., Buhler K., Whitney R. e. a. Immunosuppression of T-lymphocyte function by fractionated serum from tumor — bearing mice.— *J. Immunol.*, 1977, v. 118, p. 218.
- Mathieson B., Sharrow S., Campbell P. e. a. An Lyt differentiated thymocyte subpopulation detected by flow microfluorometry.— *Nature*, 1979, v. 277, p. 478.
- Matter A. J. The differentiation pathway of T-lymphocytes, evidence for two differentiated cell types.— *J. Exptl. Med.*, 1974, v. 140, p. 566.
- Matter A. J. Microcinematographic and electron microscopic analysis of target cell lysis induces by cytotoxic T lymphocytes.— *Immunology*, 1979, v. 36, p. 179.
- Matter A. J., Lisowska-Bernstein B., Ryser J. E. e. a. Mouse Thymus-independent and thymus derived lymphoid cells. II. Ultrastructural Studies.— *J. Exptl. Med.*, 1972, v. 136, p. 1008.
- Matter A., Simpson E. The differentiation of cytotoxic T lymphocytes in vitro. An ultrastructural study.— *Cell Tiss. Res.*, 1976, v. 166, p. 475.
- Mayer M. M. Mechanism of cytolysis by lymphocytes: A comparison with complement.— *J. Immunol.*, 1977, v. 119, p. 1195.
- Medawar P. B. The behaviour and fate of sein autografts and skin homografts in rabbits.— *J. Anat.*, 1944, v. 78, p. 176.
- Medina D., Heppner G. Cell-mediated «immunostimulation» induced by MTV-free BALB/c mammary tumors.— *Nature*, 1973, v. 242, p. 329.
- Melchers F. Biosynthesis of the carbohydrate portion of immunoglobulin. Radiochemical and chemical analysis of the carbodhydrate moieties of two myeloma proteins purified from different subcellular fractions of plasma cells.— *Biochemistry*, 1971, v. 10, p. 653.
- Meldolesi J., Jamieson J. D., Palade G. E. Composition of cellular membranes in the pancreas of the guinea pig. I. Isolation of membrane fractions.— *J. Cell. Biol.*, 1971a, v. 49, p. 109.
- Meldolesi J., Jamieson J. D., Palade G. E. Composition of cellular membranes in the pancreas of the guinea pig. II. Lipids.— *J. Cell Biol.*, 1971b, v. 49, p. 130.
- Meldolesi J., Jamieson J. D., Palade G. E. Composition of cellular membranes in the pancreas of the guinea pig. III Enzymatic activities.— *J. Cell Biol.*, 1971b, v. 49, p. 150.
- Melief C., Christinas B., Van der Meulen M. e. a. T-cell cooperation in the in vitro generation of cytotoxicity across a mutant H — 2K and a recombinant K + IA difference. An analysis with anti-Lyt-antisera.— *Eur. J. Immunol.*, 1979, v. 9, p. 7.
- Melief C. J. M., Schwartz R. S., Cohn H. I. e. a. Dermal histocompatibility and in vitro lymphocyte reactions of three new H-2 mutants.— *Immunogenetics*, 1975, v. 2, p. 337.

- Melmon K. L., Bourne H. R., Wainstein Y. e. a. Hemolytic plaque formation by leukocytes in vitro.— *J. Clin. Invest.*, 1974, v. 53, p. 13.
- Meo T., Vives J., Miggiano V. e. a. A major role for the Ir-I region of the mouse H-2 complex in the mixed leukocyte reaction.— *Transplant. Proc.*, 1973, v. 5, p. 337.
- McMichael A. J. HLA restriction of human cytotoxic T-cells.— *Springer Semin. Immunopathol.*, 1980, v. 3, p. 3.
- McMichael A. J., Askonas B. A. Influenza virus-specific cytotoxic T cells in man: induction and properties of the cytotoxic cell.— *Eur. J. Immunol.*, 1978, v. 8, p. 705.
- Miller J. F. A. P. Immunological function of the thymus.— *Lancet*, 1961, v. 2, p. 748.
- Miller J. F. A. P. Role of the thymus in virus-induced leukemia.— In: Ciba found symposium on tumour viruses of murine origin. L., 1962, p. 262.
- Miller J. P. A. P., Grant G. A., Roe F. J. C. Effect of thymectomy on the induction of skin tumours by 3, 4-Benzopyrene.— *Nature*, 1973, v. 199, p. 920.
- Miller R. G., Dunkley M. Quantitative analysis of the ^{51}Cr release cytotoxicity assay for cytotoxic lymphocytes.— *Cell Immunol.*, 1974, v. 14, p. 284.
- Miller R. G., Teh H. S., Harley E. e. a. Quantitative studies of the activation of cytotoxic lymphocyte precursor cells.— *Immunol. Rev.*, 1977, v. 35, p. 38.
- Minami H., Shreffler D. C., Cowing C. Characterization of the stimulator cells in the myrine primary mixed leukocyte response.— *J. Immunol.*, 1980, v. 124, p. 1314.
- Minato N., Bloom B., Jones C. e. a. Mechanism of rejection of virus persistently infected tumor cells by athymic nude mice.— *J. Exptl. Med.*, 1979, v. 149, p. 1117.
- Mira-Mosser F., Shofield J. G., Orci L. Modifications in the release of rat growth hormone in vitro and the morphology of rat anterior pituitaries incubated in various ionophores.— *Eur. J. Clin. Invest.*, 1976, v. 6, p. 103.
- Mizel S. B. Physicochemical characterization of lymphocyte activating factor (LAF).— *J. Immunol.*, 1979, v. 122, p. 2167.
- Mollenhauer H., Morre D. Golgi apparatus and plant secretion.— *Ann. Rev. Pl. Physiol.*, 1966, v. 17, p. 27.
- Moloney J. B. Properties of a leukemia virus.— *J. Nat. Cancer Inst.*, 1960, v. 4, p. 7.
- Moretta L., Ferrari M., Caura M. e. a. Expression of a receptor for IgM by human T-cells in vitro.— *Eur. J. Immunol.*, 1975, v. 5, p. 565.
- Morgan D. A., Ruscetti F. W., Gallo R. C. Selective in vitro growth of T-lymphocytes from normal human bone marrows.— *Science*, 1976, v. 193, p. 1007.
- Moriya N., Miyawski T., Seki H. Induction of suppressor activity on B-cell differentiation in human T-cell subset without Fc (IgG) receptors by levamisole administration.— *Scand. J. Immunol.*, 1979, v. 10, p. 535.
- Morre D., Mollenhauer H. Isolation of the Golgi apparatus from plant cells.— *J. Cell. Biol.*, 1964, v. 232, p. 295.
- Morre D. J., Ovtracht L. Dynamics of the Golgy apparatus, membrane differentiation and membrane flow.— *Int. Rev. of Cytol. Suppl*, 1977, v. 5, p. 61.
- Moskalewski S., Thyberg J., Friberg U. Cold a. metabolic inhibitor effects on cytoplasmic microtubules and the Golgi Complex in cultured rat epiphyseal chondrocytes.— *Cell Tissue Res.*, 1980, v. 210, p. 403.
- Moskalewski S., Thyberg J., Lohmander S. e. a. Influence of colchicine and vinblastine on the Golgi complex and matrix deposition in chondrocyte aggregates. An ultrastructural study.— *Exp. Cell Res.*, 1975, v. 95, p. 440.
- Muhlbock O., Dux A. Histocompatibility genes and susceptibility to mammary tumor virus (MTV) in mice.— *Transplant. Proc.*, 1971, v. III, p. 1247.

- Murphy D. B., Herzenberg L. A., Okumura K. e. a. A new I subregion (I-J) marked by a locus (Ia-4) controlling surface determinants on suppressor T-lymphocytes.— *J. Exptl. Med.*, 1976, v. 144, p. 699.
- Nabholz M., Conzelmann A. Acute O. e. a. Established murine cytolytic T-cell lines as tools for a somatic cell genetic analysis of T-cell functions.— *Immunol. Rev.*, 1980, v. 51, p. 125.
- Nabholz M., Engers H. D., Collavo D. e. a. Cloned T-cell lines with specific cytolytic activity.— *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1978, v. 81, p. 176.
- Nabholz M., North M., Engers H. e. a. Murine cytolytic T-cell lines: Stability of functional phenotype and expression of cell surface markers. T- and B-lymphocytes: recognition and function ICN-UCLA.—In: *Symp. on Molecular and Cellular Biology*. V. 161. N. Y.: Acad. Press, 1979, p. 679.
- Nabholz M., Young H., Rynbeek A. e. a. I-region associated determinants: expression on mitogen — stimulated lymphocytes and detection by cytotoxic cells.— *Eur. J. Immunol.*, 1975, v. 5, p. 594.
- Nagy Z., Elliott B., Nabholz M. e. a. Specific binding of alloantigens to T-cell activated in the mixed lymphocyte reaction.— *J. Exptl. Med.*, 1976, v. 143, p. 648.
- Nakatani K., Takahashi S., Shiratori T. e. a. Heterotransplantation of human gastric carcinomas into nude mice.— *J. Surg.*, 1979, v. 3, p. 641.
- Nakayama E., Shiku H., Stockert E. e. a. Cytotoxic T cells: Lyt phenotype and blocking of killing activity by Lyt antisera.— *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, v. 76, p. 1977.
- Nedrud J., Touton M., Clark W. R. The requirement for DNA synthesis and gene expression in the generation of cytotoxicity in vitro — *J. Exptl. Med.*, 1975, v. 142, p. 960.
- Neta R., Salvin G. Specific depression of delayed hyper-sensitivity to purified proteins with relation to production of circulating antibody.— *Cell. Immunol.*, 1973, v. 9, p. 242.
- Neutra A., Leblond C. P. Radioautographic comparison of the uptake of galactose ^3H and glucose ^3H in the Golgi region of various cells secreting glycoproteins or mucopolysaccharides.— *J. Cell Biol.*, 1966, v. 30, p. 137.
- Nicolas G., Zagury D. Etude par cryofracture de la zone de contact entre cellule cytolytique et cellule cible.— *Biol. Cellulaire*, 1980, v. 37, p. 321.
- Nicolson G. Cancer metastases.— *Scientific Amer.*, 1979, v. 3, p. 50.
- Nomoto K., Takeja K. Immunologic properties of methylcholanthrene induced sarcomas of neonatally thymectomized mice.— *J. Nat. Cancer Inst.*, 1969, v. 42, p. 445.
- Novikoff A. B., Novikoff P. M. Cytochemical contributions to differentiating GERL from the Golgi apparatus.— *Histochem. J.*, 1977, v. 91, p. 525.
- Nunn M., Herberman R., Holden H. Natural cell-mediated cytotoxicity in mice against non-lymphoid tumor cells and some normal cells.— *Int. J. Cancer*, 1977, v. 20, p. 381.
- Nurbury K., Kripke M. Ultraviolet carcinogenesis in T-cell-depleted mice.— *J. Nat. Cancer Inst.*, 1978, v. 61, p. 917.
- Okumura K., Herzenberg L. A., Murphy D. B. e. a. Selective expression of H-2 (I-region) loci controlling determinants on helper and suppressor T-lymphocytes.— *J. Exptl. Med.*, 1976, v. 144, p. 685.
- O' Neill P., Mackler B. F., Wyde P. Complement (C3) receptor — bearing lymphocyte-mediated cytotoxicity and lymphotoxin responses.— *Cell. Immunol.*, 1975, v. 20, p. 33.
- Opelz G., Gale R. P., McClelland J. D. Relationship between leukemia antigens and stimulation in mixed leukocyte culture: Brief Communication.— *J. Nat. Cancer Inst.*, 1977, v. 59, p. 95.
- Opelz G., Kiuchi M., Takasugi M. e. a. Autologous stimulation of human lymphocyte subpopulations.— *J. Exptl. Med.*, 1975, v. 142, p. 1327.
- Orci L., Carpentier J. L., Perrelet A. e. a. Occurrence of low density lipoprotein receptors within large pits on the surface of human fibroblast as demonstrated by freeze-etching.— *Exp. Cell. Res.* 1978, v. 113, p. 1.

- Orci L., Perrelet A., Friend D. S. Freeze-fracture of membrane fusions during exocytosis in pancreatic B-cells.— *J. Cell Biol.*, 1977, v. 75, p. 23.
- Orosz C. G., Finke J. H. Influence of killer assisting factor (KAF) on generation of cytotoxic T-cells.— *Cell. Immunol.*, 1978, v. 37, p. 86.
- Orr T. S. C., Hall D. E., Allison A. C. A role of contractile microfilaments in the release of histamine from mast cells.— *Nature*, 1972, v. 236, p. 350.
- Oseroff A. R., Robbins P. W., Burger M. M. The cell surface membrane: biochemical aspects and biophysical probes.— *Ann. Rev. Biochem.*, 1973, v. 42, p. 647.
- Paerkau V., Shaw I., Mills G. e. a. Cellular Origins and targets of costimulator (IL-2).— *Immunol. Rev.*, 1980, v. 51, p. 157.
- Paetkau V., Mills G., Gerhart G. e. a. Proliferation of murine thymic lymphocytes in vitro is mediated by the concanavalin A induced release of a lymphokine (costimulator).— *J. Immunol.*, 1976, v. 117, p. 1320.
- Palade G. E. Functional changes in the structure of cell components.— In: *Subcellular particles*/Ed. by T. Hayashi. The Ronald Press, 1959, p. 64.
- Palade G. E. Structure and function at the cellular level.— *J. Amer. med. Assoc.*, 1966, v. 198, p. 815.
- Palade G. E. Ultrastructural aspects of the process of protein secretion.— *Science*, 1975, v. 189, p. 347.
- Parker J. W., Wakasa H., Lukas R. J. The morphologic and cytochemical demonstration of lysosomes in lymphocytes incubated with phytohemagglutinin by electron microscopy.— *Lab. Invest.*, 1965, v. 14, p. 1736.
- Parkhouse R. M. E., Allison A. C. Failure of citochalasin or colchicine to inhibit secretion of immunoglobulins.— *Nat. New Biol.*, 1972, v. 235, p. 220.
- Parmiani G., Carbone G., Invernizzi C., e. a. Alien histocompatibility antigens on tumor cells.— *Immunogenetics*, 1979, v. 9, p. 1.
- Perry L., Benacerraf B., Grune M. Regulation of the immune response to tumor antigen. IV. Tumor antigen — specific suppressor factor(s) bear I-J determinants and induce suppressor T cells in vivo.— *J. Immunol.*, 1978, v. 121, p. 2144.
- Plizenmaier K., Jung H., Starzinski-Powitz A. e. a. The role of T cells in anti-herpes simplex virus immunity: I. Induction of antigen specific cytotoxic T-lymphocytes.— *J. Immunol.*, 1977, v. 119, p. 939.
- Pierce C., Tadakuma T. Site and mechanism of action of a soluble immune response suppressor (SIRS) produced by Concanavalin A — activated T cells.— *Cell Immunol.*, 1976, v. 27, p. 335.
- Pierce N. F., Greenough W. B., Carpenter C. C. *Vibrio cholerae* enterotoxin and its mode of action.— *Bacteriol. Rev.*, 1971, v. 35, p. 1.
- Pierpaoli W. S., Sorkin E. Alteration of adrenal cortex and thyroid in mice with congenital absence of the thymus.— *Nature, New Biol.*, 1972, v. 238, p. 282.
- Pilarski L. M. A requirement for antigen-specific helper T cells in the generation of cytotoxic T-cells from thymocyte precursors.— *J. Exptl. Med.*, 1977, v. 145, p. 809.
- Pilarski L. M., Al-Adra A., Mc Kenzie F. C. Surface markers on the T-cells that regulate cytotoxic T-cell. responses. II. Distribution of Ly 6.1 and Ly 7.2.— *J. Immunol.*, 1980, v. 125, p. 365.
- Plata F., Cerottini J. C., Brunner K. T. Primary and secondary in vitro generation of cytolytic T-lymphocytes in the murine sarcoma virus system.— *Eur. J. Immunol.*, 1975, v. 5, p. 227.
- Plata F., Jongenill V., Cerottini J.—C. e. a. Antigenic specificity of the cytolytic T-lymphocyte (CTL) response to murine sarcoma virus-induced tumors. I. Preferential reactivity of in vitro generated secondary CTL with syngeneic tumor cells.— *Eur. J. Immunol.*, 1976, v. 6, p. 823.
- Plate J. Cellular response to murine alloantigens of the major histocompatibility complex; the role of cell populations that express different quantities of H-2 associated antigenic markers.— *Eur. J. Immunol.*, 1976a v. 6, p. 180.

- Plate J. Soluble factor substitute for T — T-cell collaboration in generation of T-killer lymphocytes.— *Nature*, 1976b, v. 260, p. 329.
- Plate J., Mc Kenzie I. B-cell stimulation of allogeneic T-cell proliferation in mixed lymphocyte cultures.— *Nature, New Biol.*, 1973, v. 245, p. 247.
- Plattner H., Reichel K., Matt H. Divalent-cation stimulated ATPase activity at preformed exocytosis sites in paramecium coincides with membrane — intercalated particles aggregates.— *Nature*, 1977, v. 267, p. 702.
- Plaut M., Bubbers J. E., Henney C. S. Studies on the mechanism of lymphocytes-mediated cytotoxicity. VII. Two stages in the T-cell mediated lytic cycle with distinct cation requirements.— *J. Immunol.*, 1976, v. 116, p. 150.
- Polliack A., Hämmerling U., Lampen W. e. a. Surface morphology of murine band T-lymphocytes: A comparative study by scanning electron microscopy.— *Eur. J. Immunol.*, 1975, v. 5, p. 32.
- Ponzio N. M., Finke J. H., Battisto J. R. Adult murine lymph. Node cells response blastogenically to a new differentiation antigen on isologous and autologous B-lymphocytes.— *J. Immunol.*, 1975, v. 114, p. 971.
- Portzehl H., Caldwell P. C., Ruegg J. C. The dependence of contraction and relaxation of muscle fibers from the crab *Maia squinado* on the internal concentration of free calcium ions.— *Biochem. Acta*, 1964, v. 79, p. 581.
- Poulsen P. B. Cytological events in allo-stimulated lymphocytes triggered by exposure to stimulatory alloantigens. I. Changes in cell size, the mitochondrial areal density, and numerical density of the endoplasmatic reticulum and the Golgi apparatus.— *Acta path. microbiol. Scand. Sect. C.*, 1979, v. 87, p. 131.
- Poulsen P. B., Nielsen L. H. Cytological events in allo-stimulated lymphocytes triggered by exposure to stimulatory allo-antigens. II. Changes in the areal density of cytoplasmatic vacuoles and in the subcellular localization of acid phosphatase.— *Acta path. Microbiol. Scand. Sect. C.*, 1979, v. 87, p. 203.
- Prehn R. T. Perspectives in oncogenesis: Does immunity stimulate, or inhibit neoplasia? — *J. Reticuloendoth. Soc.*, 1967, v. 10, p. 1.
- Prehn R. T., Lappe M. A. An immunostimulation theory of tumor development.— *Transplant, Rev.*, 1971, v. 7, p. 26.
- Procicchiani G., Fiorani M., Revoltella R. Ultrastructural studies of CI300 neuroblastoma cell interaction with syngeneic spleen lymphoid cells.— *Cell. Immunol.*, 1979, v. 44, p. 39.
- Ravazzola M. Golgi complex alterations induced by X537A in chief cells of rat parathyroid gland.— *Lab. Invest.*, 1976, v. 35, p. 425.
- Reddy J. K., Rao M. S., Warren J. R. e. a. Concanavalin agglutinability and surface microvilli of dissociated normal and neoplastic pancreatic acinar cells of the rat.— *Exptl. Cell. Res.*, 1979, v. 120, p. 55.
- Reif A. E., Allen J. M. V. The AKR thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissue.— *J. Exptl. Med.*, 1964, v. 120, p. 413.
- Reif A. E., Allen J. M. V. Mouse nervous tissue isoantigens.— *Nature*, 1966, v. 209, p. 523.
- Reinisch C. L., Andrew S. L., Schlossman S. F. Suppressor cell regulation of immune response to tumors: abrogation by adult thymectomy.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, p. 2989.
- Reyes F., Lejone J. L., Gourdin M. F. e. a. The surface morphology of human B-lymphocytes as revealed by immunoelectron microscopy.— *J. Exptl. Med.*, 1975, v. 141, p. 392.
- Rich S., David C., Rich R. Regulatory mechanisms in cell-mediated immune responses VII Presence of I-C subregion determinants on mixed leukocyte reaction suppressor factor.— *J. Exptl. Med.*, 1979, v. 141, p. 114.
- Rich S., Orson F., Rich R. Regulatory mechanisms on cell — mediated immune response. VI. Interaction of H-2 and non H-2 genes in elaboration of mixed leukocyte reaction suppressor factor.— *J. Exptl. Med.*, 1977, v. 146, p. 1221.
- Rich S. S., Rich R. R. Regulatory mechanisms in cell — mediated immune responses. I. Regulation of mixed lymphocyte reactions by alloantigen-

- activated thymus-derived lymphocytes.— *J. Exptl. Med.*, 1974, v. 140, p. 1588.
- Rode H. N., Votila M., Gordon J. Blastogenic factor (BF) in primary and secondary CML reactions.— *Fed. Proc.*, 1976, v. 35, p. 822.
- Rollinghoff M., Pfizenmaier K., Starzinski-Powitz A. e. a. Generation of cytotoxic T-lymphocytes against Ly-alloantigen.— *Scand. J. Immunol.*, 1977, v. 6, p. 1121.
- Rollinghoff M., Schrader J., Wagner H. Effect of azathioprine and cytosine arabinoside on humoral and cellular immunity in vitro.— *Clin. Exptl. Immunol.*, 1973, v. 15, p. 261.
- Rosenau W. Interaction of lymphoid cells with target cells in tissue culture.— In: *Cell-Bound Antibodies*/Ed. by B. Amos and Koprowski. Philadelphia, 1963, p. 75.
- Rosenau W. Target cell destruction.— *Fed. Proc.*, 1963, v. 27, p. 34.
- Rosenau W., Moon H. D. Lysis of homologous cells by sensitized lymphocytes in tissue culture.— *J. Nat. Cancer Inst.*, 1961, v. 27, p. 471.
- Rosenau W., Stites D., Jemtrud G. Elaboration of lymphotoxin by freshly isolated human T-lymphocytes and continuous lymphoid-cell lines.— *Cell. Immunology*, 1979, v. 43, p. 235.
- Rosenberg S. A., Levy R., Schechter B. e. a. A rapid microassay of cellular immunity in the guinea pig and mouse.— *Transplantation*, 1972, v. 13, p. 541.
- Rosenberg S. A., Schwarz S., Spiess P. J. In vitro growth of murine T-cells. II. Growth of in vitro sensitized cells. cytotoxic for alloantigens.— *J. Immunol.*, 1978, v. 121, p. 1951.
- Rosenberg S. A., Spiess P. J., Schwarz S. In vitro growth of murine T-cells. I. Production of factors necessary for T-cell growth.— *J. Immunol.*, 1978, v. 120, p. 1946.
- Ross M. W., Tiangco G. J., Horn P. e. a. The LT-system in experimental animals. III Physicochemical characteristics and relationships of lymphotoxin (LT) molecules released in vitro by activated lymphoid cells from several animal species.— *J. Immunol.*, 1979, v. 123, p. 325.
- Rothstein T. L., Mage M., Jones G. e. a. Cytotoxic T-lymphocyte sequential killing of immobilized allogeneic tumor target cells measured by time-lapse microcinematography.— *J. Immunol.*, 1978, v. 121, p. 1652.
- Rowe W. P., Hartley J. W., Brodsky J. e. a. Complement fixation with on mouse tumor viruses (polyoma).— *Science*, 1958, v. 128, p. 1338.
- Rubens R. P., Henney C. S. Studies on the mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. VIII. The use of Con A to delineate a distinctive killer T cell subpopulation.— *J. Immunol.*, 1977, v. 118, p. 180.
- Rubin B., Hertel-Wulf B. Biological significance of Fc receptor-bearing cells among activated T-lymphocytes.— *Scand. J. Immunol.*, 1974, v. 4, p. 451.
- Ruscetti F. W., Morgan D. A., Gallo R. C. Functional and morphologic characterization of human T-cells continuously grown in vitro.— *J. Immunol.*, 1977, v. 119, p. 131.
- Rygaard J., Poulsen C. The absence of spontaneous tumors in nude mice.— *Proc. 1st Int. Workshop nude mice.*, Scantican — Stuttgart, 1974, p. 293.
- Ryser J. E., Cerottini J. C., Brunner K. T. Generation of cytolytic T-lymphocytes in vitro. IX Induction of secondary CTL responses in primary long-term MLC by supernatants from secondary MLC.— *J. Immunol.*, 1978, v. 120, p. 370.
- Ryser J. E., Cerottini J. C., Brunner K. T. Cell-mediated immunity to antigens associated with murine sarcoma virus induced tumors: augmentation of cytolytic T-lymphocyte activity by successive specific and nonspecific stimulation in vitro.— *Eur. J. Immunol.*, 1979, v. 9, p. 179.
- Ryser J.-E., McDonald H. R. Limiting dilution analysis of alloantigen-reactive T-lymphocytes. I. Comparison of precursor frequencies for proliferative and cytolytic responses.— *J. Immunol.*, 1979a, v. 122, p. 1691.
- Ryser J.-E., McDonald H. R. Limiting dilution analysis of alloantigen-reactive

- tive T-lymphocytes. III. Effect of priming on precursor frequencies.—*J. Immunol.*, 1979, v. 123, p. 128.
- Ryser J., McDonald H., Engers H., e. a. Specific and non-specific activation of cytolytic T-lymphocytes in vitro.— In: *Proc. 4th. Eur. Immunol. Meeting. Budapest.* eds. Gergely, Medgyesi, Hollan, 1979, p. 157.
- Ryser J.-E., Sordat B., Cerottini J.-C. e. a. Mechanism of target cell lysis by cytolytic T-lymphocytes. I. Characterization of specific lymphocyte-target cell conjugates separated by velocity sedimentation.— *Eur. J. Immunol.*, 1977, v. 7, p. 110.
- Di Sabato G., Chen D.-M., Erickson J. W. Production by murine spleen cells of an activity stimulating the FHA-responsiveness of thymus lymphocytes.— *Cell. Immunol.*, 1975, v. 17, p. 495.
- Sachs D. H., Cone J. L. A mouse «B»-cell alloantigen determined by gene(s) linked to the major histocompatibility complex.— *J. Exptl. Med.*, 1973, v. 138, p. 1289.
- Sakakura T., Nishizuka G. Effect of thymectomy on mammary tumorigenesis, noduligenesis, and mammogenesis in the mouse.— *Gan. Jap. J. Cancer Res.*, 1967, v. 58, p. 441.
- Sakakura T., Nishizuka G. Thymic control mechanism in ovarion development: reconstitution of ovarian dysgenesis in thymectomized mice by replacement with thymic and other lymphoid tissues.— *Endocrinology*, 1972, v. 90, p. 431.
- Sakane T., Green I. Specificity and suppressor function of human T-cells responsive to autologous non-T cells.— *J. Immunol.*, 1979, v. 123, p. 584.
- Sanderson C. J. The mechanism of T-cell mediated cytotoxicity. I. The release of different cell components.— *Proc. R. Soc. Lond. B*, 1976a, v. 192, p. 221.
- Sanderson C. J. The mechanism of T-cell mediated cytotoxicity. II. Morphological studies of cell death by time lapse microcinematography.— *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 1976b, v. 192, p. 241.
- Sanderson C. J. The mechanism of T-cell mediated cytotoxicity. VIII Zeiosis corresponds to irreversible phase (programming for lysis) in steps leading to lysis.— *Immunology*, 1981, v. 42, p. 201.
- Sanderson C. J., Glauert A. M. The mechanism of T-cell mediated cytotoxicity. V. Morphological studies by electron microscopy.— *Proc. R. Soc. Lond. B*, 1977, v. 198, p. 315.
- Sanderson C. J., Glauert A. M. The mechanism of T-cell mediated cytotoxicity VI. T-cell projections and their role in target cell killing.— *Immunology*, 1979, v. 36, p. 119.
- Sanderson C., Thomas J. The mechanism of T-cell mediated cytotoxicity. III. Changes in target cell susceptibility during the cell cycle.— *Proc. R. Soc. Lond.*, 1976, v. 194, p. 417.
- Sanderson C. J., Thomas J. A. The mechanism of T-cell mediated cytotoxicity. VII. Lysis of isolated cytoplasts and karyoplasts.— *Immunology*, 1979, v. 37, p. 373.
- Sanderson R., Vesole D., Yakway Y., e. a. Lymphocyte growth factor made by a human lymphoid cell line.— *Immunol. Rev.*, 1980, v. 51, p. 177.
- Schachter H., Roden L. The biosynthesis of animal glycoproteins. Metabolic conjugation and metabolic hydrolysis-3/Ed. by W. H. Fischman. N. Y.: Academic Press, 1973, p. 1.
- Schendel D. J., Alter B. J., Bach F. H. The involvement of LD-and SD-region differences in MLC and CML: a three-cell system.— *Transplant. Proc.*, 1973, v. 5, p. 1651.
- Schendel D. J., Bach F. H. Genetic control of cell-mediated lympholysis in mouse.— *J. Exptl. Med.* 1974, v. 140, p. 1534.
- Schik B., Berke G. Is the presence of serologically-defined target cell antigens sufficient for binding of cytotoxic T-lymphocytes? — *Transplantation* 1978, v. 26, p. 14.
- Schik B., Berke G. Cellular activities necessary for specific binding of cytotoxic T lymphocytes and target cells.— *Transplant. Proc.*, 1979, v. XI, p. 800.

- Schilling R. M., Phillips R. A., Miller R. G. Requirement for non-T cells in the generation of cytotoxic T-lymphocytes in vitro. I. Use of nude mice as source non-T cells.— *J. Exptl. Med.*, 1976, v. 144, p. 241.
- Schliwa M. The role of divalent cations in the regulation of microtubule assembly.— *J. Cell Biol.*, 1976, v. 70, p. 527.
- Schmidt M., Good R. Transplantation of human cancers to nude mice and effects of thymus grafts.— *J. Nat. Cancer Inst.*, 1975, v. 55, p. 81.
- Schreier M., Andersson J., Leruhardt W. Antigen-specific T-helper cells stimulate H-2 compatible and incompatible B-cell blasts polyclonally.— *J. Exptl. Med.*, 1980, v. 151, p. 20.
- Scothorne R. J., Mc Gregor G. A. Cellular changes in lymph nodes and spleen following skin homografting in rabbit.— *J. Anat.*, 1955, v. 89, p. 283.
- Schuurman Ruud K. B., Gelfand E. W., Matheson D. e. a. Identification of Ia on a subpopulation of human T-lymphocytes that stimulate in a mixed lymphocyte reaction.— *J. Immunol.*, 1980, v. 124, p. 1924.
- Seeman P. Ultrastructure of membrane lesions in immune lysis, osmotic lysis and drug induced lysis.— *Fed. Proc.*, 1974, v. 33, p. 2116.
- Sellin D., Wallach D. F. N., Fisher H. Intercellular communication in cell-mediated cytotoxicity. Fluorescein transfer between H-2^d target and H-2^b lymphocytes in vitro.— *Eur. J. Immunol.*, 1971, v. 1, p. 453.
- Sener A., Malaissie W. J. The stim — secretion coupling of glucose induced insulin release. XXXIX. Long term effect of K⁺ deprivation upon insulin biosynthesis and release.— *Endocrinology*, 1980, v. 106, p. 778.
- Sharkey F., Fogh J. Incidence and pathological features of spontaneous tumors in athymic nude mice.— *Cancer Res.*, 1979, v. 39, p. 833.
- Sharkey F., Fogh J. Metastasis of human tumors in athymic nude mice.— *Int. J. Cancer*, 1979, v. 24, p. 733.
- Shaw S., Biddison W. E. HLA — linked genetic control of the specificity of human cytotoxic T-cell responses to influenza virus.— *J. Exptl. Med.*, 1979, v. 149, p. 565.
- Shaw J., Caplan B., Paetkau V. e. a. Cellular origins of costimulator and its activity in cytotoxic T-lymphocyte responses.— *J. Immunol.*, 1980.
- Shaw J., Monticone V., Mills G. e. a. Effect of costimulator on immune responses in vitro.— *J. Immunol.*, 1978a, v. 120, 1974.
- Shaw J., Monticone V., Paetkau V. Partial purification and molecular characterization of a lymphokine (costimulator) required for the mitogenic response of mouse thymocytes in vitro.— *J. Immunol.*, 1978b, 120, p. 1967.
- Shearer G. M. Cell mediated cytotoxicity to trinitrophenyl-modified syngeneic lymphocytes.— *Eur. J. Immunol.*, 1974, v. 4, p. 527.
- Shearer W. T., Philpott G. W., Parker C. W. Humoral immunostimulation. II. Increased nucleoside incorporation DNA synthesis and cell growth in L-cell treated with anti-T-cells antibody.— *Cell Immunol.*, 1975, v. 17, p. 447.
- Shin H. S., Johnson R. J., Pasternack G. R. e. a. Mechanisms of tumor immunity: the role of antibody and nonimmune effectors.— *Prog. Allergy*, 1978, v. 25, p. 163.
- Shore A., Dosch H.-M., Gelfand E. W. Induction and separation of antigen-dependent T-helper and T-suppressor cells in man.— *Nature*, 1978, v. 274, p. 586.
- Shortman K., Brunner K. T., Cerottini J. C. Separation of stages in the development of the T cells involved in cell mediated immunity.— *J. Exptl. Med.*, 1972, v. 135, p. 1375.
- Shreffler D. C., David C. S. The H-2 major histocompatibility complex and I immune response region: genetic variation, function and organization.— *Adv. Immunol.*, 1975, v. 20, p. 125.

- Siliciano R., Henney C. Studies on the mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. X. Enucleated cells as target for cytotoxic attack.— *J. Immunol.*, 1978, v. 121, p. 186.
- Simon M., Eichmann K. T-cell subsets participating in the generation of cytotoxic T-cells. Springer. Semin.— *Immunopathol.*, 1980, v. 3, p. 39.
- Simon P. L., Farrar J. J., Kind P. D. The xenogeneic effect induction of cell-mediated cytotoxicity by alloantigen-stimulated thymocytes in the presence of xenogeneic reconstitution factor.— *J. Immunol.*, 1977, v. 118, p. 1129.
- Simon P. L., Farrar J. J., Kind P. D. Biochemical relationship between murine immune interferon and killer cell helper factor.— *J. Immunol.*, 1979, v. 122, p. 127.
- Simpson E., Gordon R., Taylor M. e. a. Micromethods for induction and assay of mouse mixed lymphocytes reactions and cytotoxicity.— *Eur. J. Immunol.*, 1976, v. 5, p. 451.
- Sjöberg O., Andersson J., Moller G. Reconstitution of the antibody response, in vitro of T cell-deprived spleen cells by supernatants from spleen cell cultures.— *J. Immunol.*, 1972, v. 109, p. 1379.
- Sjögren H. O., Borum K. Tumor-specific immunity in the course of primary polyoma and Rous tumor development in intact and immunosuppressed rats.— *Cancer Res.*, 1971, v. 31, p. 890.
- Sjögren H. O., Hellström I., Klein G. Resistance of polyoma virus immunized mice against transplantation of established polyoma tumors.— *Exptl. Cell Res.*, 1961, v. 23, p. 204.
- Smiecinski W., Gorski T. The induction of uterine cervical carcinoma in thymectomized mice.— *Folia Biol.*, 1968, v. 16, p. 211.
- Smith H. G., Harmel R. P., Hanna M. G. e. a. Regression of established intradermal tumors and lymph node metastases in guinea pigs after systemic transfer of immune lymphoid cells.— *J. Nat. Cancer Inst.*, 1977, v. 58, p. 1315.
- Smith J. B. Stimulation of autologous and allogeneic human T cells by B-cells occurs through separate B-cell antigen systems.— *Cell Immunol.*, 1978, v. 36, p. 203.
- Smith J. B., Pasternak R. D. Syngeneic mixed leucocyte reaction in mice: strain distribution, kinetics participating cells and absence in NZB mice.— *J. Immunol.*, 1978, v. 121, p. 1889.
- Smith J. B., Steiner R. L., Parker C. W. Human lymphocyte metabolism: effect of cAMP a noncyclic nucleotides on stimulation by phytohemagglutinin.— *J. clin. Invest.*, 1971, v. 50, p. 442.
- Smith K. A. Continuous cytotoxic T-cell lines. In contemp. Top. in Immunobiol. V. II/Eds Warner, Neel L., Plenum Publishing Corporation. N. Y. 1980.
- Smith K., Baker P., Gillis S., e. a. Functional and molecular characteristics of T-cell growth factor.— *Mol. Immunol.*, 1980.
- Smith K. A., Gillis S., Baker P. G. e. a. T-cell growth factor mediated T-cell proliferation.— *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1979, v. 332, p. 423.
- Smith A., Kendall. T-cell growth factor.— *Immunol. Rev.*, 1980, v. 51, p. 337.
- Smith R. T., Norcross M., Maino V. e. a. Helper mechanisms in T — cell activation.— *Immunol. Rev.*, 1980, v. 51, p. 193.
- Snell G. D., Cherry M. Loci determining sell surface alloantigens. In: Viruses and host genome in oncogenesis/Eds. P. Emmelot and Bentvelzen. Amsterdam: North-Holland. Publ., 1972, p. 221.
- Solter D., Damiano J. Teratocarcinomas rarely develop from embryos transplanted into athymic mice.— *Nature*, 1979, v. 278, p. 554.
- Somlyo A. P., Garfield R. E., Chacko S. e. a. Golgi organelle response to the antibiotic X537A.— *J. Cell Biol.*, 1975, v. 64, p. 425.
- Sondel P., Jacobson M., Bach F. Selective activation of human suppressor cells by a nonproliferative stimulus.— *Eur. J. Immunol.*, 1977, v. 7, p. 38.
- Sopori M. L., Alter B. J., Bach F. H. e. a. Cell-free factor substitute for «sig-

- nal 2 in generating cytotoxic reactions.— *Eur. J. Immunol.*, 1977, v. 7, p. 823.
- Sopori M., Bernstein A., Bach F. In vitro sensitisation of thymocytes: Role of H-2 region determinants and cell-free mixed leukocyte culture supernates in generation of cytotoxic responses.— *J. Exptl. Med.*, 1978, v. 148, p. 953.
- Sørensen S. F. The mixed lymphocyte culture interaction.— *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B, Suppl.*, 1972, p. 230.
- Spence J. W., Sheppard M., Kraicer J. Release of growth hormone from purified somatotrophs: interrelation between Ca^{2+} and adenosine 3' 5'-monophosphate.— *Endocrinology*, 1980, v. 106, p. 764.
- Spiro R. G. Glycoproteins.— *Ann. Rev. Biochem.*, 1970, v. 39, p. 599.
- Spudich J. A., Lin S. Cytochalasin B, its interaction with actin and actomyosin from muscle.— *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1972, v. 69, p. 442.
- Squartini F. Mouse mammary tumorigenesis by mammary tumor virus in the absence of thymus, spleen or both organs.— *J. Med. Sci.*, 1971, v. 7, p. 26.
- Stein O., Stein Y. Lipid synthesis, intracellular transport, storage and secretion I—Electron microscopic radioautographic study of liver after injection of tritiated palmitate or glycerol in fasted and ethanol-treated rats.— *J. Cell Biol.*, 1967, v. 33, p. 319.
- Stevens R. H., Williamson A. R. Translation control of immunoglobulin synthesis. I. Repression of heavy chain synthesis.— *J. Mol. Biol.*, 1973, v. 78, p. 505.
- Stobo J. D., Paul W. E., Henney C. S. Functional heterogeneity of murine lymphoid cells. IV. Allogeneic mixed lymphocyte reactivity and cytolytic activity as functions of distinct T-cell subsets.— *J. Immunol.*, 1973, v. 110, p. 652.
- Stout R. D., Herzenberg L. A. The Fc-receptor on thymus — derived lymphocytes. I. Detection of a subpopulation of murine T-lymphocytes bearing the Fc receptor.— *J. Exptl. Med.*, 1975, v. 142, p. 611.
- Stout R. D., Waksal S. D., Herzenberg L. A. The Fc-receptor on thymus-derived lymphocytes. III. Mixed lymphocyte reactivity and cell-mediated lympholytic activity of Fc^- and Fc^+ T-lymphocytes.— *J. Exptl. Med.*, 1976, v. 144, p. 54.
- Strausser J. L., Rosenberg S. A. In vitro growth of cytotoxic human lymphocytes. I. Growth of cells sensitized in to alloantigens.— *J. Immunol.*, 1978, v. 121, p. 1491.
- Stulting R. D., Berke G. Nature of lymphocyte-tumor interaction. A general method for cellular immunoabsorption.— *J. Exptl. Med.*, 1973, v. 137, p. 932.
- Stulting R. D., Todd R. F. III, Amos D. B. Lymphocyte-mediated cytotoxicity of allogeneic tumor cell in vitro. II. Binding of cytotoxic lymphocytes to formaldehyde fixed target cells.— *Cell Immunol.*, 1975, v. 20, p. 54.
- Stutman O. Nude mice.— In: *Advances in cancer research*. V. 22, New York — San Francisco — London: Academic Press, 1975a, p. 302.
- Stutman O. Tumor development after polyoma infection in athymic nude mice.— *J. Immunol.*, 1975b, v. 114, p. 1213.
- Stutman O. Spontaneous tumors in nude mice: Effect of the viable yellow gene.— *Exptl. Cell Biol.*, 1979, v. 2, p. 129.
- Sullivan K. A., Berke G., Amos D. B. ^{51}Cr leakage from and uptake of trypan blue by target-cells undergoing cell mediated destruction.— *Transplantation*, 1973, v. 13, p. 627.
- Sullivan K. A., Flaherty L. The Ia-antigen on lymphocyte subpopulations. Mixed lymphocyte culture and cell-mediated lympholysis.— *J. Immunol.*, 1979, v. 123, p. 2920.
- Sura S. N., Chernyachovskaja I. Yu., Kadagbidze Z. G. e. a. Cytochemical study of interaction between lymphocytes and target cells in tissue culture.— *Exptl. Cell Res.*, 1967, v. 48, p. 656.

- Szakal A. K., Hanna M. G. Immune suppression and carcinogenesis in hamsters during topical application of 7,12-dimethylbenz (a) anthracene.— *J. Nat. Cancer Inst.*, 1972, v. 35, p. 173.
- Szent-Györgui A. Cell division and cancer.— *Science*, 1965, v. 143, p. 34.
- Tada T., Taniguchi M., David C. Suppressive and enhancing T-cell factors as I-region gene products: properties and the subregion assignment.— In: *Cold Spring Harbor Sump. quant. Biol.*, 1977, v. 41, p. 119.
- Tada T., Taniguchi M., Tokuhisa T. In: *Ir-genes and Ia-antigens*/Ed by H. McDewitt. N. Y.: Academic Press, 1978, p. 517.
- Takatsu K., Tominaga A., Hamaoka T. Antigen-induced T cell-replacing factor (TRF). L. Functional characterization of a TRF-producing helper T-cell subset and genetic studies on TRF production.— *J. Immunol.*, 1980, v. 124, p. 2414.
- Taniguchi M., Tokuhisa T. Cellular consequences in the suppression of antibody response by the antigen-specific T-cell factor.— *J. Exptl. Med.*, 1980, v. 151, p. 517.
- Tartakoff A. M., Vassalli P. Plasma cell immunoglobulin secretion arrest in accompanied by alterations of the Golgi complex.— *J. Exptl. Med.*, 1977, v. 146, p. 1977.
- Tartof D., Fitch F. W. Immunologically specific cytotoxic activity induced in long-term mixed leukocyte culture cells by concanavalin A.— *J. Immunol.*, 1977, v. 118, p. 43.
- Taswell C., Mc Donald H. R., Cerrottini J. C. Limiting dilution analysis of alloantigen-reactive T-lymphocytes. II. Effect of cortisone and cyclophosphamide on cytolytic T-lymphocyte precursors frequencies in the thymus.— *Thymus*, 1979, v. 1, p. 119.
- Taylor R., Duffus W., Raff M. e. a. Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by antiimmunoglobulin antibody.— *Nature (Lond.)* 1971, v. 33, p. 225.
- Teh H. S., Harley E., Phillips R. A. e. a. Quantitative studies on the precursors of cytotoxic lymphocytes. I. Characterization of a clonal assay and determination of the size of clones derivated from single precursors.— *J. Immunol.*, 1977a, v. 118, p. 1049.
- Teh H. S., Phillips R., Miller R. Quantitative studies on the precursors of cytotoxic lymphocytes. II. Specificity of precursors responsive to alloantigens and to concanavalin A.— *J. Immunol.*, 1977b, v. 118, p. 1057.
- Teh H. S., Phillips R. A., Miller R. G. Quantitative studies on the precursors of cytotoxic lymphocytes. III. The lineage of memory cells.— *J. Exptl. Med.*, 1977b, v. 146, p. 1280.
- Terplitz R. L., Mazie J. C., Gerson J. e. a. The effects of microtubular binding agents on secretion of IgM anti-antibody.— *Exptl. Cell Res.*, 1975, v. 9, p. 392.
- Theodosis D. T., Dreifuss J. J., Orci L. A freeze-fracture study of membrane events during neurohypophysial secretion.— *J. Cell Biol.*, 1978, v. 78, p. 542.
- Thiernes N., David A., Bernard J. e. a. Activite phosphatasique acide de la cellule T. cytolytique au cours du processus de cytolyse.— *C. R. Acad. Sc. Paris*, 1977, v. 285, p. 713.
- Thiery J. P. Etude sur le Plasmocyte en contraste de phase et en Microscopie Electronique. III. Plasmacytes a corps de Russel et a cristaux.— *Rev. Hematol.*, 1958, v. 13, p. 61.
- Thyberg J., Moskalewski S., Friberg U. Effects of colchicine and vinblastine on the phytohaemagglutinin-induced transformation of lymphocytes.— *J. Cell. Sci.*, 1977, v. 27, p. 183.
- Ting R. C. Tumor induction in thymectomized rats by murine sarcoma virus (Moloney) and properties of the induced virus — free tumor cells.— *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1967, v. 126, p. 778.
- Ting R. C., Law L. W. Thymus function and carcinogenesis.— In: *Progr. Exp. Tumor Res.* Karger, Basel. V. G. N. Y., 1967, p. 165.
- Todd R. Functional characterization of membrane components of cytotoxic

- peritoneal exudate T-lymphocytes. II. Trypsin sensitivity of the killer cell receptor.— *Transplantation*, 1975, v. 20, p. 314.
- Toth M. K., Granger G. A. The human lymphotoxin system. VI. Identification of various saccharides on LT molecules and their contribution to cytotoxicity and charge heterogeneity.— *Mol. Immunol.*, 1979, v. 16, p. 671.
- Todd R., Stulting R. D., Berke G. Mechanism of blocking by hyperimmune serum of lymphocyte-mediated cytotoxicity of allogeneic tumor cells.— *Cancer Res.*, 1973, v. 33, p. 3203.
- Tralka S., Costa J., Sindelar W. e. a. Spontaneous lymphosarcoma arising in a nude mouse: characterization in vivo and in vitro.— *J. Nat. Cancer Inst.*, 1977, v. 58, p. 977.
- Uhr J. W. Intracellular events underlying synthesis and secretion of immunoglobulin.— *Cell Immunol.*, 1970, v. 1, p. 228.
- Uotila M., Rode H. N., Gordon J. Blastogenic factor: its role in the mixed leukocyte culture reaction.— *Eur. J. Immunol.*, 1978, v. 8, p. 133.
- Vandeputte M. The effect of heterologous antilymphocytic serum on the oncogenic activity of polioma virus.— *Life Sci.*, 1968, v. 7, p. 855.
- Vassali P., Lisowska-Bernstein B., Lamm M. E. Cell-free synthesis of rat immunoglobulin. III. Analysis of the cell — free made chains and of their mode of assembly.— *J. mol. Biol.*, 1971, v. 56, p. 1.
- Vietta E. S., Uhr J. W. Cell surface immunoglobulin. V. Release from murine splenic lymphocytes.— *J. Exptl. Med.*, 1972, v. 136, p. 576.
- Vietta E., Uhr J. Immunoglobulin-receptors revisited.— *Science*, 1975, v. 189, p. 964.
- Vredevoe D. L., Hays E. F. Effect of antilymphocytic and antithymocytic sera on the development of mouse lymphoma.— *Cancer Res.*, 1969, v. 29, p. 1685.
- Wagner H. The correlation between the proliferative and the cytotoxic responses of mouse lymphocytes to allogeneic cells in vitro.— *J. Immunol.*, 1972, v. 109, p. 630.
- Wagner H. Cell-mediated immune response in vitro. IV. Metabolic studies on cellular immunogenicity.— *Eur. J. Immunol.*, 1973, v. 3, p. 84.
- Wagner H., Boyle W. Subcellular mouse alloantigens cytotoxic immune — responses and specific blocking in vitro.— *Nature New Biol.*, 1972, v. 240, p. 92.
- Wagner H., Feldmann M., Boyse W. e. a. Cell mediated immune responses in vitro. IIIa Requirement for macrophages in cytotoxic reactions against cell bound and subcellular alloantigens.— *J. Exptl. Med.*, 1972, v. 136, p. 331.
- Wagner H., Götze D., Ptschelinzew L. e. a. Induction of cytotoxic T-lymphocytes against I-region-coded determinants: in vitro evidence for a third histocompatibility locus in the mouse.— *J. Exp. Med.*, 1975, v. 142, p. 1477.
- Wagner H., Hardt C., Bartlett R., e. a. Studies on cytotoxic immune responsiveness of thymocytes. I. Precursor cells of alloreactive and H-2 restricted cytotoxic T-lymphocytes reside within the peanut agglutinin binding thymocyte subset. 1980.
- Wagner H., Harris A. W., Feldman M. Cell mediated immune response in vitro. II. The role of thymus-derived lymphocytes.— *Cell Immunol.*, 1972, v. 4, p. 39.
- Wagner H., Rollinghoff M. T cell-mediated cytotoxicity: discrimination between antigen recognition, lethal hit and cytotoxicity phase.— *Eur. J. Immunol.*, 1974, v. 4, p. 475.
- Wagner H., Rollinghoff M. Secondary cytotoxic allograft responses in vitro. II. Differentiation of memory T-cells into cytotoxic T-lymphocytes in the absence of cell proliferation.— *Eur. J. Immunol.*, 1976, v. 6, p. 15.
- Wagner H., Rollinghoff M., Nossal G. V. S. T-cell mediated immune responses induced in vitro: A probe for allograft and tumor immunity.— *Transplant. Rev.*, 1973, v. 17, p. 3.
- Wagner H., Rollinghoff M., Pfizenmaier K. e. a. T — T-cell interactions during in vitro cytotoxic T-lymphocyte (CTL) responses. II. Helper factor from

- activated Lyt 1+ T-cells is rate limiting in T-cell responses to nonimmunogenic alloantigen, ii in thymocyte responses to allogeneic stimulator 1, 2, 3+ T-subset.— *J. Immunol.*, 1980, v. 124, p. 1058.
- Wagner H., Rollinghoff M., Schawller R., e. a. T-cell-derived helper factor allows Ly-1, 2, 3 thymocytes to differentiate into cytotoxic T-lymphocytes.— *Nature*, 1979, v. 280, p. 406.
- Wagner H., Strazinski-Powitz A., Pfizenmeier K. e. a. T — T-cell collaboration during in vivo responses to antigens coded by the peripheral and central region of the MHC.— *Nature*, 1976, v. 263, p. 235.
- Waisenberg R. C., Timasheff S. N. Aggregation of microtubule subunit protein: the effect of divalent cations, colchicine, and vinblastine.— *Biochemistry*, 1970, v. 9, p. 4110.
- Walker S. M., Lee S. C., Lucas Z. J. Cytotoxic activity of lymphocytes. VI. Heterogeneity of cytotoxins in supernatants of mitogen-activated lymphocytes.— *J. Immunol.*, 1976, v. 116, p. 807.
- Walker S. W., Lucas Z. Autologic activity of lymphocytes. IV. Preparation of heterologous antibody to human lymphotoxin.— *J. Immunol.*, 1974, v. 113, p. 813.
- Watanabe T., Fathman C. G., Coutinho A. Clonal growth of T-cells in vitro. Preliminary attempts to a quantitative approach.— *Immunol. Rev.*, 1977, v. 35, p. 3.
- Watson J. Continuous proliferation of murine antigen — specific helper T-lymphocytes in culture.— *J. Exptl. Med.*, 1979, v. 150, p. 1510.
- Watson J. D., Aarden L., Lefkovits I. The purification and quantitation of helper T cell-replacing factors secreted by Concanavalin A-activated murine spleen cell.— *J. Immunol.*, 1979a, v. 122, p. 209.
- Watson J., Aarden L. A., Shaw J. e. a. Molecular and quantitative analysis of helper T-cell replacing factors on the induction of antigen-sensitive B-and T-lymphocytes.— *J. Immunol.*, 1979b, v. 122, p. 1633.
- Watson J., Gillis S., Marbrook J. e. a. Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. I. Purification of a class of murine lymphokines.— *J. Exptl. Med.*, 1979b, v. 150, p. 849.
- Watson J., Mochizuki D. Interleukin 2: A class of T-cell growth factors.— *Immunol. Rev.*, 1980, v. 51, p. 257.
- Weisenberg R. C. Changes in the organization of tubulin during meiosis in the eggs of the surf clam, *Spisula solidissima*.— *J. Cell Biol.*, 1972a, v. 54, p. 266.
- Weisenberg R. C. Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations.— *Science*, 1972b, v. 177, p. 104.
- Wekerle H., Kolsch E., Feldman M. T-cell recognition of cell-surface antigens. II. Antigen recognition is necessary yet not sufficient for triggering T cell-mediated immunity.— *Eur. J. Immunol.*, 1974, v. 4, p. 246.
- Wekerle H., Lonai P., Feldman M. Fractionation of antigen reactive cells on a cellular immunoadsorbent: factors determining recognition of antigens by T-lymphocytes.— *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1972, v. 69, p. 620.
- Whaley W. G., Dauwalder M., Kephart J. E. Golgi apparatus: influence of cell surfaces.— *Science*, 1972, v. 175, p. 596.
- Whetsel W. O., Bunge R. P. Reversible alterations in the Golgy complex of cultures neurons treated with an inhibitor of active Na and K transport.— *J. Cell Biol.*, 1969, v. 42, p. 490.
- Whur P., Herscovics A., Leblond C. P. Radioautographic visualization of the incorporation of galactose ³H and mannose ³H by rat thyroids in vitro in relation of the stages thyroglobulin synthesis.— *J. Cell Biol.*, 1969, v. 43, p. 289.
- Widmer M., McDonald H. Cytolytic T-lymphocyte precursors reactive against mutant K^b alloantigens are as frequent as those reactive against a whole foreign haplotypes.— *J. Immunol.*, 1980, v. 124, p. 48.
- Wigzell H. Quantitative titration of mouse H-2 antibodies using ⁵¹Cr-labelled target cells.— *Transplantation*, 1965, v. 3, p. 423.

- Wiletrout R., Frost P., Cummings G. Isotope release assay with the use of indium —111: advantage over chromium-51 long-term assays.— *J. Nat. Cancer Inst.*, 1978, v. 61, p. 183.
- Williams J. A., Wolf J. Cytochalasin B. inhibits thyroid secretion.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1971, v. 44, p. 422.
- Wilson D. B. The reaction of immunological activated lymphoid cells against homologous target tissue cells in vitro.— *J. Cell Comp. Phys.*, 1963, v. 6, p. 273.
- Wilson D. B. Quantitative studies on the behavior of sensitized lymphocytes in vitro. I. Relationship of the degree of destruction of homologous target cells to the number of lymphocytes and to the time of contact in culture and consideration of the effects of isoimmune serum.— *J. Exptl. Med.*, 1965, v. 122, p. 143.
- Wilson D. B., Nowell P. C. Quantitative studies on the mixed lymphocyte interaction in rats. IV. Immunologic potentiality of the responding cells.— *J. Exptl. Med.*, 1970, v. 131, p. 391.
- Wofsy L., Baker P. C., Thompson K. e. a. Hapten-sandwich labeling. I. A general procedure for simultaneous labeling of multiple cell surface antigens for fluorescence and electron microscopy.— *J. Exptl. Med.*, 1974, v. 140, p. 523.
- Wolos J., Davey F. T-cell subpopulations in the autologous and allogeneic mixed lymphocyte reaction.— *Cell. Immunol.*, 1979, v. 48, p. 415.
- Wood D. D. Comparison of the plaque stimulating and thymocyte stimulating activities derived from human monocytes.— *J. Immunol.*, 1979, v. 123, p. 2400.
- Wu S., Bach F. H., Auerbach R. Cell-mediated immunity : differential maturation of mixed leukocyte reaction and cell — mediated lympholysis.— *J. Exptl. Med.*, 1975, v. 142, p. 1301.
- Yamamoto R. S., Hiserodt J. C., Granger G. A. The human LT-system. V. A comparison of the relative lytic effectiveness of various MW human LT classes on ⁵¹Cr-labeled allogeneic target cells in vitro: enhanced lysis by LT-complexes associated with Ig-like receptor(s).— *Cell Immunol.*, 1979, v. 45, p. 261.
- Yamamoto R. S., Hiserodt J. C., Lewis J. E. e. a. The human LT-system, II Immunological relationships of LT-molecules released by mitogen activated human lymphocytes in vitro.— *Cell. Immunol.*, 1978, v. 38, p. 403.
- Yamashita U., Shevach E. M. The syngeneic mixed leukocyte reaction: the genetic requirements for the recognition of self resemble the requirements for the recognition of antigen in association with self.— *J. Immunol.*, 1980, v. 124, p. 1773.
- Yano K., Lucas Z. J. Cytotoxic activity of lymphocytes. VII. Cellular origin of lymphotoxin.— *J. Immunol.*, 1978, v. 120, p. 385.
- Yokoro K., Ito T. Role of host factors in induction of leukemia by radiation and virus.— *Acta Patol., Jap.*, 1968, v. 18, p. 362.
- Zagry D., Berbard J., Thierness N. e. a. Isolation and characterization of individual functionally reactive cytotoxic T-lymphocytes: conjugation, killing and recycling at the single cell level.— *Eur. J. Immunol.*, 1975, v. 5, p. 818.
- Zamecnik P., Long J. Growth of cultured cells from patients with Hodgkin's disease and transplantation into nude mice.— *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1977, v. 74, p. 754.
- Zinkernagel R. M., Doherty P. C. Immunological surveillance against altered self components by sensitized T-lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis.— *Nature*, 1974, v. 251, p. 547.

ПРИЛОЖЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ К МИКРОФОТОГРАФИЯМ

В — внутрицистенальный онкорнавирус; Ва — вакуоли мультивезикулярного тельца; Вг — внутримембранные гранулы; Вп — внеклеточное пространство; Г — гранулы; ГЭР — гранулярный эндоплазматический ретикулум; КМ — клетка-мишень; КС — кристаллоподобная структура; КТС — комплекс трубчатых структур; Л — липиды; М — митохондрия; МВТ — мультивезикулярное тельце; Ми — микроити; Мс — мембраносомы; Мт — микротрубочки; ОВ — опущенные везикулы; ОСГ — оболочка секреторной гранулы; ОЦЛ — оболочка цитолисомы; ОЯ — оболочка ядра ЦТЛ; П — поры ядерной оболочки; ПО — плазматическая оболочка; Р — рибосомы; Сг — секреторная гранула; ТС — трубчатая структура; УП — уропода; ФПО — фрагмент плазматических оболочек; ФТЦ — фрагмент цитолисомы; Ц — центриоль; ЦЛ — цитолисома; ЦТЛ — цитолитический Т-лимфоцит; Эр — эндоплазматический ретикулум; Я — ядро; GERL — Goldy Endoplasmatic Reticulum Lysosomes.

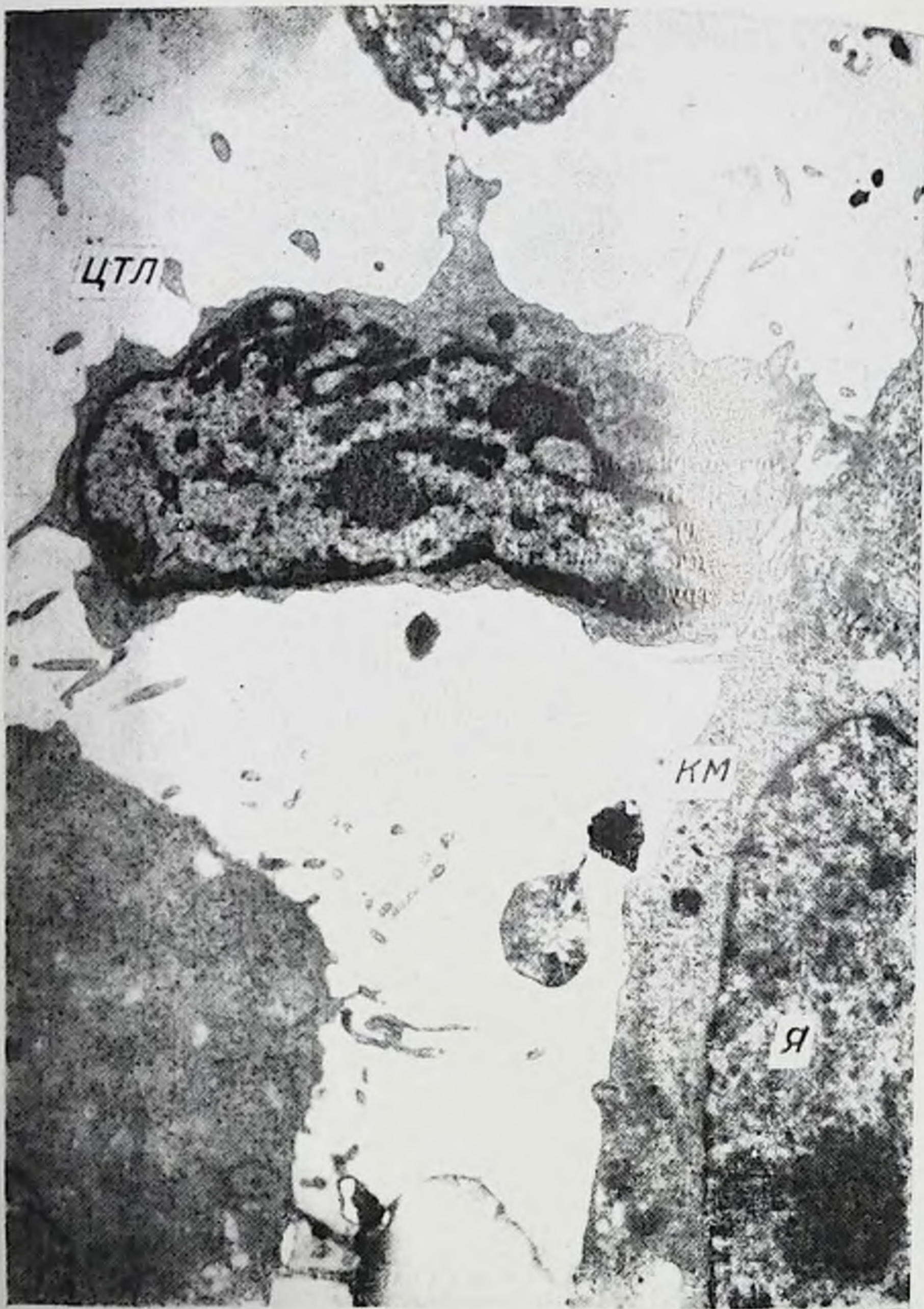


Рис. 1. Взаимодействие цитолитического Т-лимфобласта с клеткой-мишенью через 10 мин после адсорбции. Стрелкой обозначен участок цитоплазмы CTL, изображенный на следующем рисунке. $\times 20\ 000$.



Рис. 2. Фрагмент предыдущего рисунка. $\times 75\ 000$



Рис. 3. Ориентация комплекса Гольджи цитотоксического Т-лимфобласта вблизи зоны контакта с клеткой-мишенью. Виден отросток цитоплазмы ЦТЛ, проникающий внутрь клетки-мишени. $\times 50\ 000$.

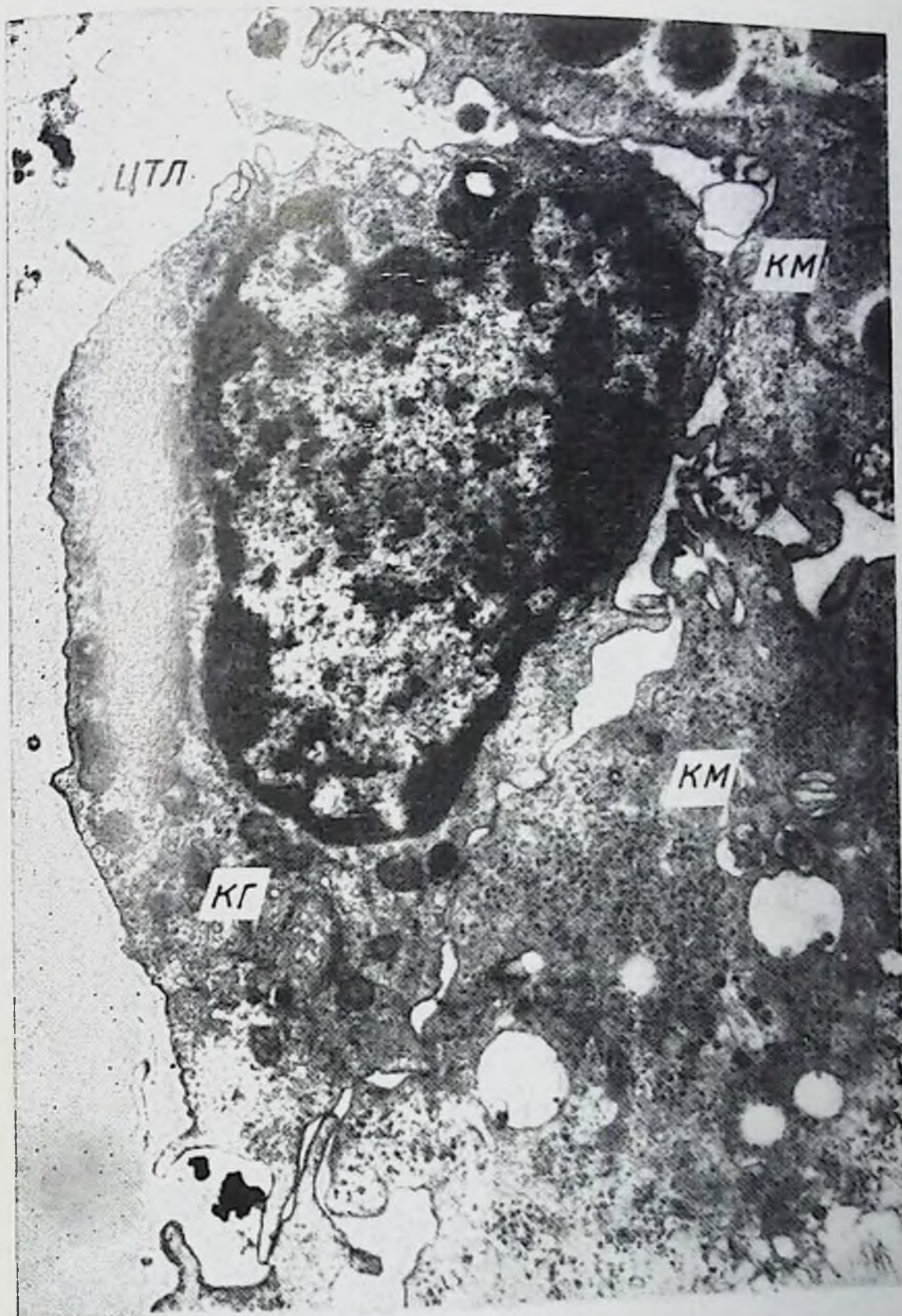


Рис. 4. Адсорбция цитолитического Т-лимфобласта на поверхности двух клеток-мишеней через 30 мин после начала взаимодействия. Виден хорошо развитый комплекс Гольджи. Стрелкой обозначен участок ЦТЛ, изображенный на следующем рисунке. $\times 25\ 000$.

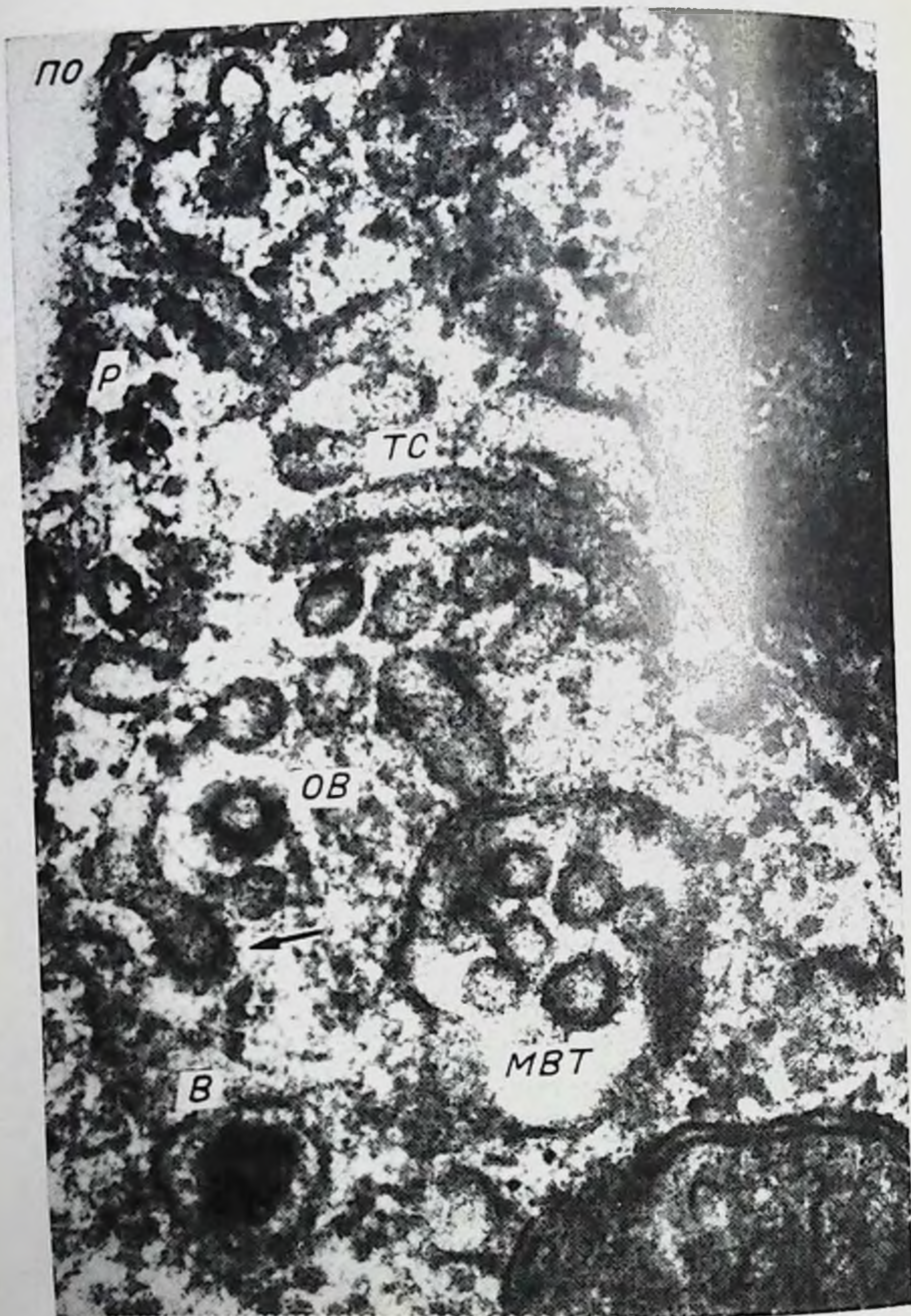


Рис. 5. Фрагмент предыдущей фотографии. Скопление трубчатых структур — элементов гладкоконтурного эндоплазматического ретикулаума. Виден внутрицистернальный онкорнавирус типа А и опушенная везикула на конце трубчатой структуры. $\times 150\,000$.



Рис. 6. Скопление опущенных везикул и трубчатых структур в цитоплазме ЦТЛ через 30 мин после контакта с клеткой-мишенью. $\times 150\,000$.



Рис. 7. Комплекс трубчатых структур в цитоплазме ЦТЛ через 30 мин после адсорбции на клетке-мишени. $\times 150\,000$.

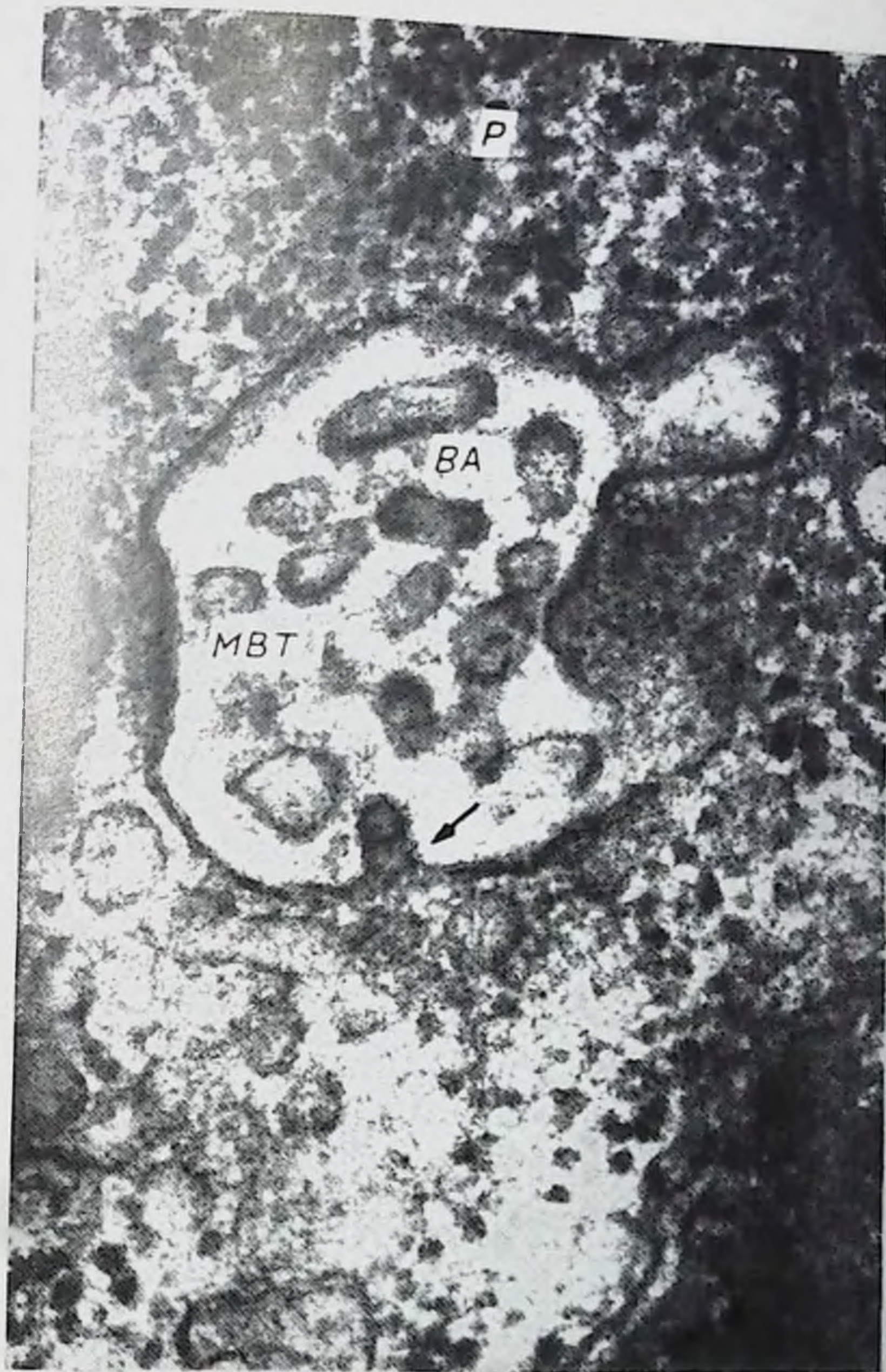


Рис. 8. Формирование мультивезикулярного тельца в цитоплазме ЦТЛ. Вакуоли мультивезикулярного тельца в процессе почкования фрагмента оболочки MBT с прилегающей зоной гиалязмы (обозначено стрелкой). $\times 200\ 000$.



Рис. 9. Мультивезикулярное тельце в цитоплазме ЦТЛ. Стрелкой обозначено место слияния трубчатой структуры с оболочкой MBT. $\times 200\,000$.



Рис. 10. Локализация трубчатых структур, морфологически сходных с GERL-комплексом в зоне комплекса Гольджи. Стрелкой обозначено место контакта этих структур. $\times 150\ 000$.



Рис. 11. Адсорбция ЦТЛ с активно развитыми трубчатыми структурами на клетке-мишени. $\times 25\ 000$.



Рис. 12. Фрагмент предыдущей фотографии. В зоне комплекса трубчатых структур формируются секреторные гранулы (обозначены стрелками). $\times 130\,000$.

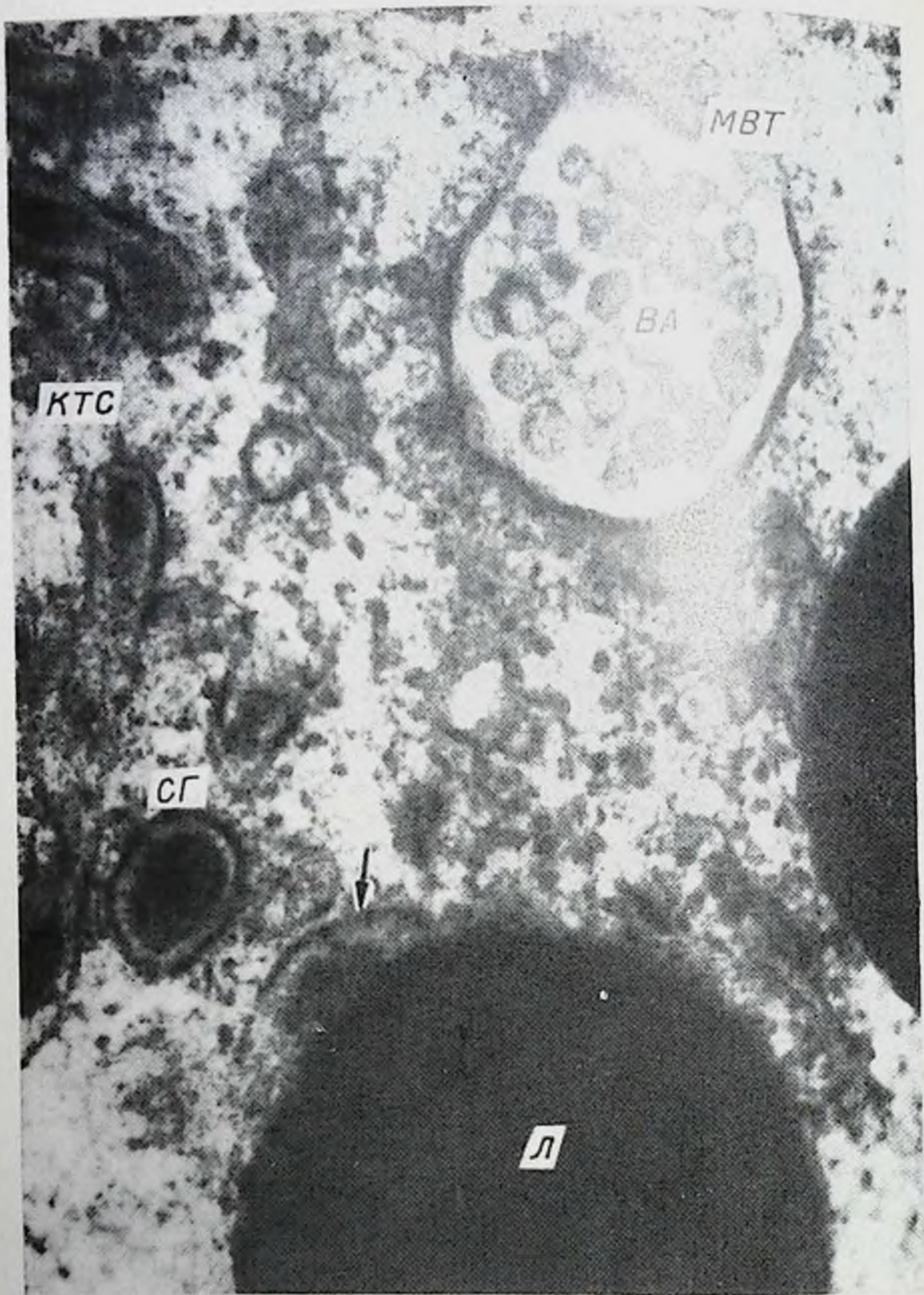


Рис. 13. Локализация мультивезикулярного тельца и отдельных секреторных гранул вблизи комплекса трубчатых структур. Стрелкой обозначена секреторная гранула, слившаяся с липидной вакуолью. $\times 120\ 000$.



Рис. 14. Фрагментация секреторных гранул в цитоплазме ЦТЛ (обозначено стрелкой) $\times 200\ 000$.

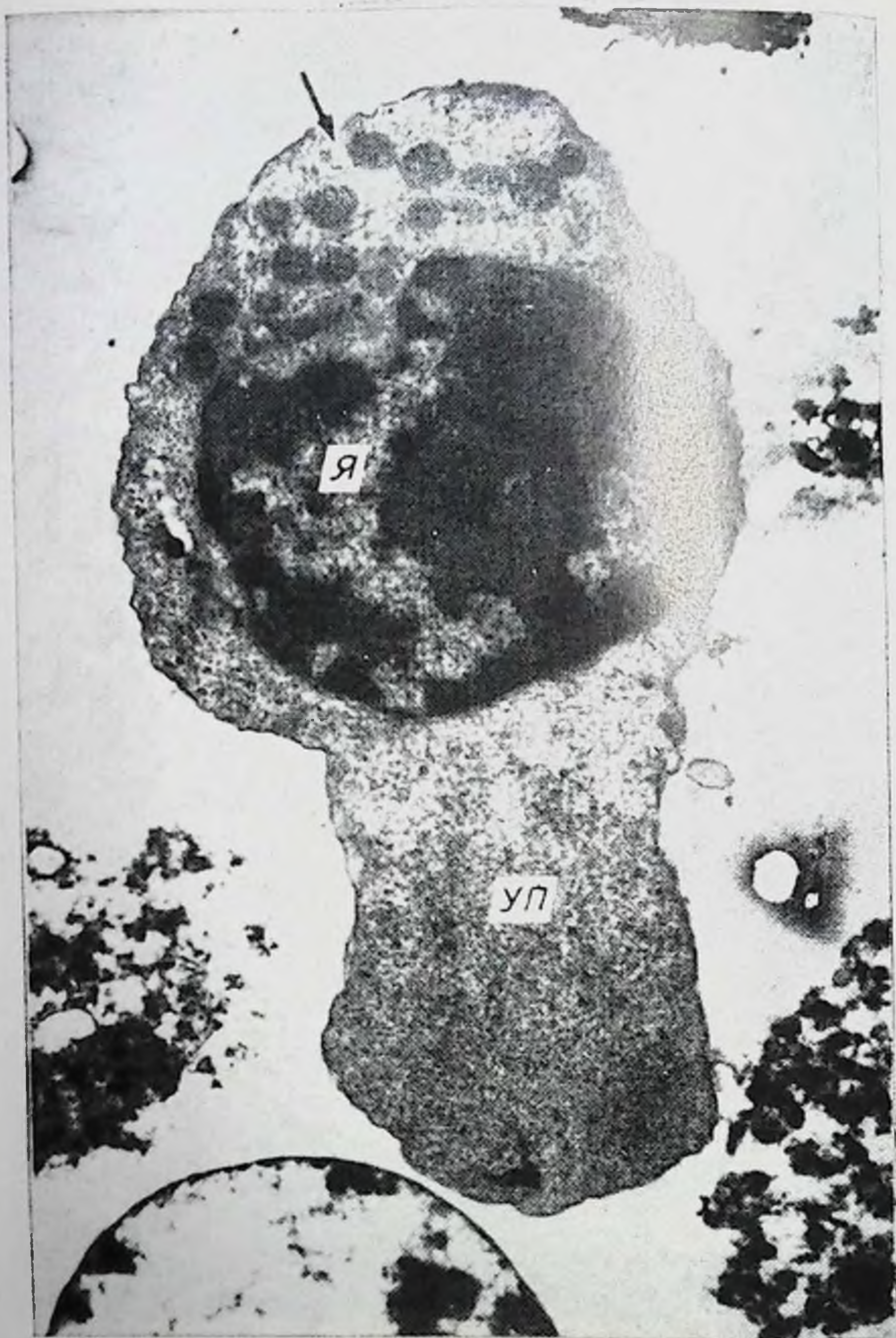


Рис. 15. Т-лимфоцит памяти стрелкой обозначен участок цитоплазмы лимфоцита, изображенный при большем увеличении на следующем рисунке. $\times 20\ 000$.

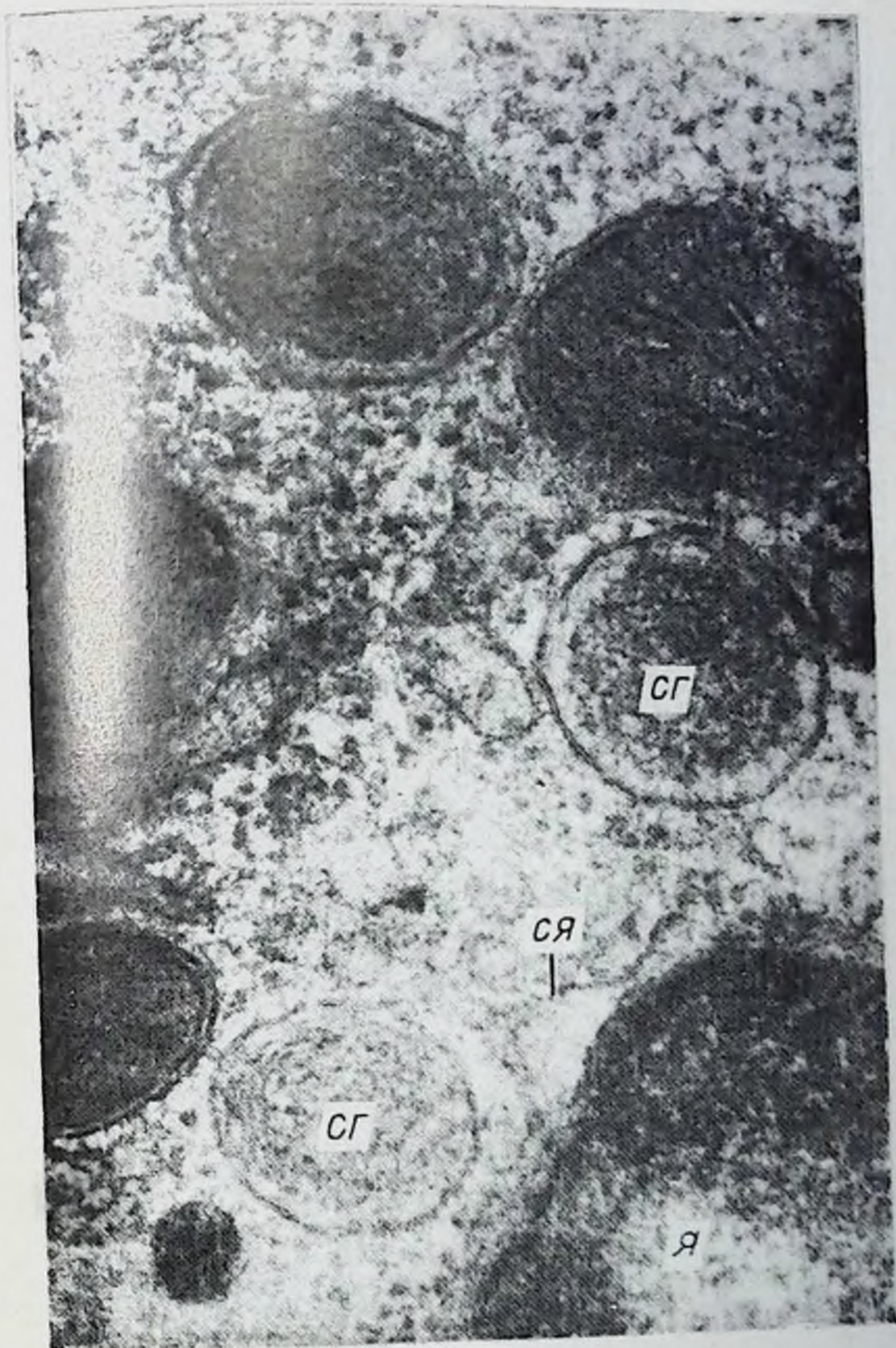


Рис. 16. Фрагмент предыдущей фотографии. Скопление секреторных гранул в цитоплазме Т клетки памяти. $\times 130\,000$.



Рис. 17. Взаимодействие Т-лимфоцита памяти с клеткой мишенью через час после адсорбции. Стрелкой обозначен участок цитоплазмы ТЛП, изображенный на следующем рисунке. $\times 12\ 000$.

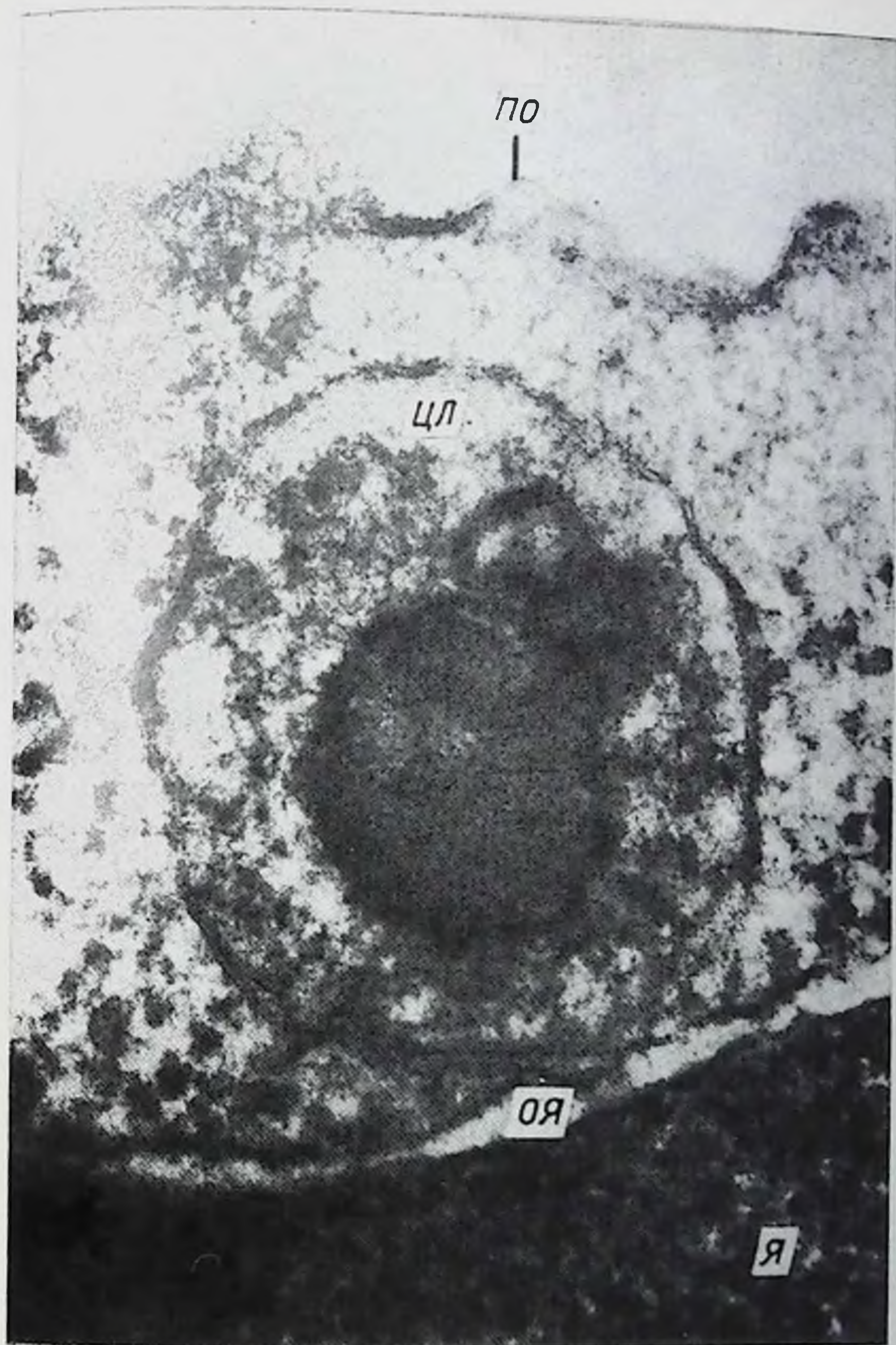


Рис. 18. Фрагмент предыдущего рисунка. Участок цитоплазмы Т-лимфоцита памяти (ТЛП). $\times 210\,000$.

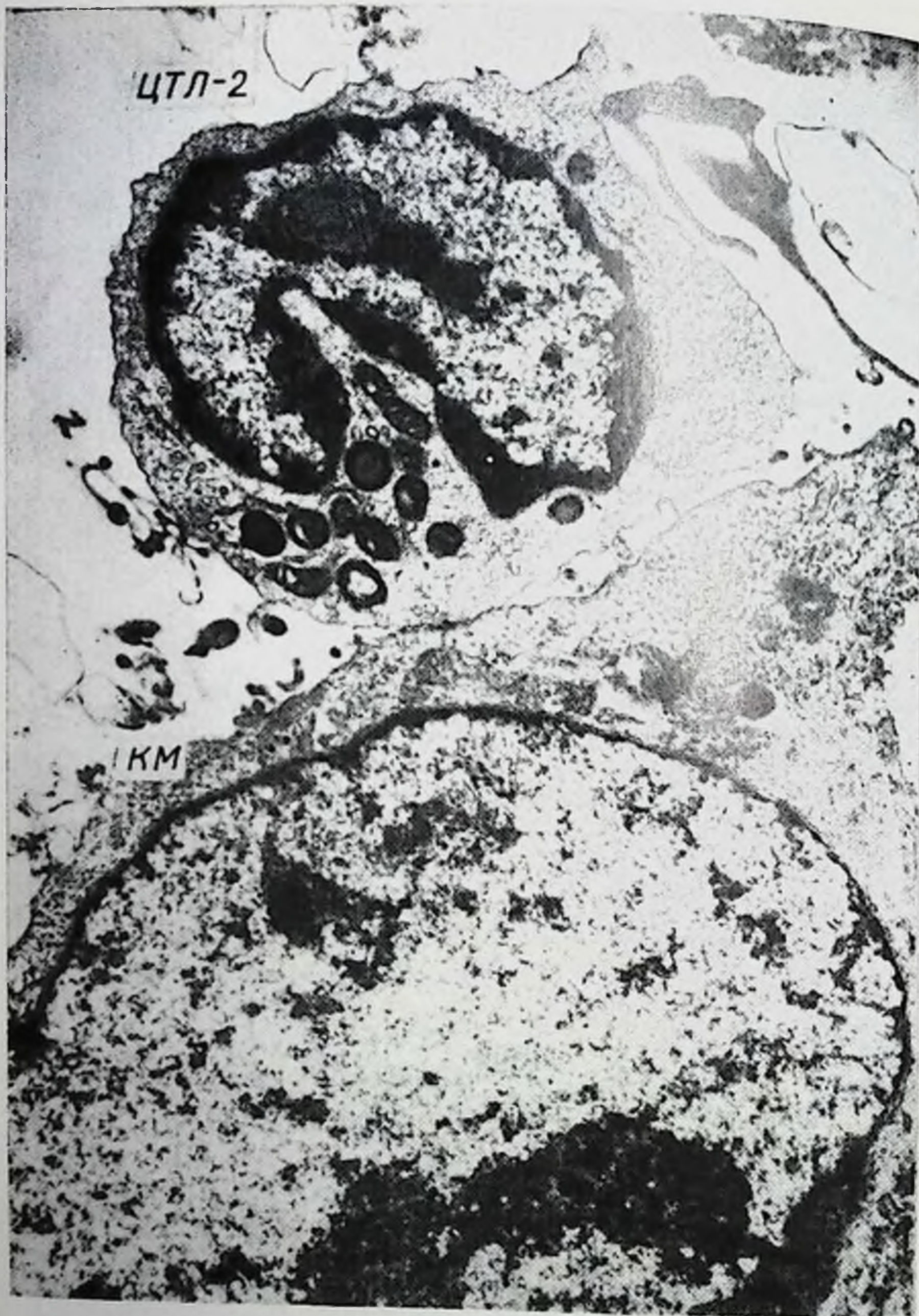


Рис. 19. Взаимодействие вторичного цитолитического Т-лимфоцита (CTL-2) с L-клеткой мишенью (KM) через 5 мин после адсорбции. $\times 15\ 000$.



Рис. 20. Скопление цитолисом (ЦЛ) и липидов (Л) в цитоплазме вторичного цитолитического Т-лимфоцита (ЦТЛ-2) через 5 мин после контакта с клеткой-мишенью (КМ). ЭР — эндоплазматический ретикулум; Я — ядро ЦТЛ-2. $\times 25\ 000$.



Рис. 21. Взаимодействие вторичного цитолитического Т-лимфоцита с клеткой-мишенью через час после адсорбции. Стрелкой обозначен участок клетки, изображенный на следующей фотографии.



Рис. 22. Фрагмент предыдущей фотографии. Стрелкой обозначен участок плазматической оболочки вторичного цитолитического Т-лимфоцита в зоне контакта ЦТЛ-2 и клетки-мишени. Видны цитосома, липиды, митохондрии. $\times 75\ 000$.

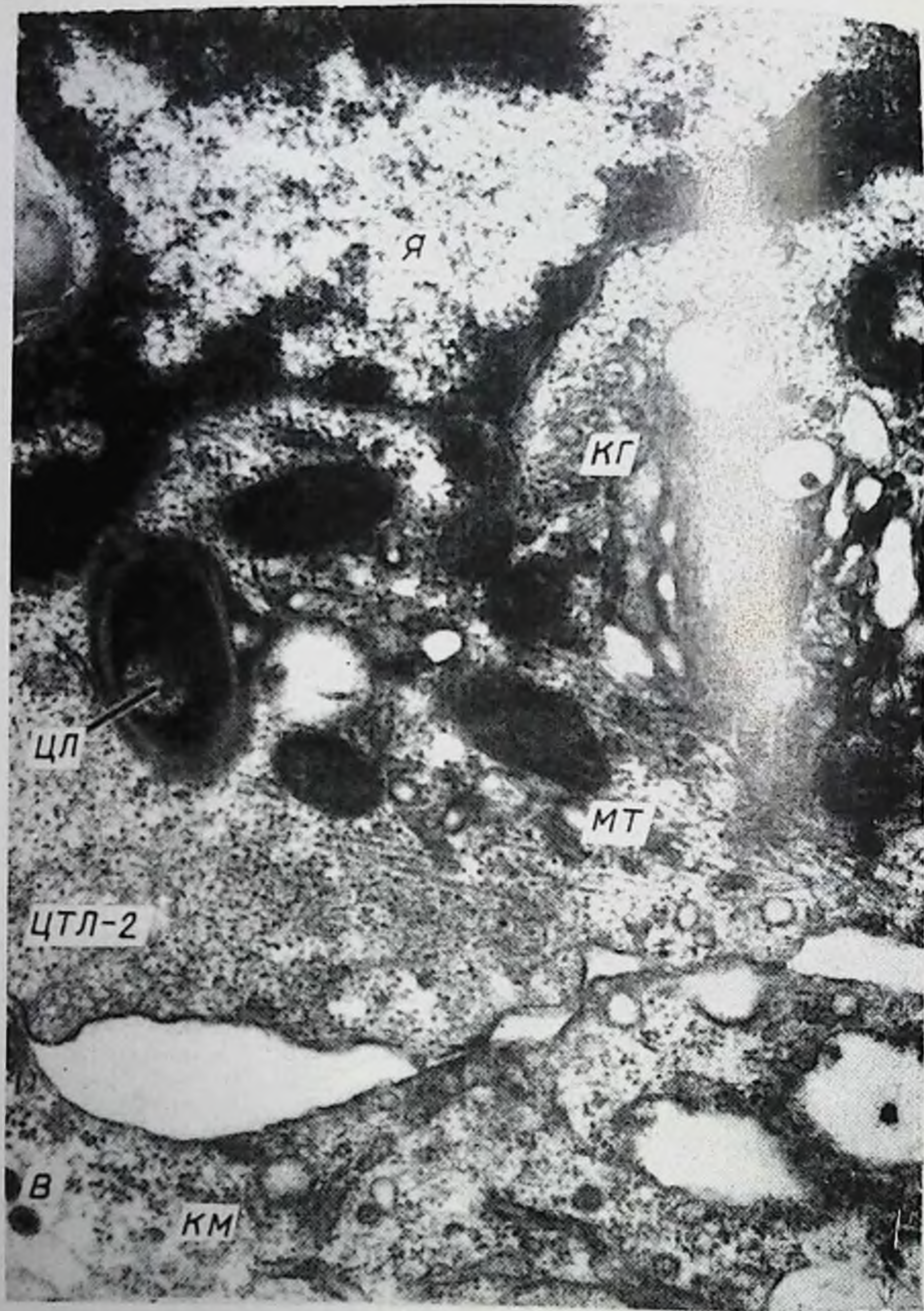


Рис. 23. Участок цитоплазмы ЦТЛ-2, ориентированный к поверхности клетки-мишени. В зоне гипертрофированного комплекса Гольджи локализуются гигантские цитолисомы, скопления микротрубочек, центриоль. $\times 40\ 000$.



Рис. 24. Локализация многочисленных цитолисом (обозначены стрелками) в зоне гипертрофированного комплекса Гольджи. В цитоплазме ЦТЛ-2 через час после адсорбции на поверхности клетки-мишени.
 $\times 15\ 000$.

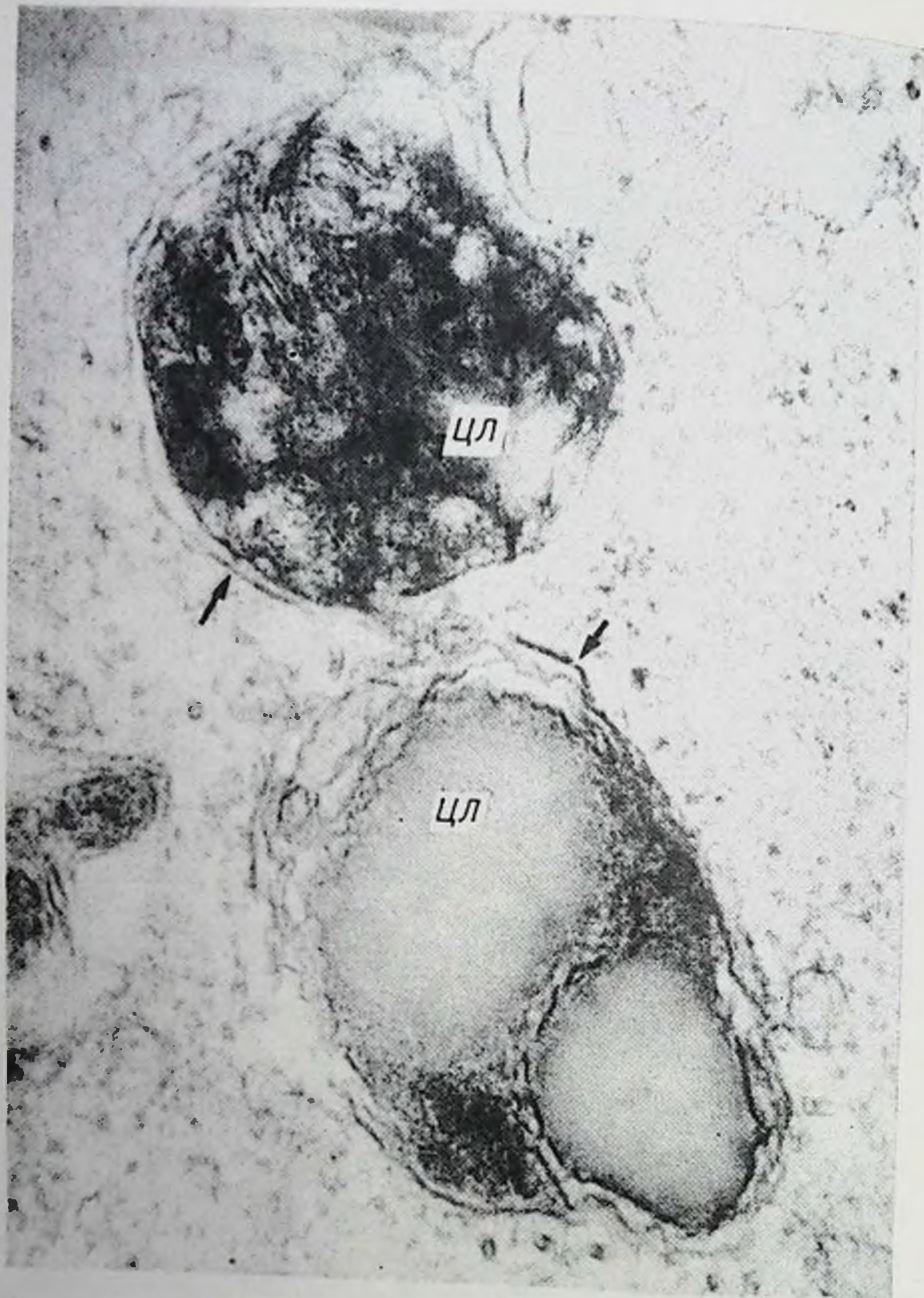


Рис. 25. Ультраструктура цитолисомы через час после адсорбции (ЦТЛ-2) на клетке-мишени (КМ). $\times 50\,000$.



Рис. 26. Ультраструктура мультивезикулярного тельца цитолисом и липидов в цитоплазме ЦТЛ-2. Обозначены цитоплазматические микротрубочки в поперечном рассечении. $\times 70\,000$.

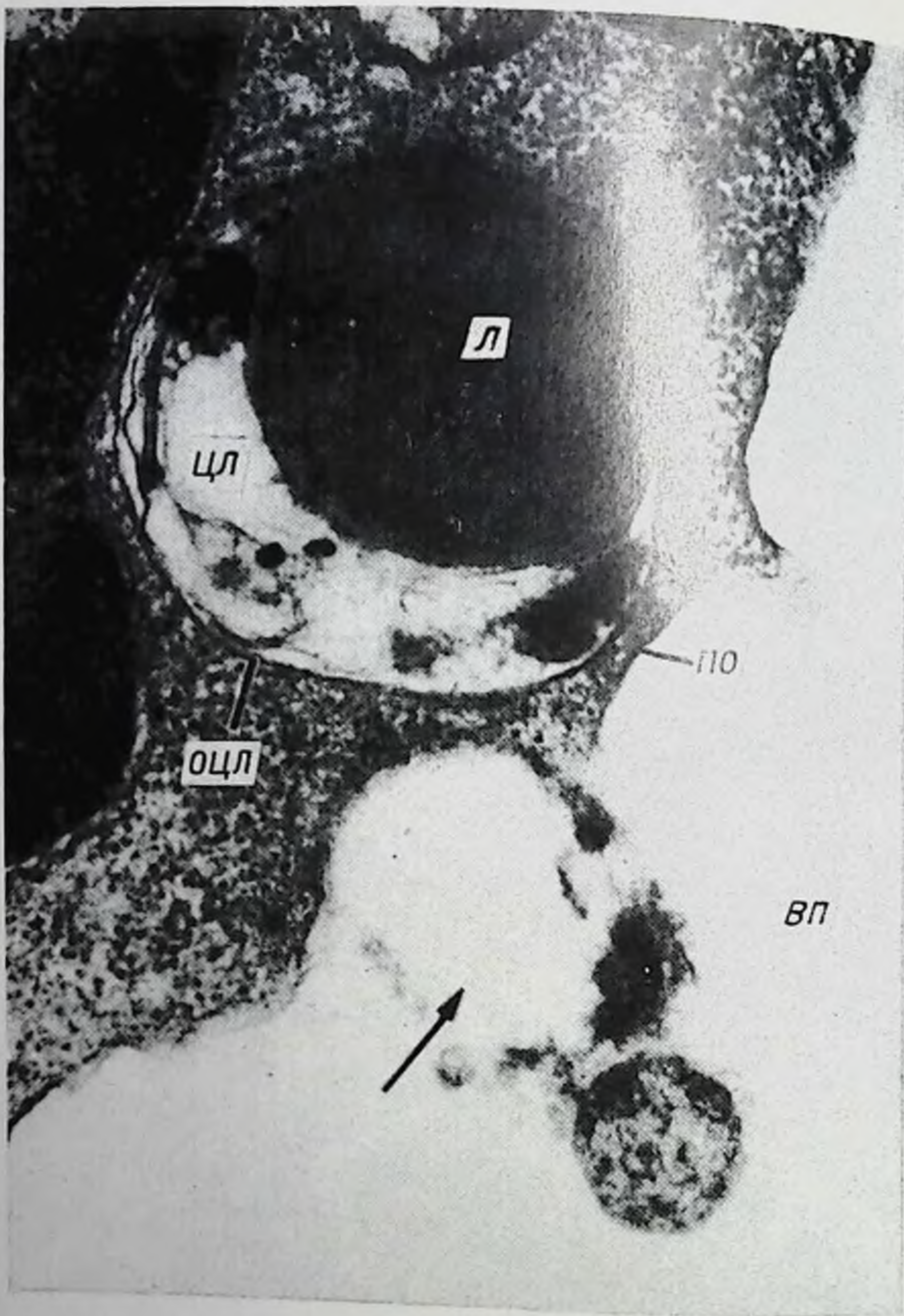


Рис. 27. Выход содержимого цитолисомы (обозначена стрелкой) из вторичного цитолитического Т-лимфоцита во внеклеточное пространство. Видна липидная гранула, входящая в состав гигантской цитолисомы. $\times 40\ 000$.



Рис. 28. Скопление гигантских цитолисом в цитоплазме ЦТЛ 2.
Стрелки обозначают оболочки цитолисом. $\times 80\,000$.



Рис. 29. Взаимодействие вторичного цитолитического Т-лимфоцита с клеткой-мишенью через 1,5 ч после адсорбции. $\times 20\ 000$.

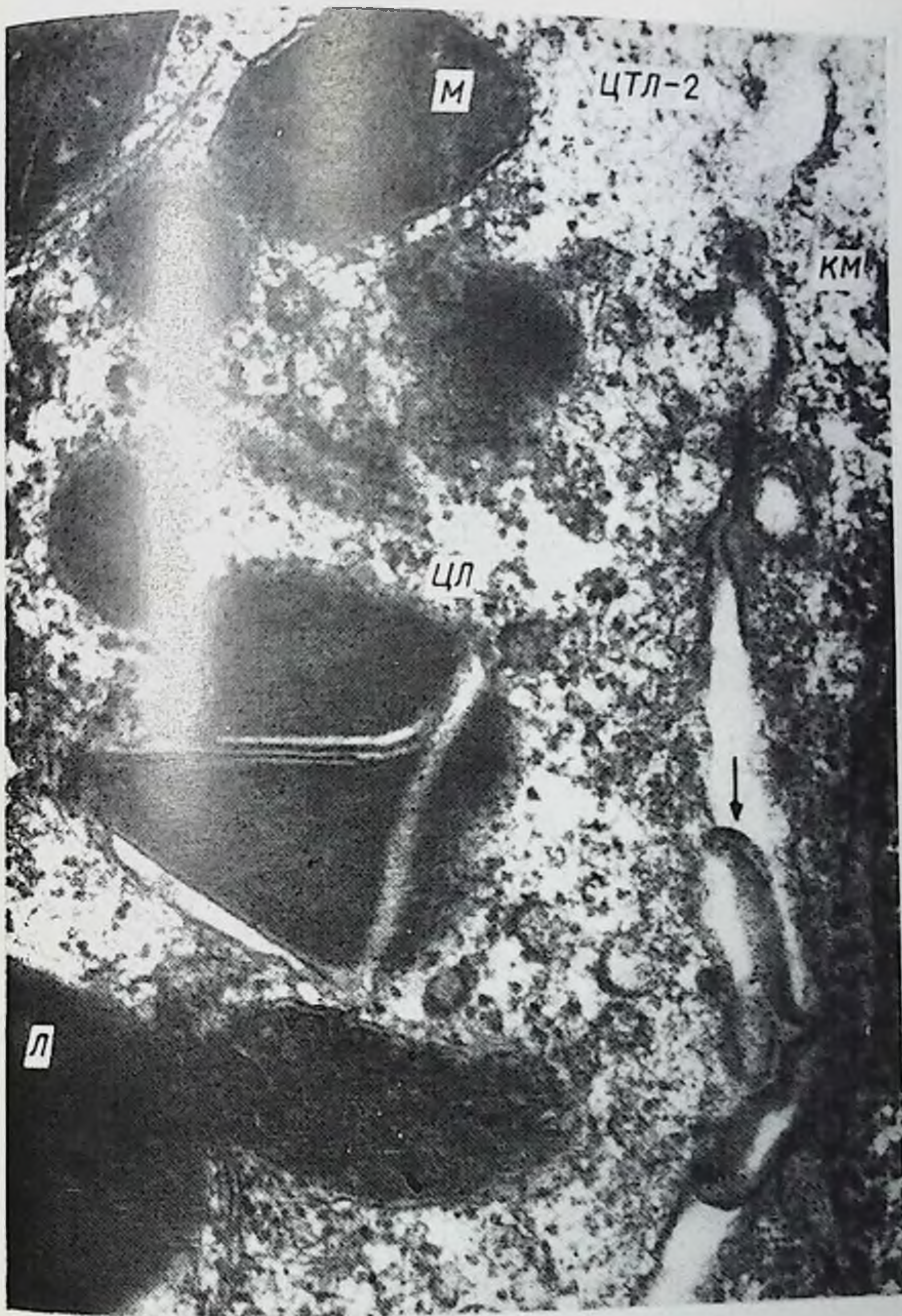


Рис. 39. Фрагмент предыдущей фотографии. Стрелкой обозначено скопление гранул и вакуолей в зоне контакта ЦТЛ-2 и КМ. $\times 50\,000$.

ЦТЛ-2

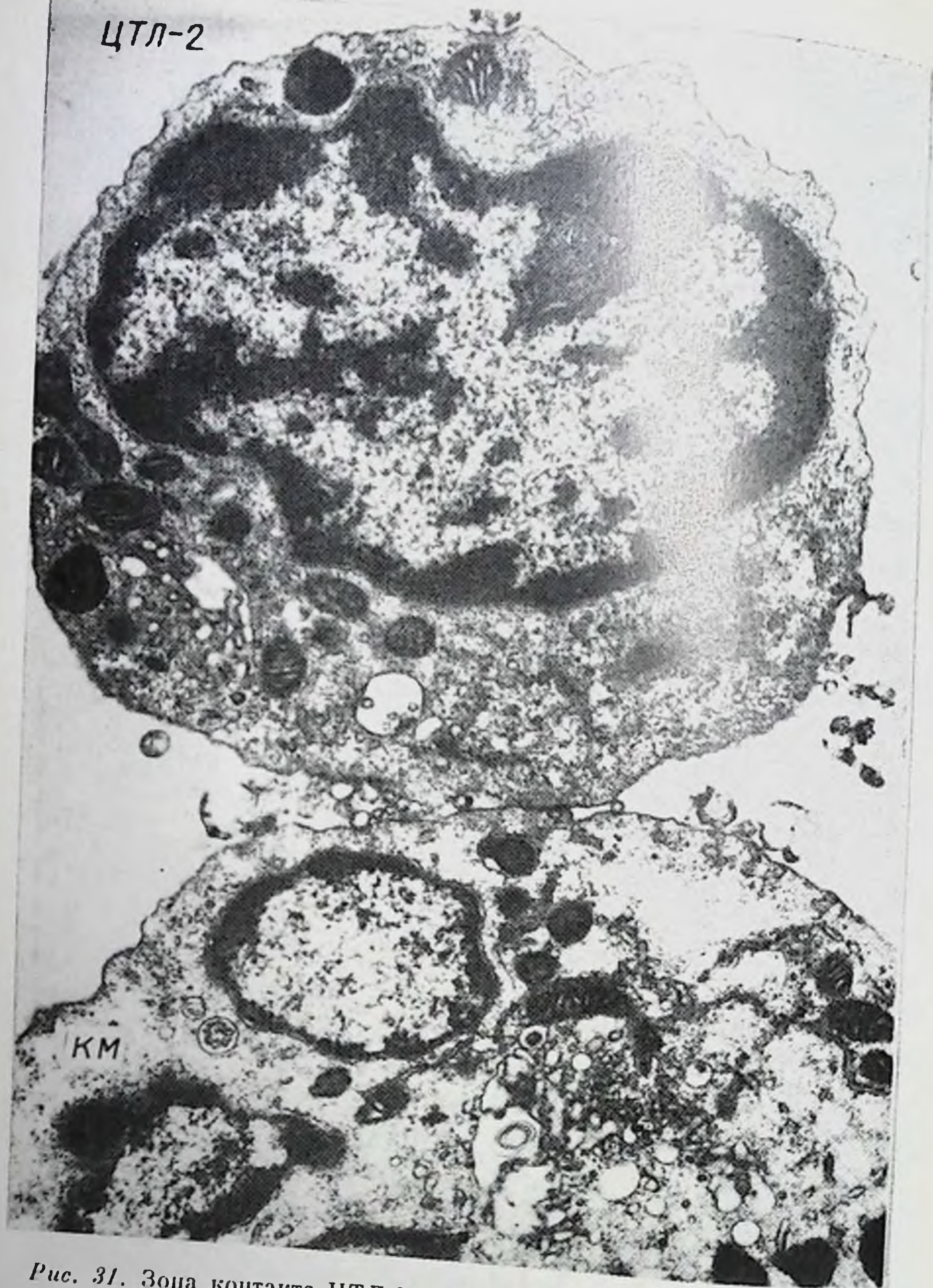


Рис. 31. Зона контакта ЦТЛ-2 и КМ. Видны структуры, морфологически сходные с элементами цитолисом. $\times 50\ 000$.



Рис. 32. Фрагмент предыдущей фотографии. В зоне контакта между поверхностью вторичного цитолитического лимфocyта и клеткой-мишенью локализуется фрагмент цитолисомы. Обозначены цитоплазматические микротрубочки. $\times 180\ 000$.

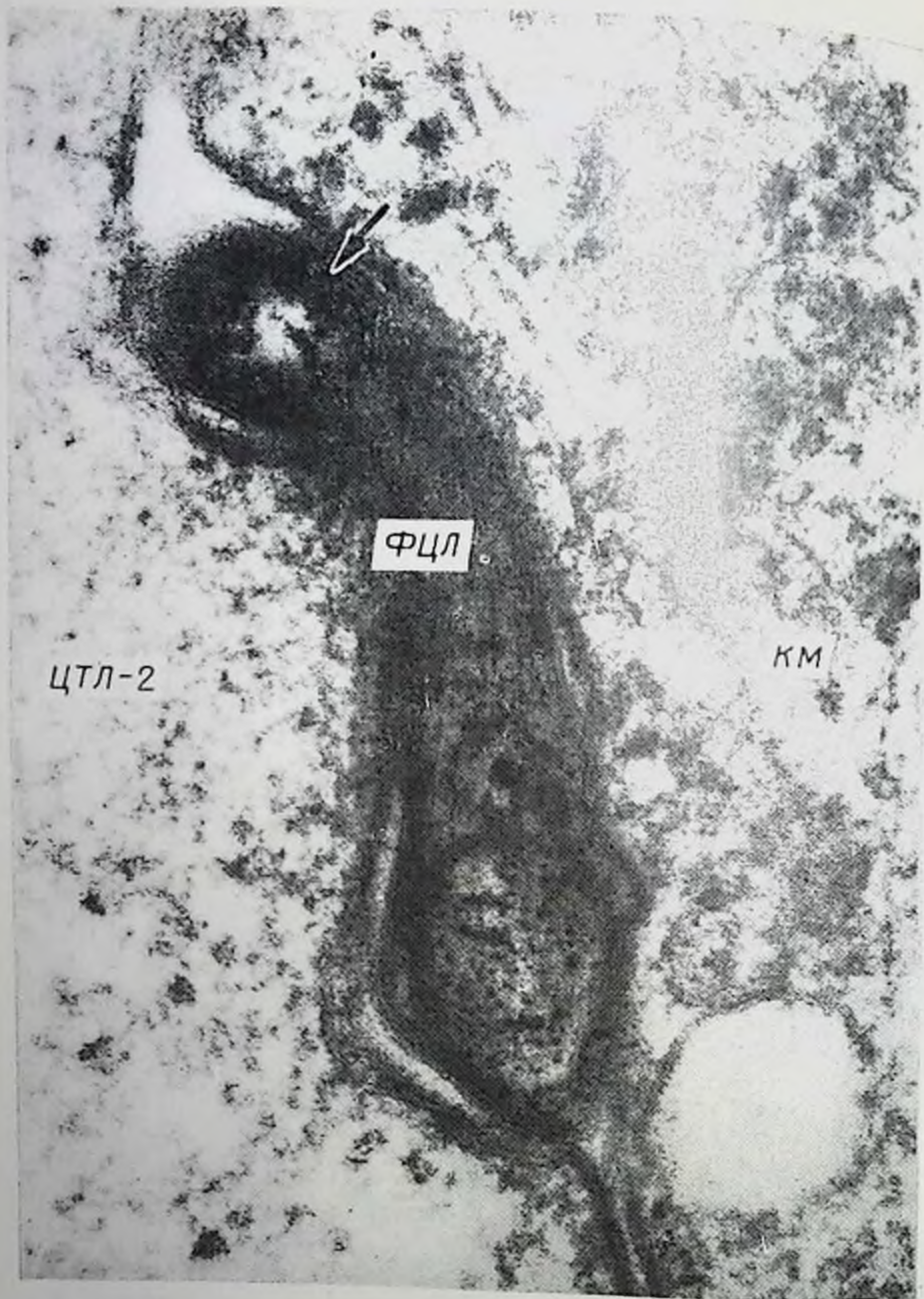


Рис. 33. Фрагмент цитолисомы в зоне контакта ЦТЛ-2 и КМ. Стрелкой обозначены многослойные внутренние оболочки цитолисомы. $\times 180\,000$.

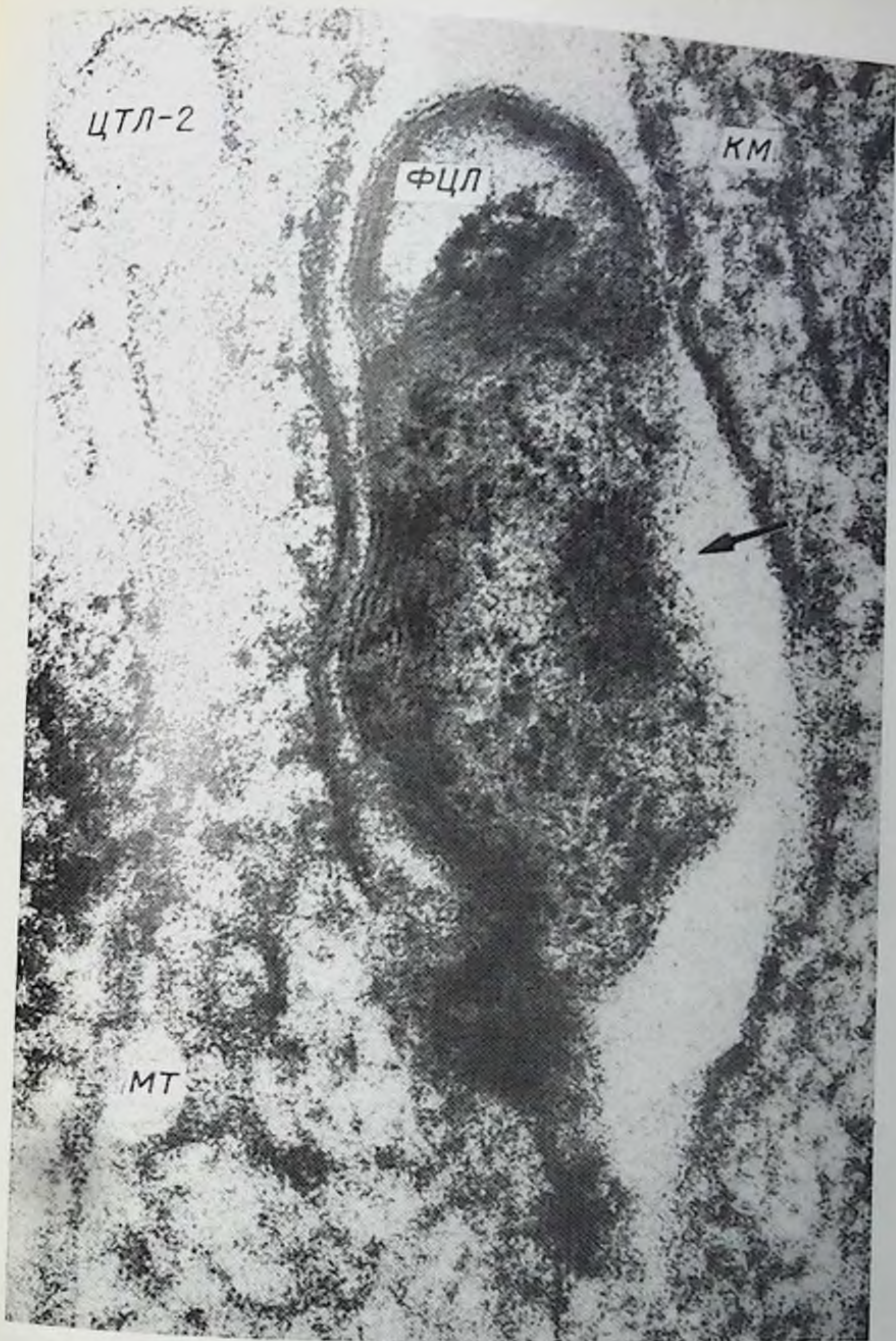


Рис. 34. Ультраструктура распадающегося фрагмента цитолисомы в зоне контакта ЦТЛ-2 и КМ. Виден участок ЦЛ, лишенный внутренних оболочек. $\times 200\ 000$.

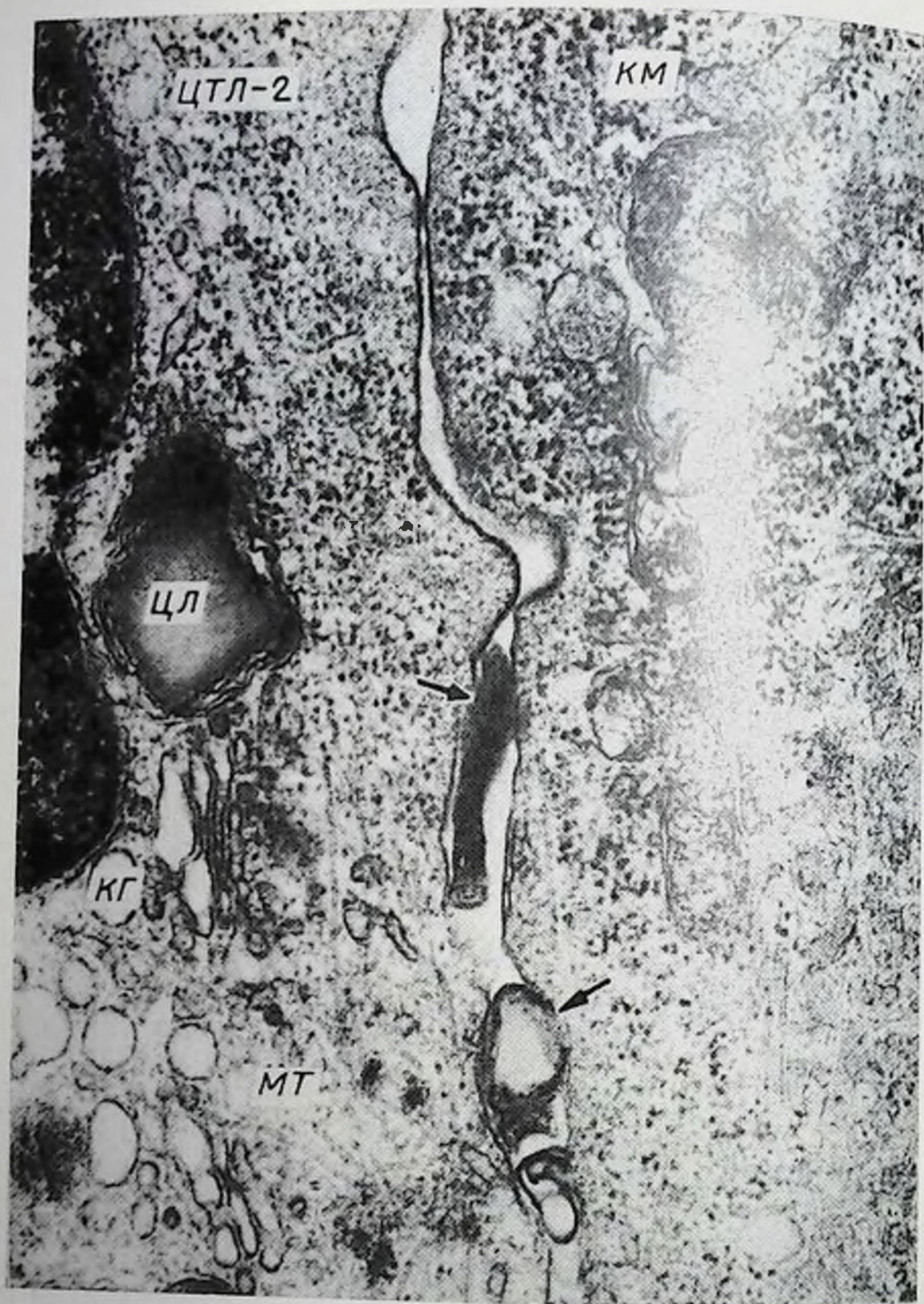


Рис. 35. Цитолисомы в зоне контакта лимфоцита и КМ (обозначены стрелками). $\times 50\,000$.

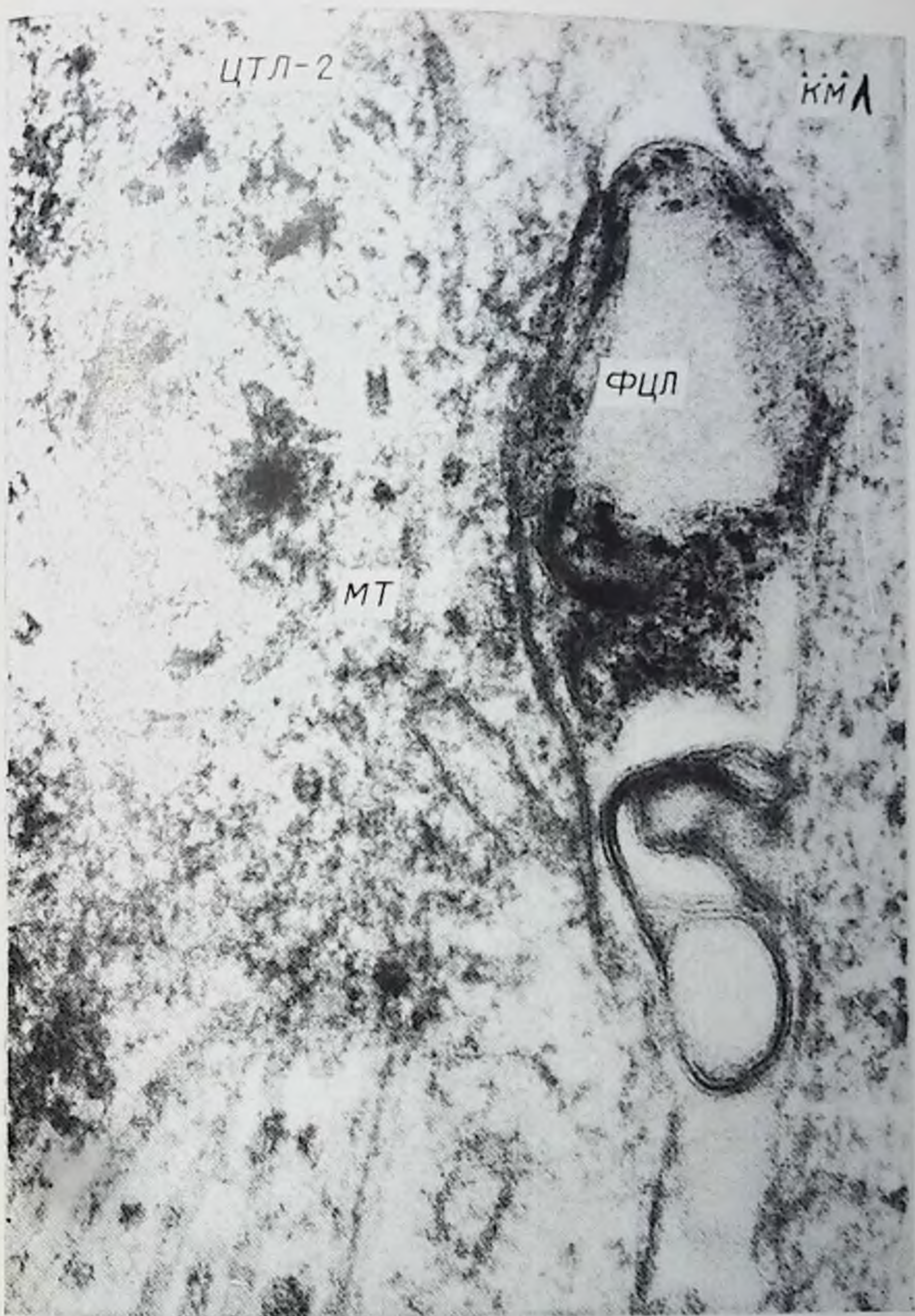


Рис. 36. Фрагмент цитолисомы в зоне контакта лимфоцита и КМ. В цитоплазме ЦТЛ-2 видны многочисленные микротрубочки. $\times 200\ 000$.



Рис. 37. Ультраструктура цитолитического Т-лимфоцита через 5 мин после адсорбции на клетке-мишени L_{1210} . Конъюгат ЦТЛ и КМ. $\times 20\,000$.

а ЦТЛ

б



Рис. 38. Взаимодействие цитолитического Т-лимфоцита с опухолевой клеткой-мишенью L₁₂₁₀ через 5 мин после адсорбции. $\times 20\,000$ (а). Фрагмент предыдущей фотографии, обозначенный стрелкой, при большем увеличении. Ультраструктура оболочки липидной вакуоли. $\times 760\,000$ (б).

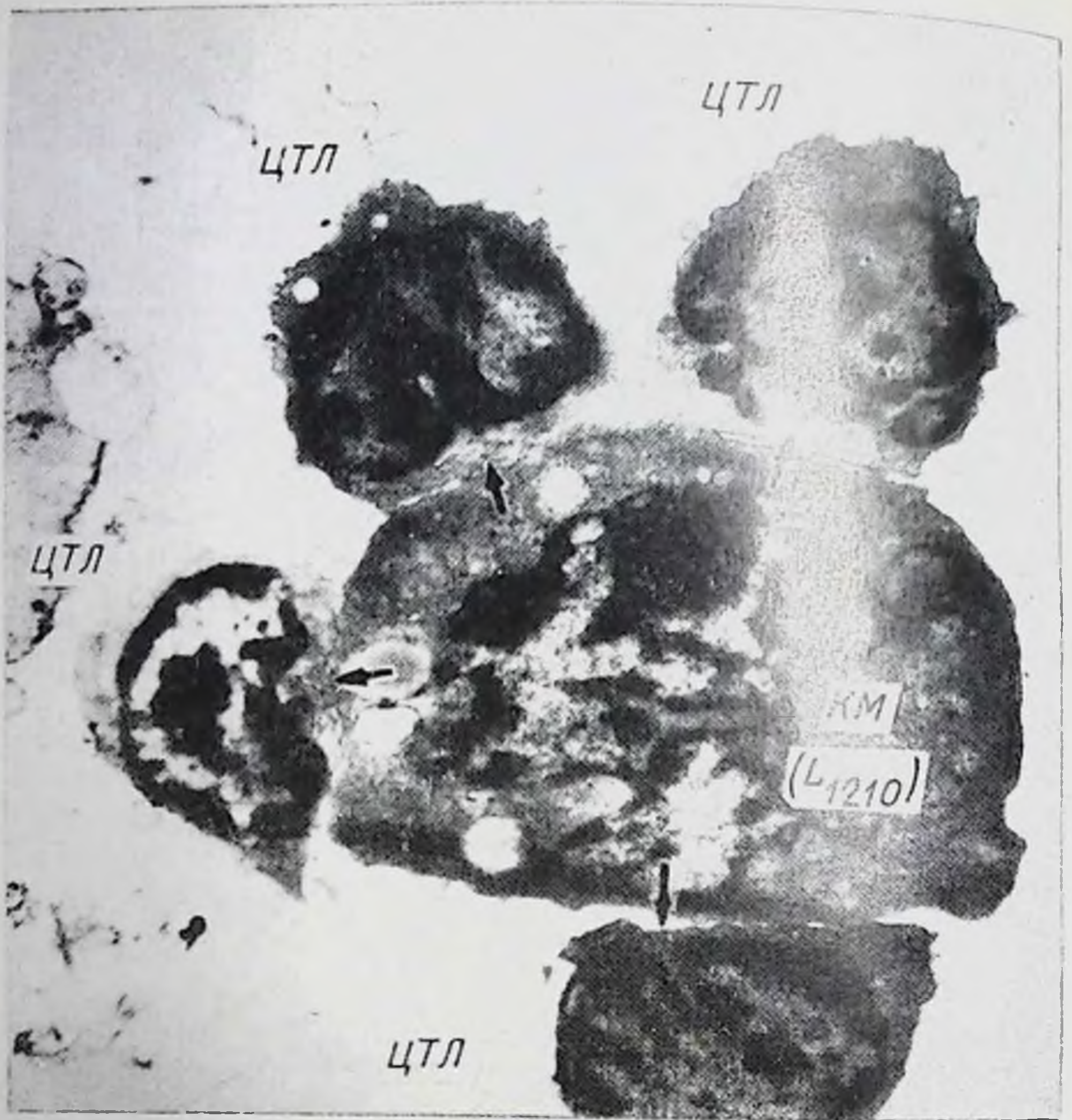


Рис. 39. Взаимодействие цитолитических Т-лимфоцитов с опухолевой клеткой-мишенью L_{1210} через 60 мин после адсорбции. Комплексы Гольджи (обозначены стрелками) всех лимфоцитов ориентированы вблизи зоны контакта ЦТЛ и КМ. $\times 8\,000$.

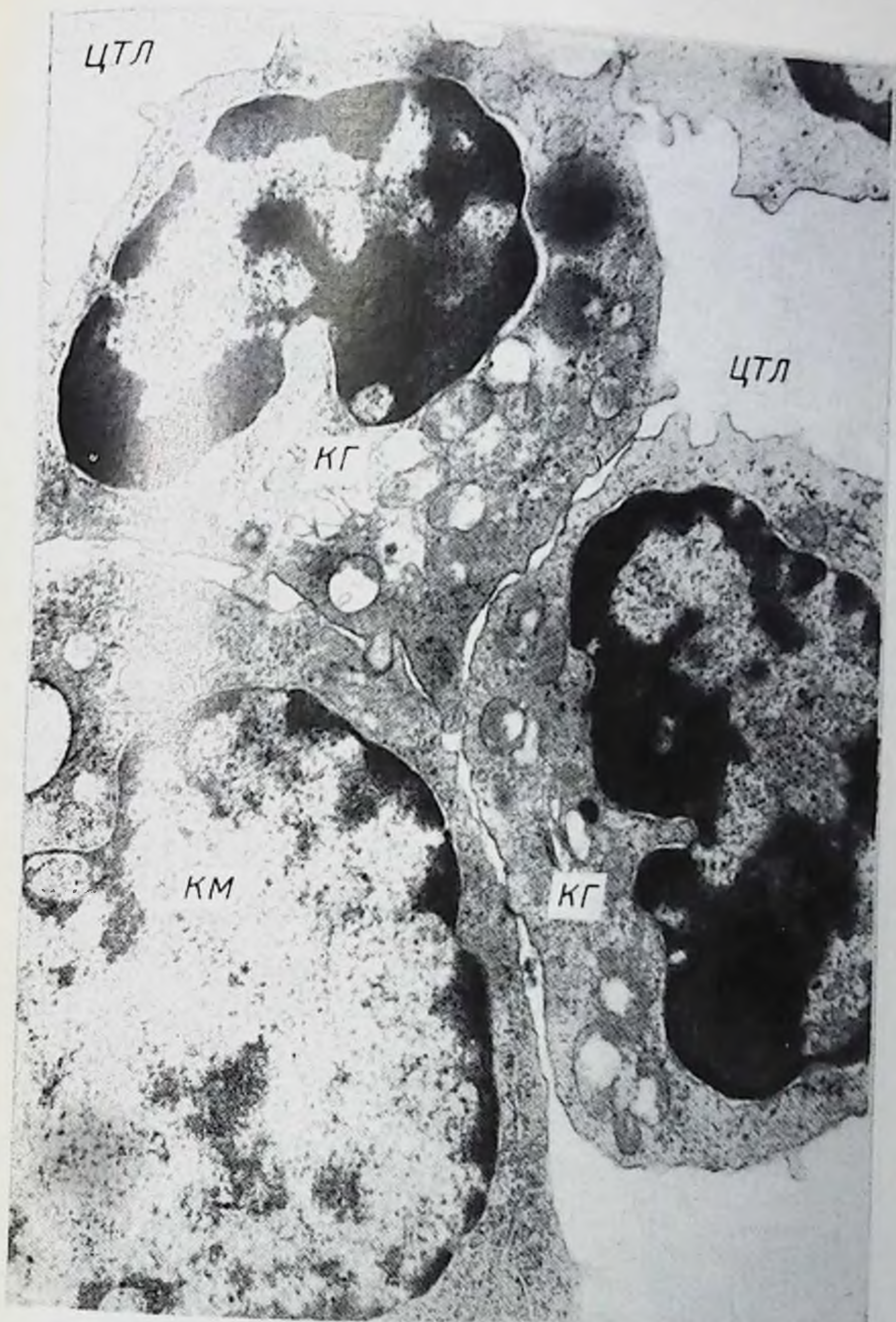


Рис. 40. Взаимодействие двух цитолитических Т-лимфоцитов с одной клеткой-мишенью через 60 мин адсорбции. Комплексы Гольджи лимфоцитов ориентированы к поверхности КМ. $\times 17\,000$.

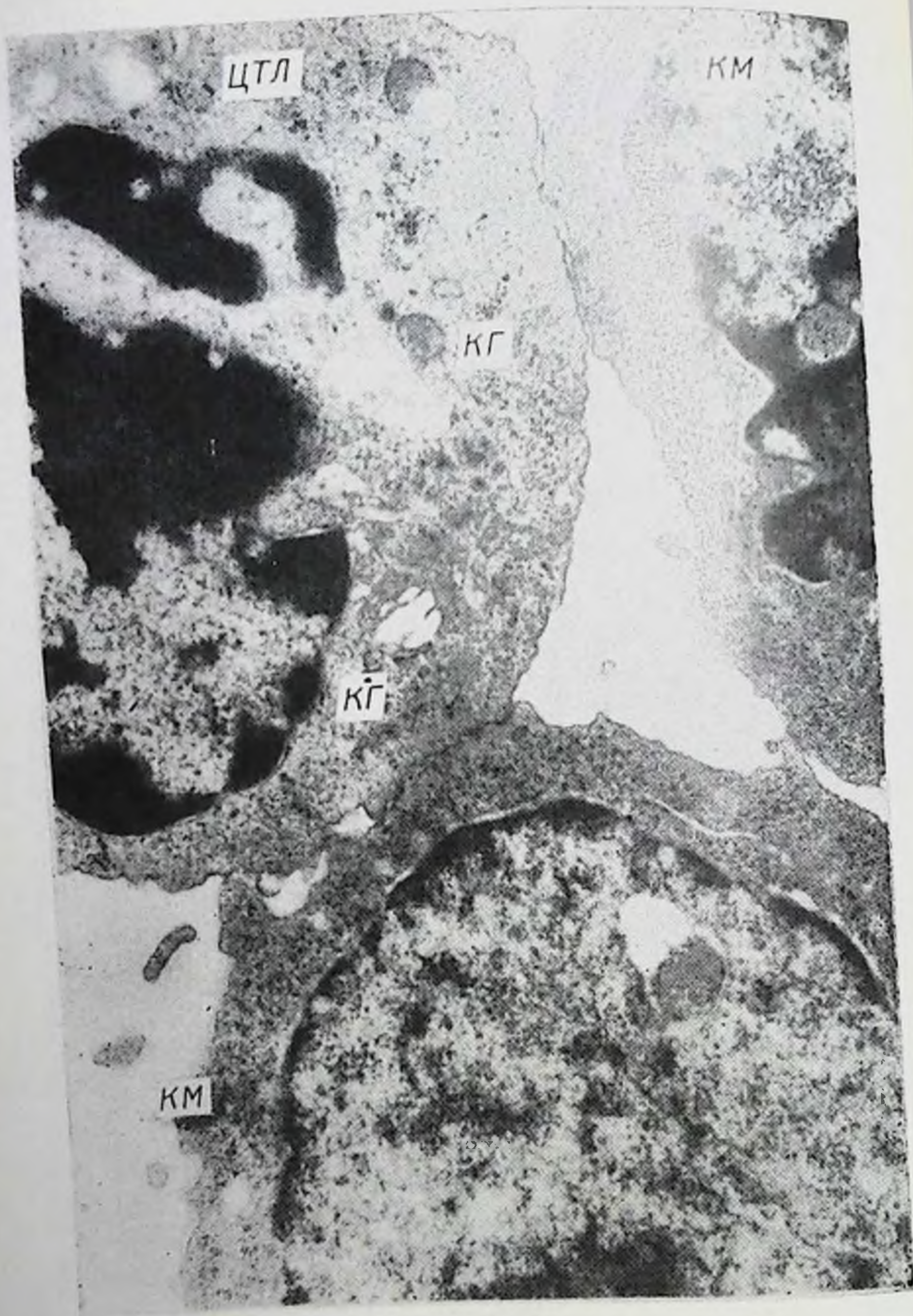


Рис. 41. Взаимодействие одного цитолитического Т-лимфоцита с двумя клетками-мишенями, через 30 мин после адсорбции. Комплекс Гольджи ЦТЛ ориентирован к поверхности обеих клеток-мишеней. $\times 25\ 000$.

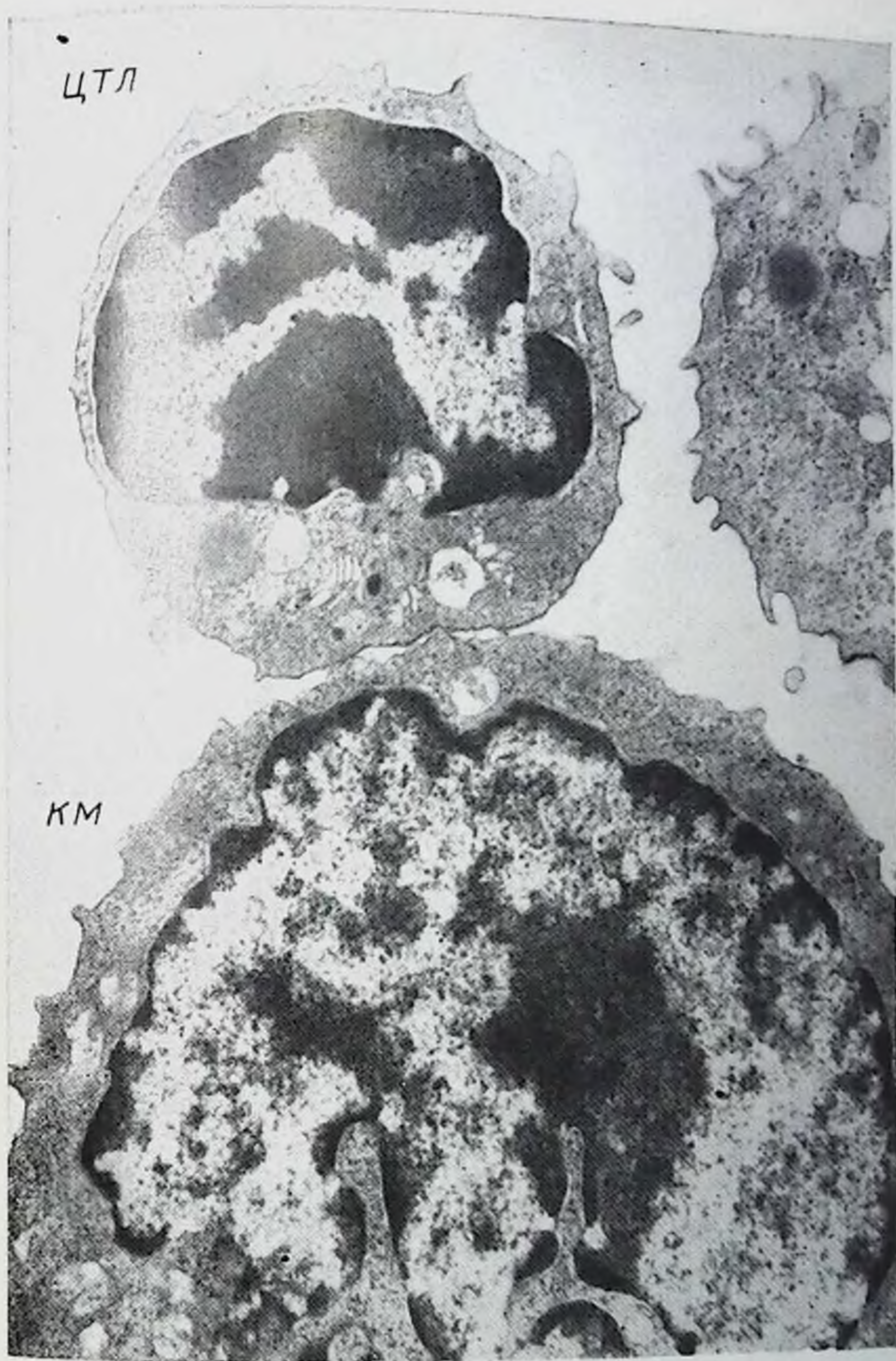


Рис. 42. Ультраструктура цитолитического Т-лимфоцита через 30 мин после адсорбции на клетке-мишени. $\times 12\,000$.

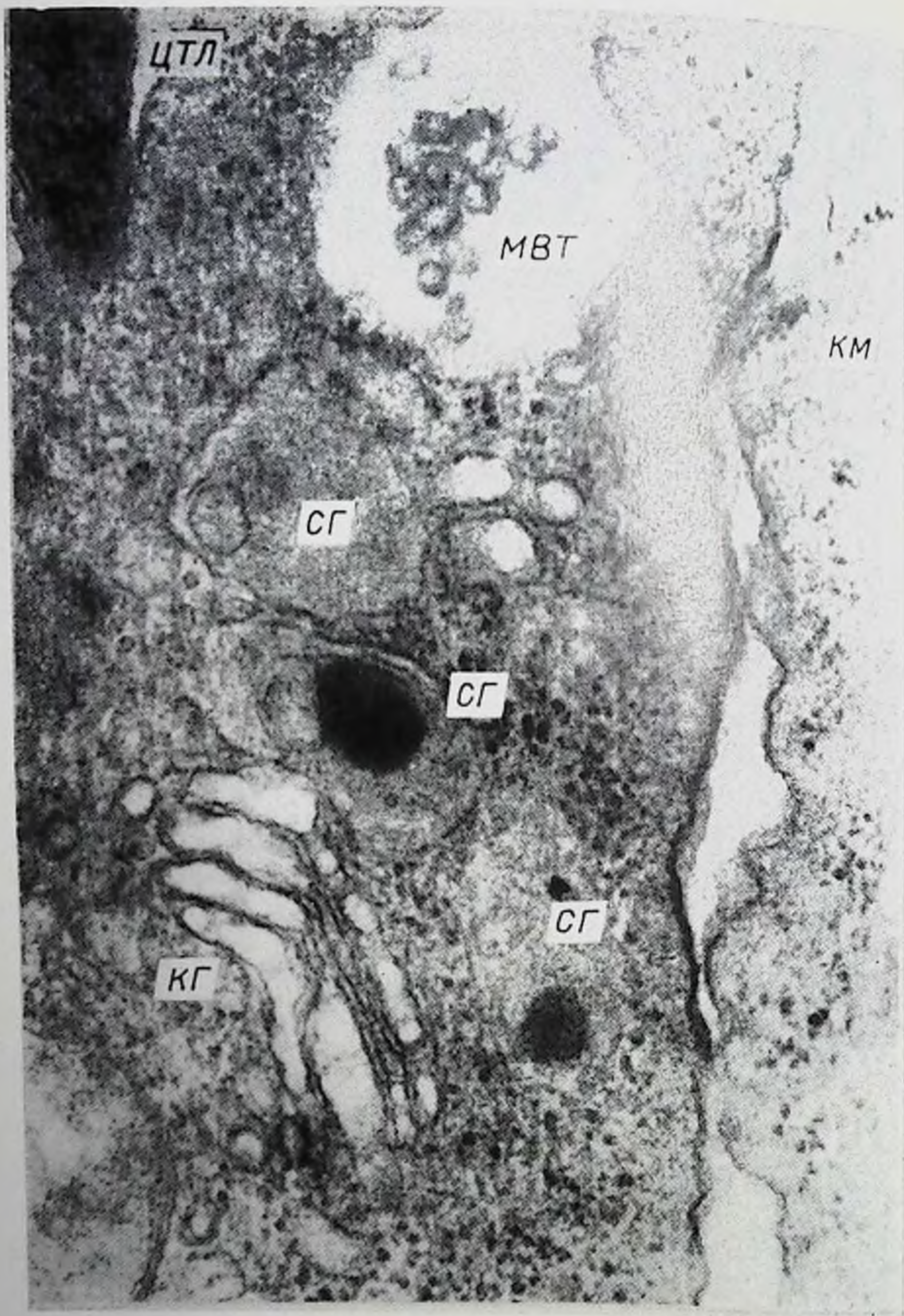


Рис. 43. Фрагмент предыдущей фотографии. Локализация в зоне гипертрофированного комплекса Гольджи, секреторных гранул и мультивезикулярного тельца. $\times 80\,000$.



Рис. 44. Ультраструктура гипертрофированного комплекса Гольджи ЦТЛ через 30 мин после контакта с КМ. $\times 80\,000$.



Рис. 45. Фрагмент предыдущей фотографии, стрелками обозначены слияния гипертрофированных вакуолей комплекса Гольджи. $\times 180\,000$.



Рис. 46. Ультраструктура цитолитического Т-лимфоцита через 30 мин после контакта с клеткой-мишенью (метод криоскалывания). а — видны поры в оболочке ядра и участок цитоплазмы ЦТЛ. б — отмечены комплекс Гольджи, секреторные гранулы и микротуб. $\times 80\,000$.

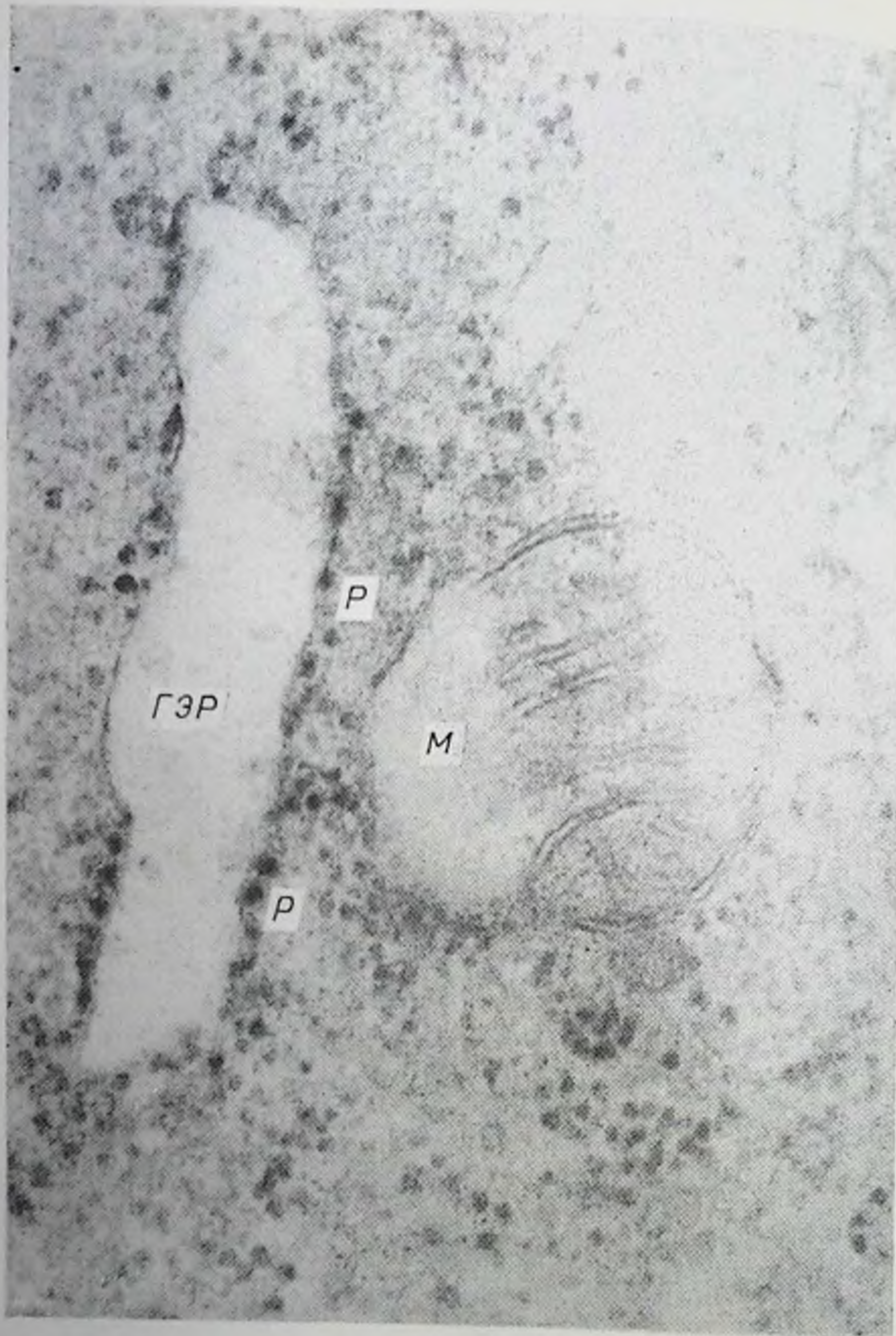


Рис. 47. Ультраструктура гипертрофированной цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума в цитоплазме цитолитического Т-лимфоцита через 30 мин после контакта с опухолевой клеткой-мишенью. $\times 100\ 000$.

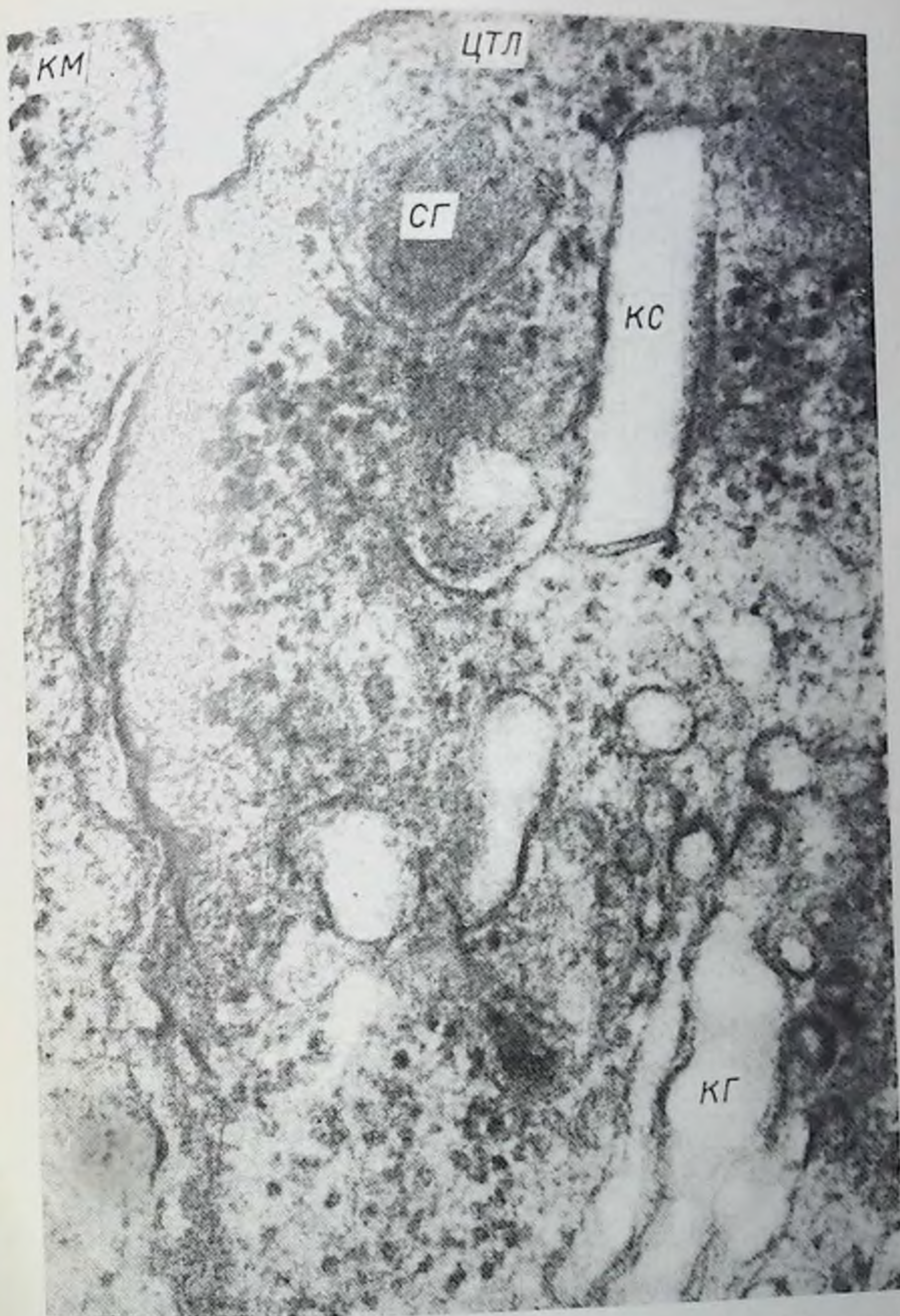


Рис. 48. Кристаллоподобные структуры в цитоплазме ЦТЛ через 30 мин после контакта с КМ.



Рис. 49. Строение кристаллоподобных структур, локализующихся в цитоплазме ЦТЛ. Ряды частиц (см. стрелки) диаметром 10 нм (расстояние между центрами соседних частиц составляет 15 нм) заполняют весь объем КС. $\times 360\,000$.



Рис. 50. Слияние (обозначено стрелкой) секреторных гранул с липидами в цитоплазме ЦТЛ через 30 мин после контакта с КМ.
 $\times 50\,000$.



Рис. 51. Ультраструктура участка секреторной гранулы, слившейся с липидной вакуолью в цитоплазме ЦТЛ. $\times 180\,000$.

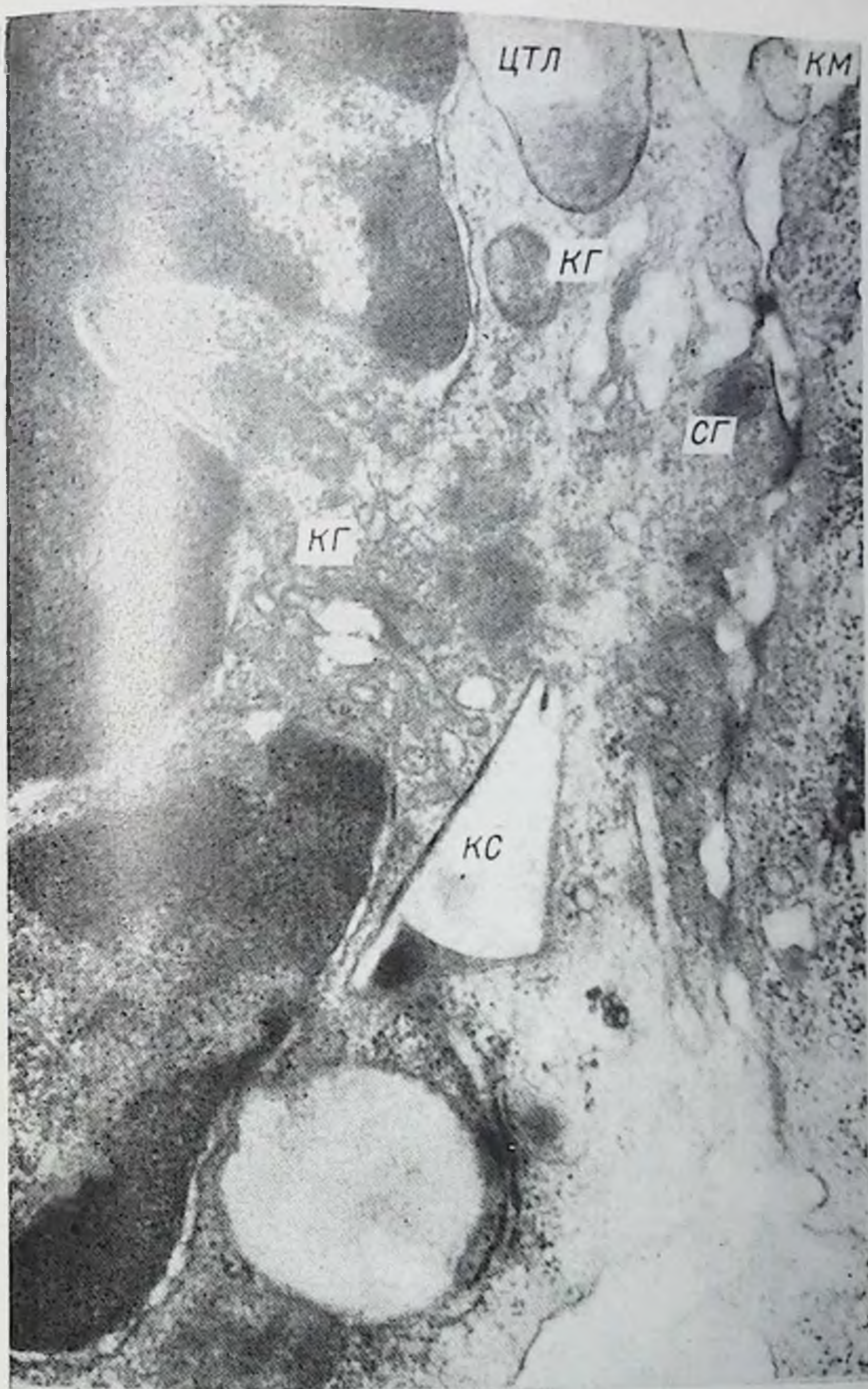


Рис. 52. Взаимодействие цитолитического Т-лимфоцита с клеткой-мишенью (КМ) через 60 мин после адсорбции. Гипертрофированный комплекс Гольджи, кристаллоподобные структуры и секреторные гранулы локализируются вблизи поверхности лимфоцита. $\times 30\,000$.



Рис. 53. Фрагмент предыдущей фотографии. Стрелка обозначает зону контакта плазматической оболочки ЦТЛ и оболочки гипертрофированной вакуоли Комплекса Гольджи. $\times 300\ 000$.

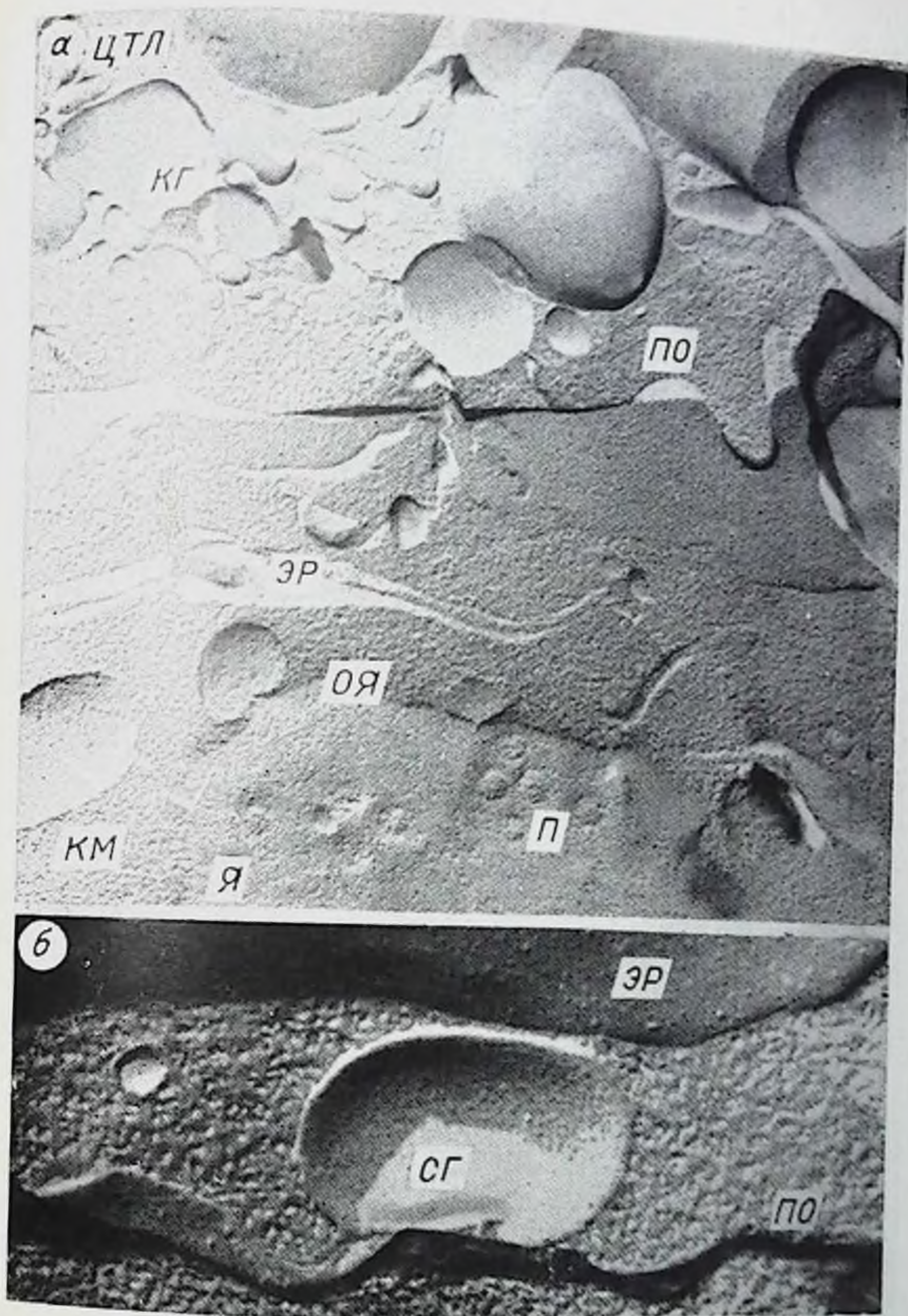


Рис. 54. Взаимодействие цитолитических Т-лимфоцитов с клеткой-мишенью через 60 мин после адсорбции (метод криоскалывания).
 а — локализация вакуолей гипертрофированного комплекса Гольджи вблизи плазматической оболочки ЦТЛ. $\times 35\,000$; б — ультраструктура секреторной гранулы вблизи плазматической оболочки ЦТЛ. $\times 140\,000$.

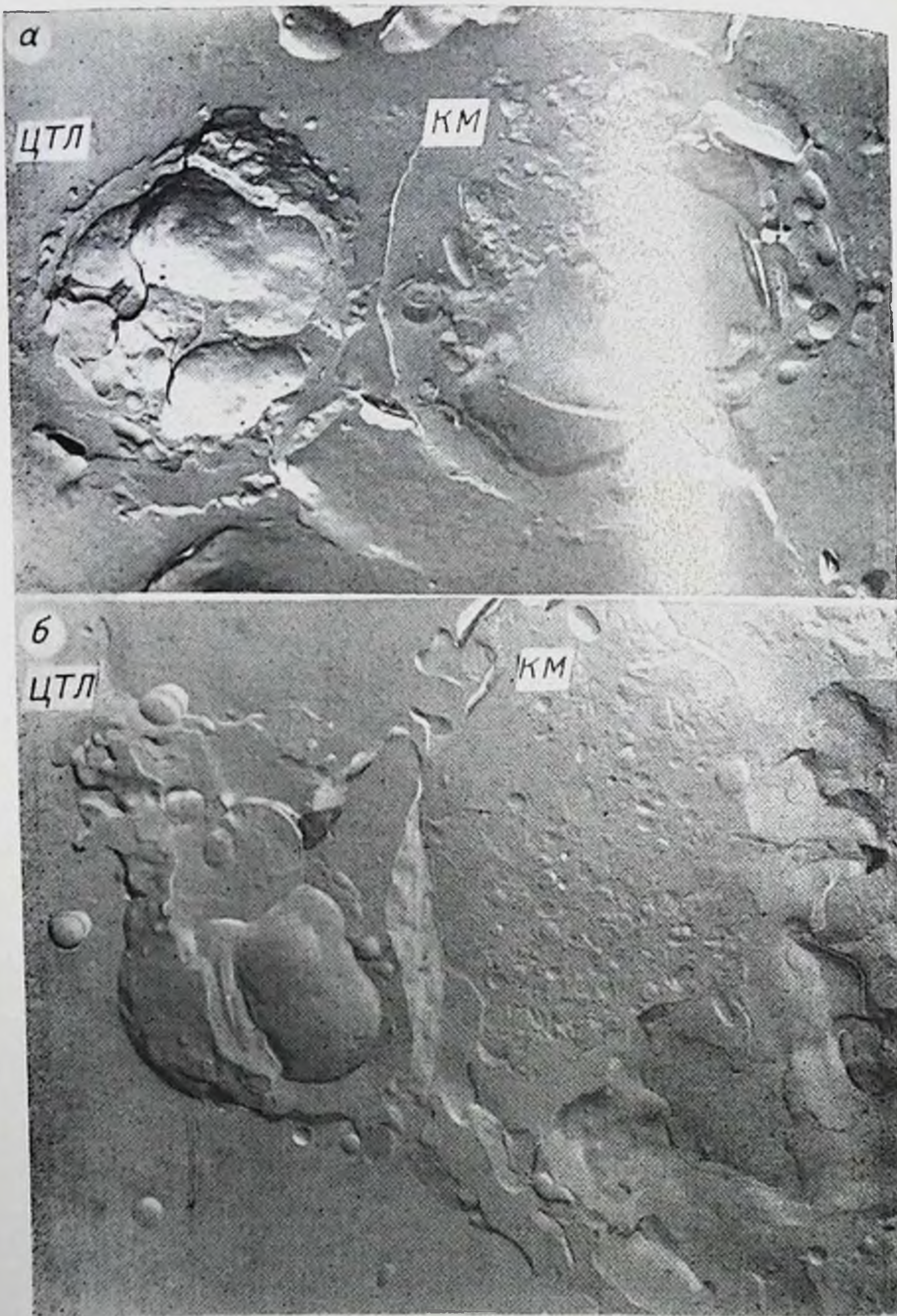


Рис. 55. Ультраструктура цитолитического Т-лимфоцита (ЦТЛ) через 15 мин (а) и 60 мин (б) после контакта с клеткой L₁₂₁₀. Метод криоскальвания. $\times 8\,000$.



Рис. 56. Фрагмент рисунка 55 б. Выделение секреторных вакуолей (в зоне контакта ЦТЛ и КМ (обозначены одиночными стрелками) и на свободной поверхности ЦТЛ (обозначены парными стрелками))
 $\times 30\ 000$.

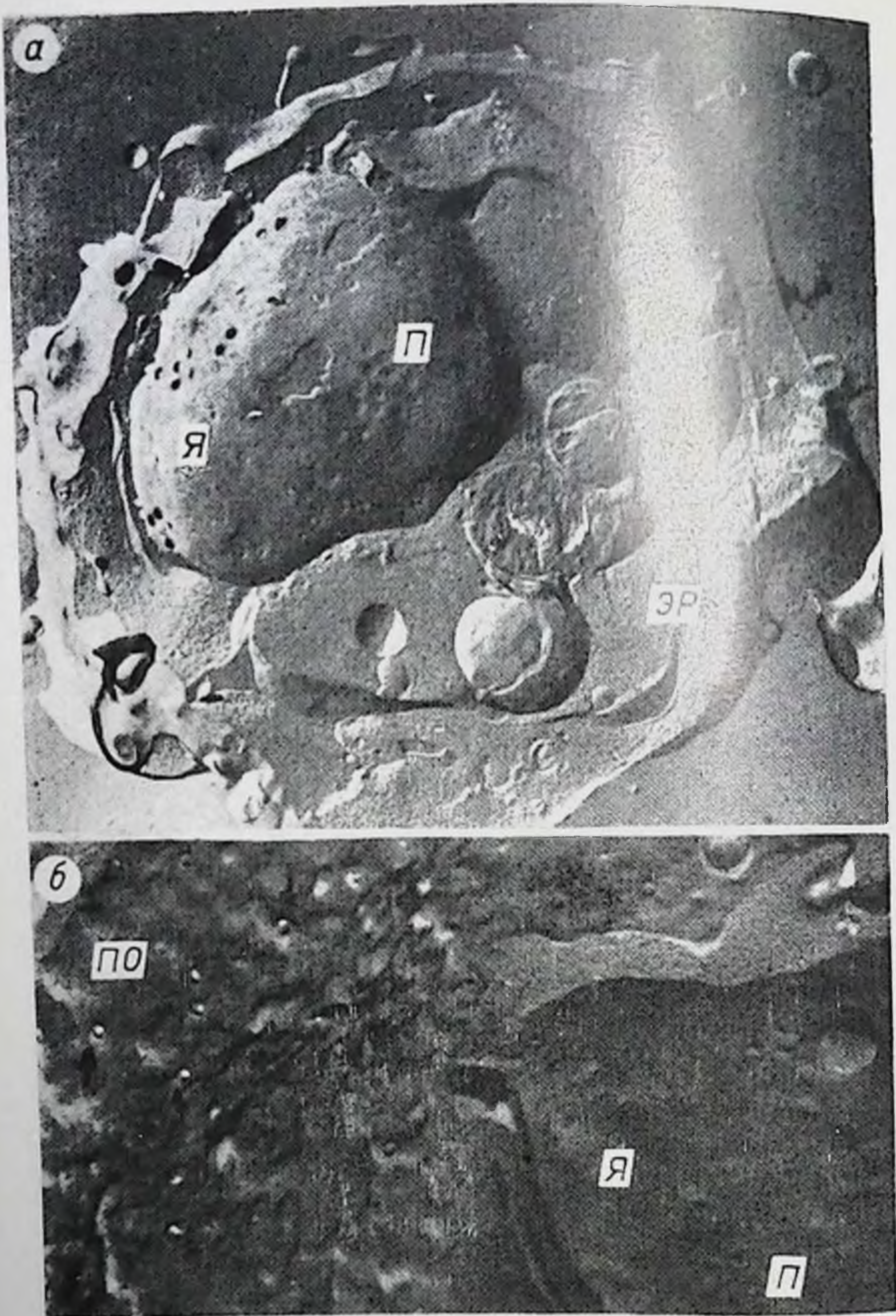


Рис. 57. Ультраструктура цитолитического Т-лимфоцита через 60 мин после контакта с клеткой-мишенью (метод криоскалывания).

а — внутренняя структура ЦТЛ; отчетливо виден эндоплазматический ретикулум, липиды поры ядерной оболочки. $\times 15\,000$; **б** — выход многочисленных секторных вакуолей (обозначены стрелками) на поверхности ЦТЛ. $\times 30\,000$.

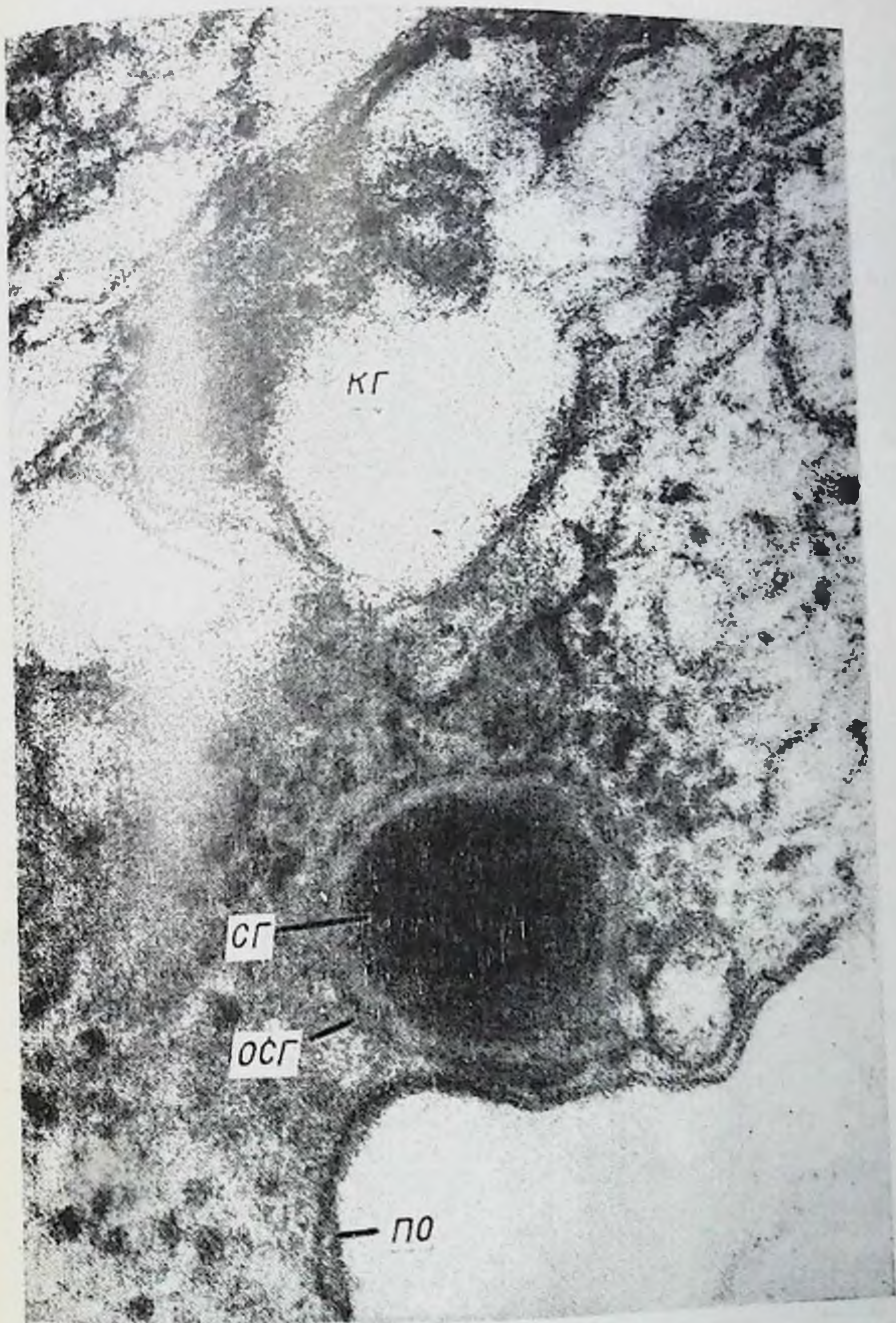


Рис. 58. Ультраструктура секреторных гранул, выделяющихся из ЦТЛ (ультратонкий срез). $\times 180\,000$.

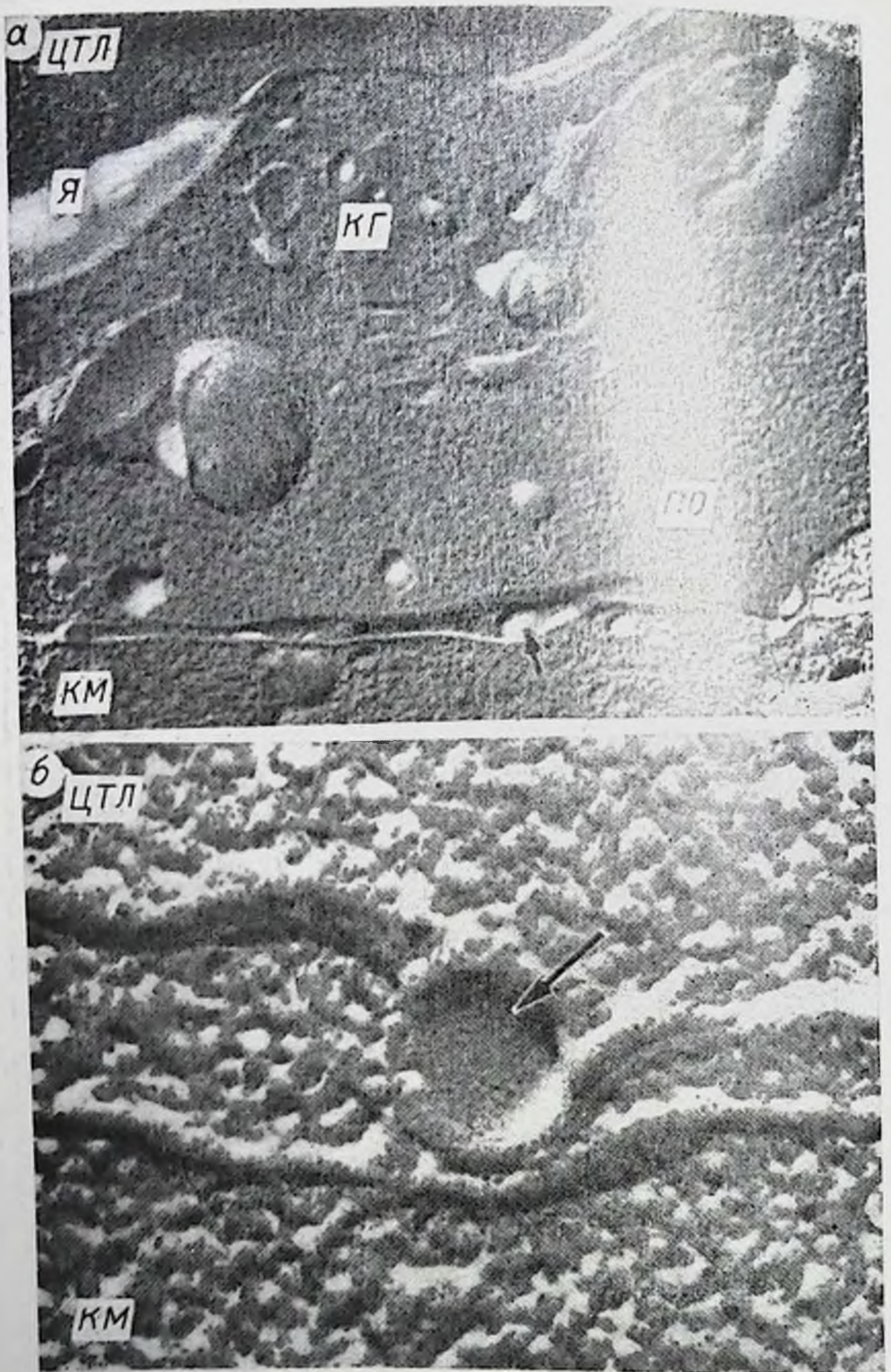


Рис. 59. Ультраструктура секреторных гранул (обозначены стрелками), выделяющихся из лимфоцитов в зону контакта ЦТЛ с клеткой-мишенью. Метод криоскальвания. а — $\times 30\,000$; б — $\times 180\,000$.



Рис. 60. Локализация содержимого секреторных гранул (обозначено стрелками) в зоне контакта цитолитического Т-лимфоцита и клеток-мишеней через 60 мин после контакта. $\times 40\ 000$.



Рис. 61. Ультраструктура содержимого цитолисомы в зоне контакта ЦТЛ и КМ, внутрицитоплазматические включения онкорнавируса типа А, обнаруживаемого только в опухолевых клетках мишенях L₁₂₁₀. ×70 000.

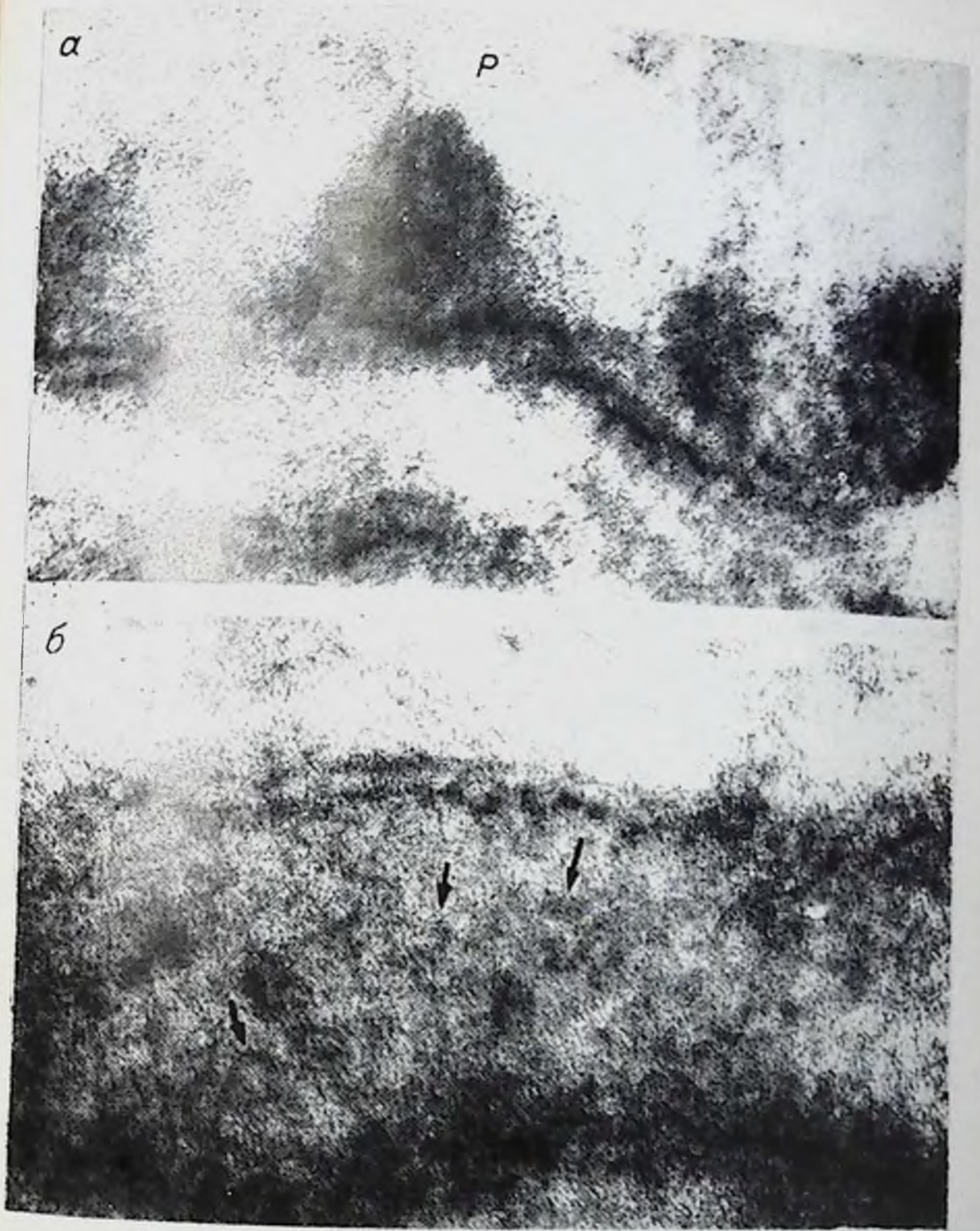


Рис. 62. Ультраструктура мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума (а) и трубчатых структур (б) ЦТЛ через 30 мин после контакта с КМ. Стрелками обозначены осмифильные тяжи, локализующиеся в полости трубчатой структуры. Обозначена рибосома, расположенная на мембране ретикулума. $\times 500\ 000$.

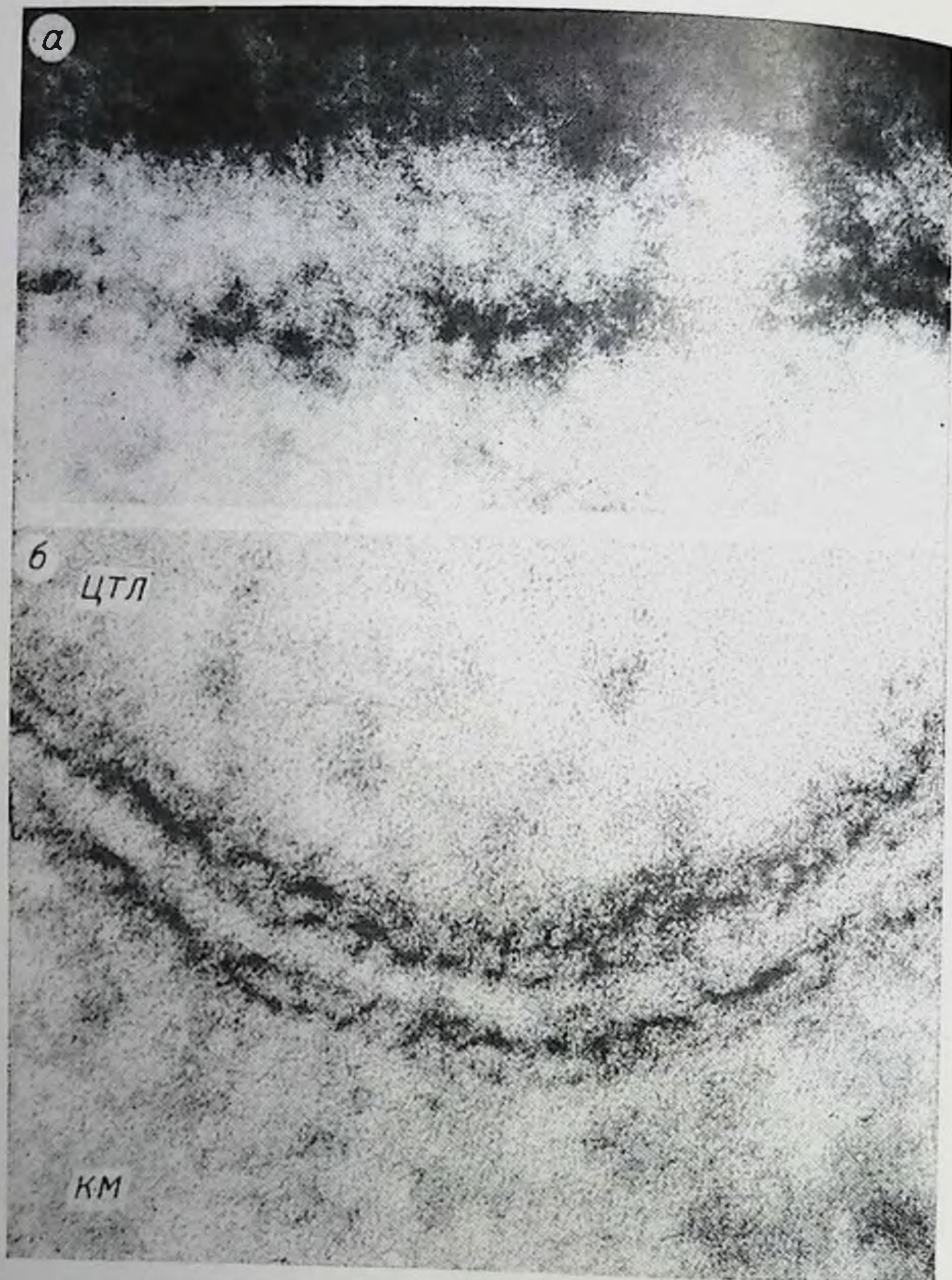


Рис. 63. Сравнение ультраструктуры мембран секреторной графулы (а) и плазматических оболочек ЦТЛ и КМ (б). $\times 500\ 000$.

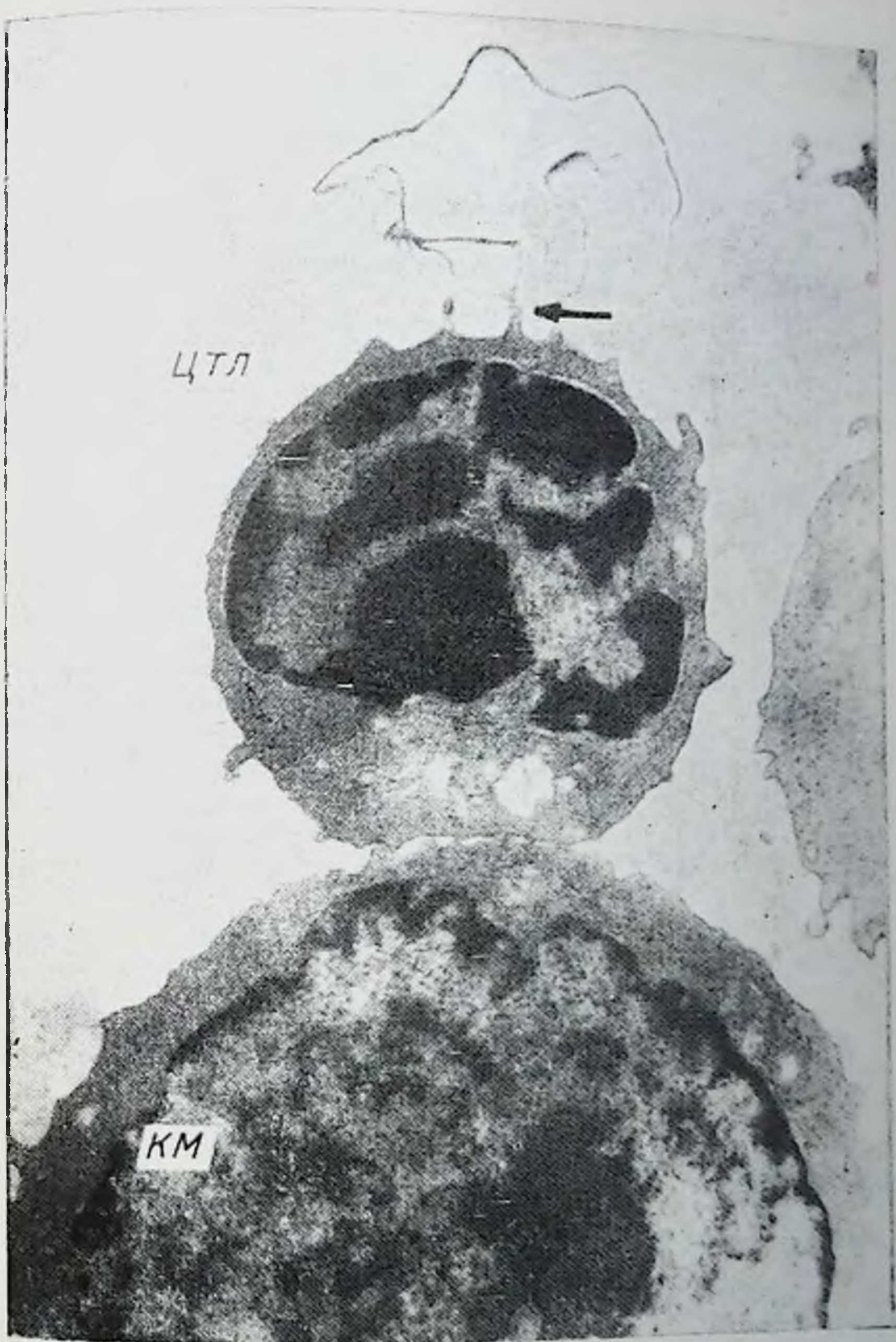


Рис. 64. Слущивание фрагментов плазматической оболочки ЦТЛ (обозначено стрелкой) с поверхности лимфоцита через 30 мин после контакта с клеткой-мишенью $\times 11\,000$.



Рис. 65. Ультраструктура оболочки ЦТЛ, соприкасающейся с поверхностью лимфоцита. $\times 100\ 000$.

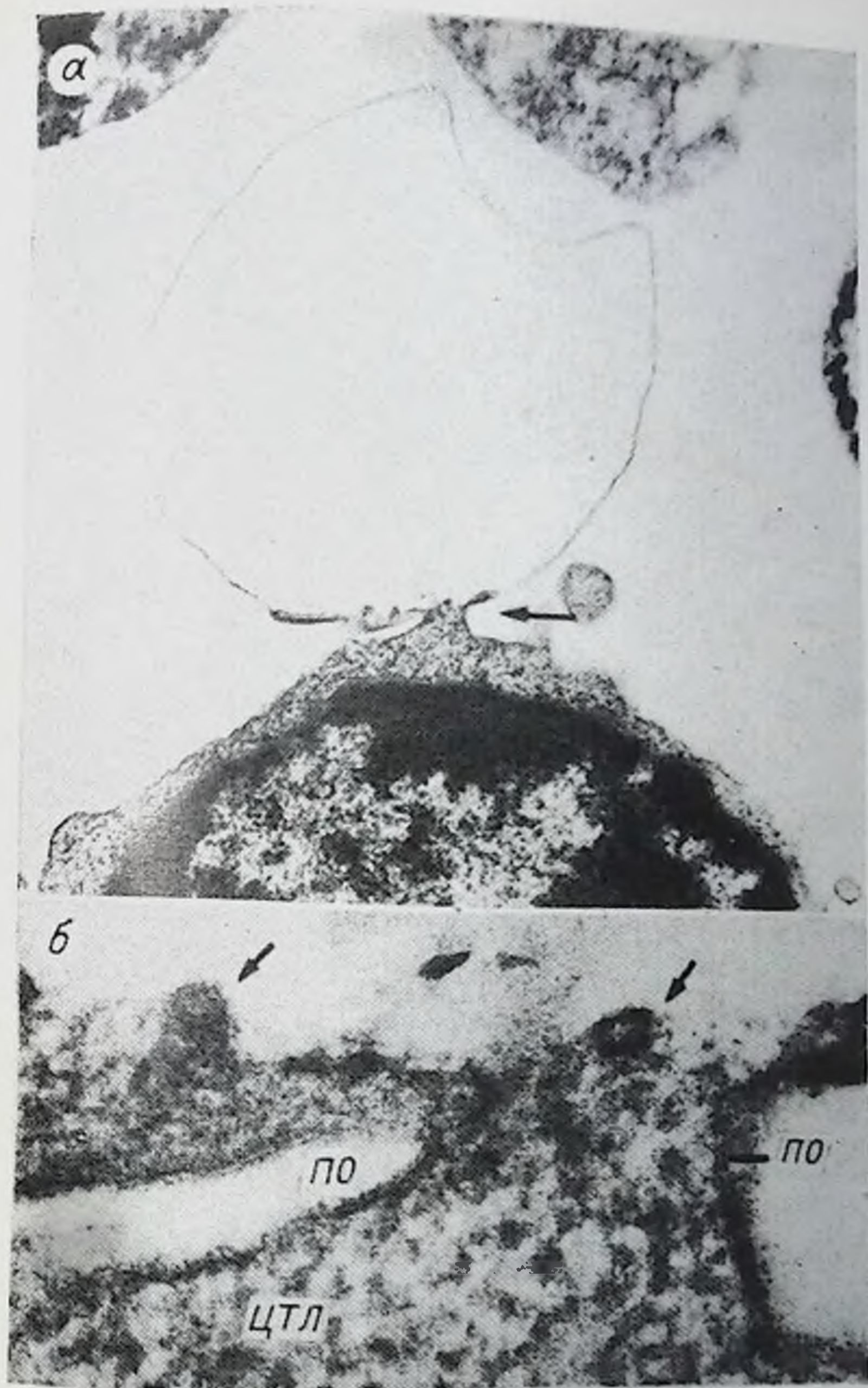


Рис. 66. Ультраструктура зоны сращивания фрагмента плазматической оболочки ЦТЛ.

а — участок ЦТЛ; стрелкой обозначена зона сращивания плазматической оболочки; б — фрагмент предыдущей фотографии; стрелки обозначают вакуоли, возникающие в цитоплазме ЦТЛ в области временного дефекта плазматической оболочки лимфоцита. $\times 180\ 000$.



Рис. 67. Случивание фрагментов (обозначены стрелками) плазматической оболочки цитолитического Т-лимфоцита $\times 100\ 000$.

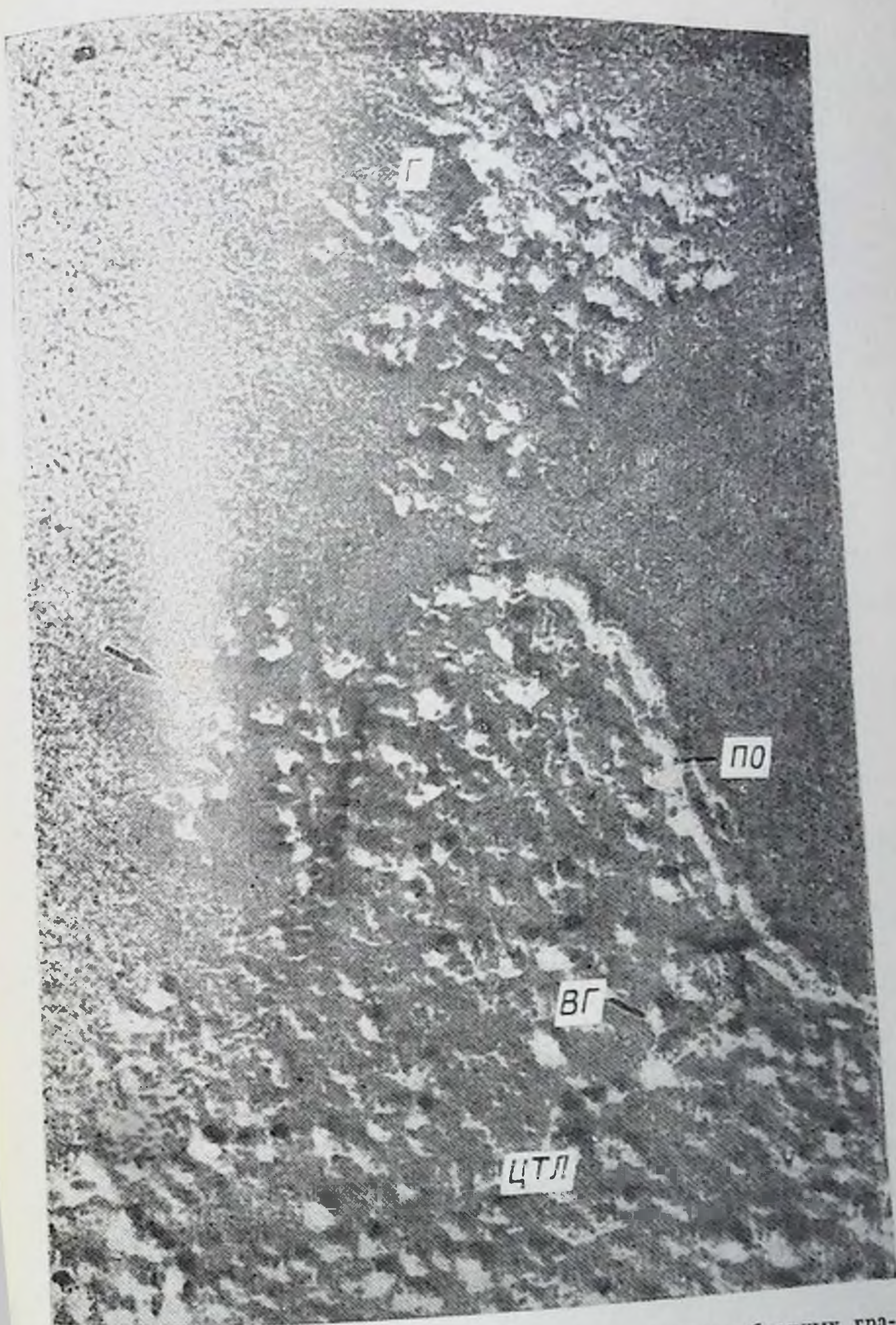


Рис. 68. Случивание (обозначено стрелкой) внутримембранных гранул из плазматической оболочки цитолитического Т-лимфоцита через 15 мин после контакта с опухолевой клеткой-мишенью. В межклеточном пространстве видно скопление гранул, отделившихся от поверхности ЦТЛ. Метод криоскашивания. $\times 200\ 000$.

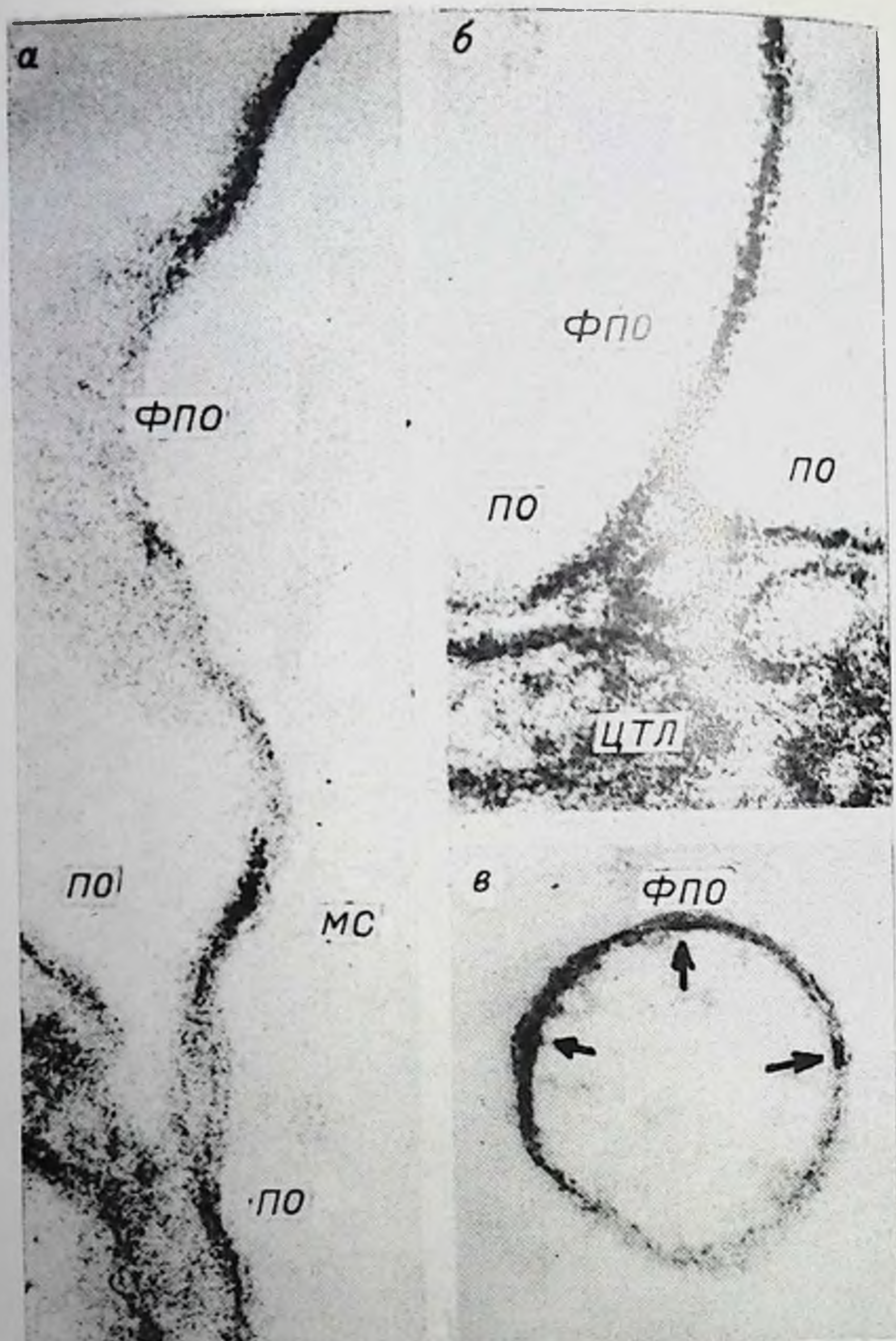


Рис. 69. Ультраструктура различных форм слущивающихся фрагментов плазматических оболочек цитолитических Т-лимфоцитов.
 а — слущивание фрагмента плазматической оболочки лимфоцита. $\times 180\,000$;
 б — слущивание парного фрагмента плазматической оболочки лимфоцита. $\times 180\,000$;
 в — фрагмент плазматической оболочки, отделившейся от поверхности лимфоцита. стрелками обозначены мембраносомы. $\times 100\,000$.

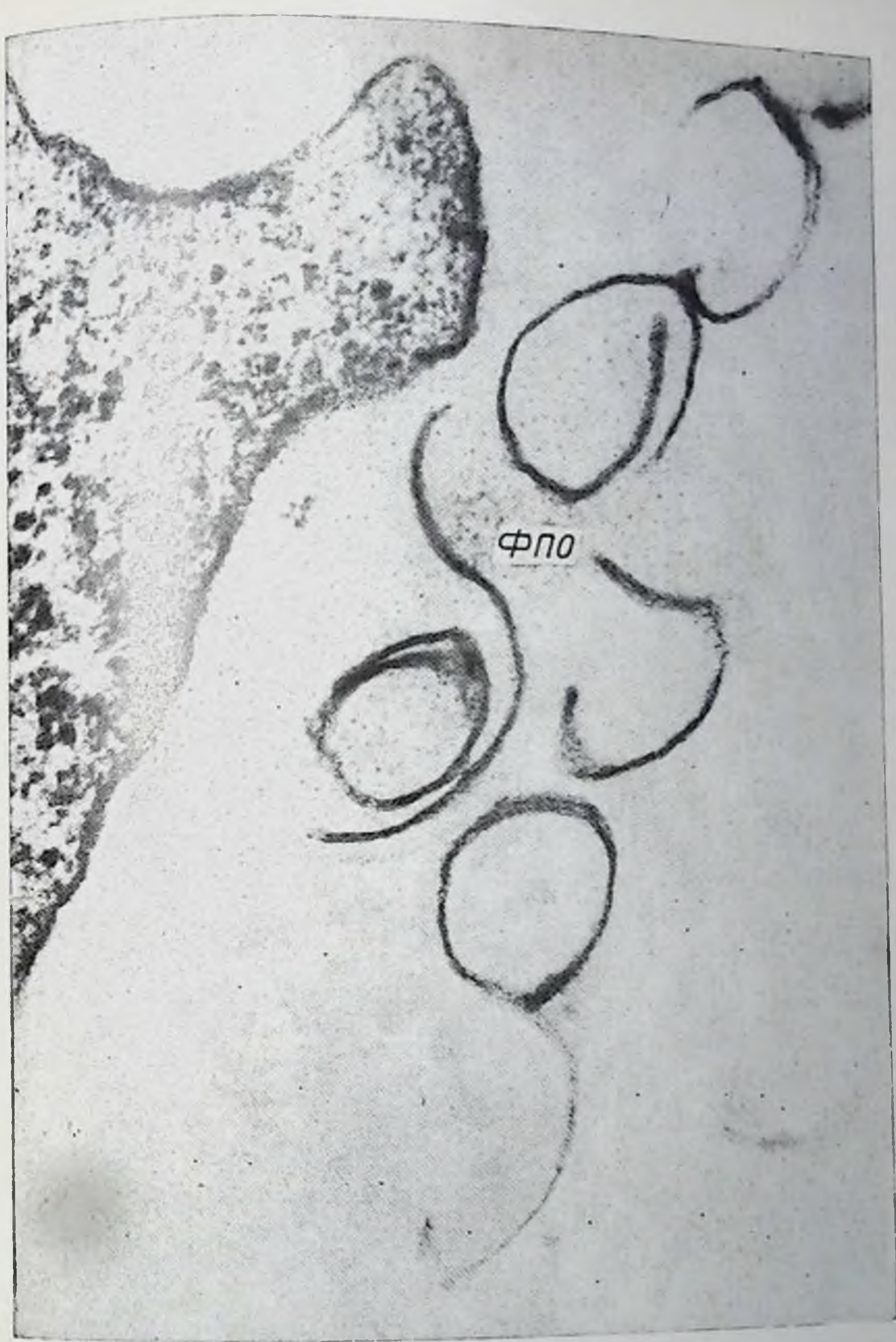


Рис. 70. Скопление фрагментов плазматических оболочек отделившихся от поверхности лимфоцитов. $\times 70\ 000$.

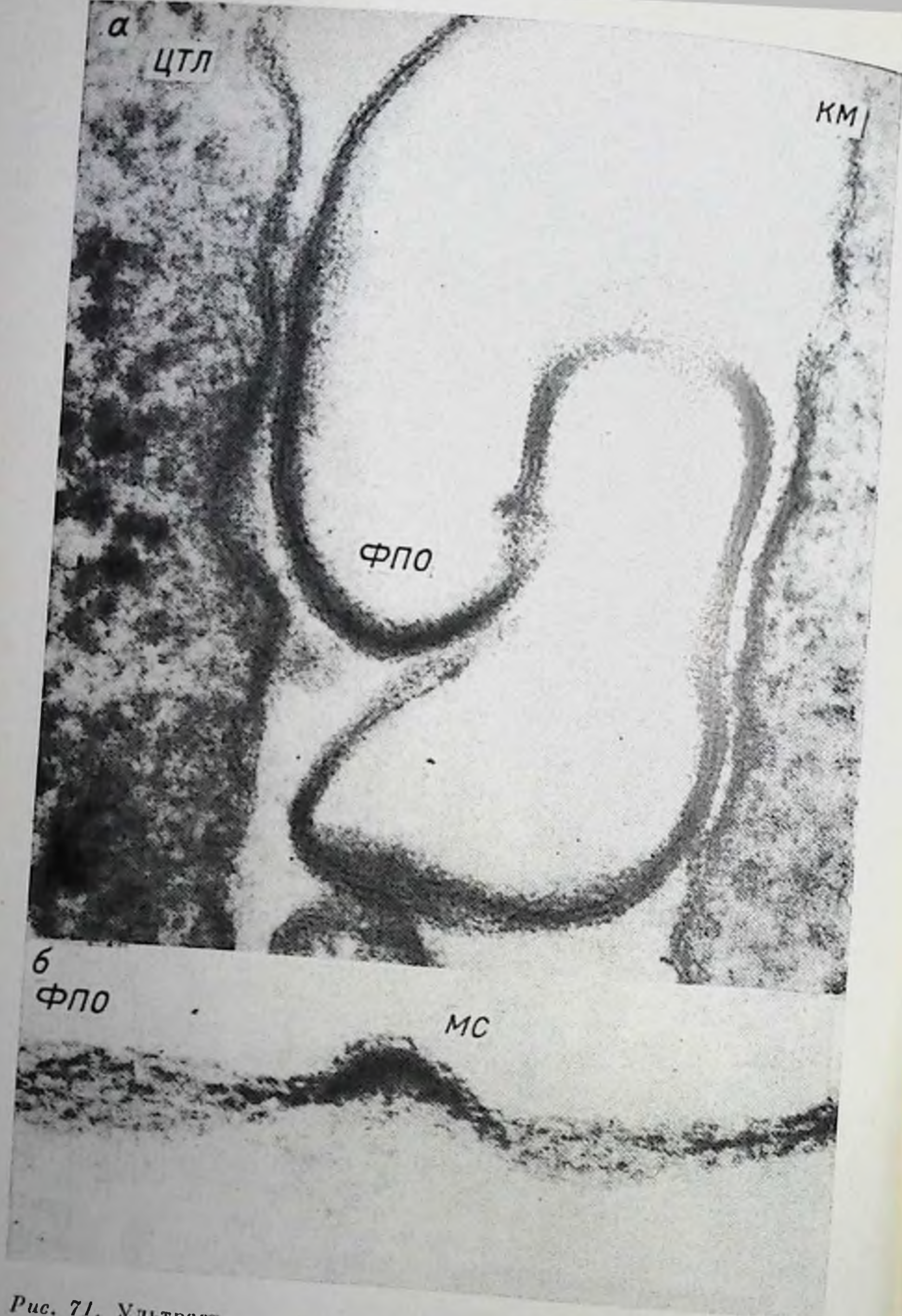


Рис. 71. Ультраструктура отделившихся от лимфоцита парных фрагментов плазматических оболочек в зоне контакта ЦТЛ и КМ (а) и в межклеточном пространстве (б). а — $\times 180\,000$; б — $\times 250\,000$.

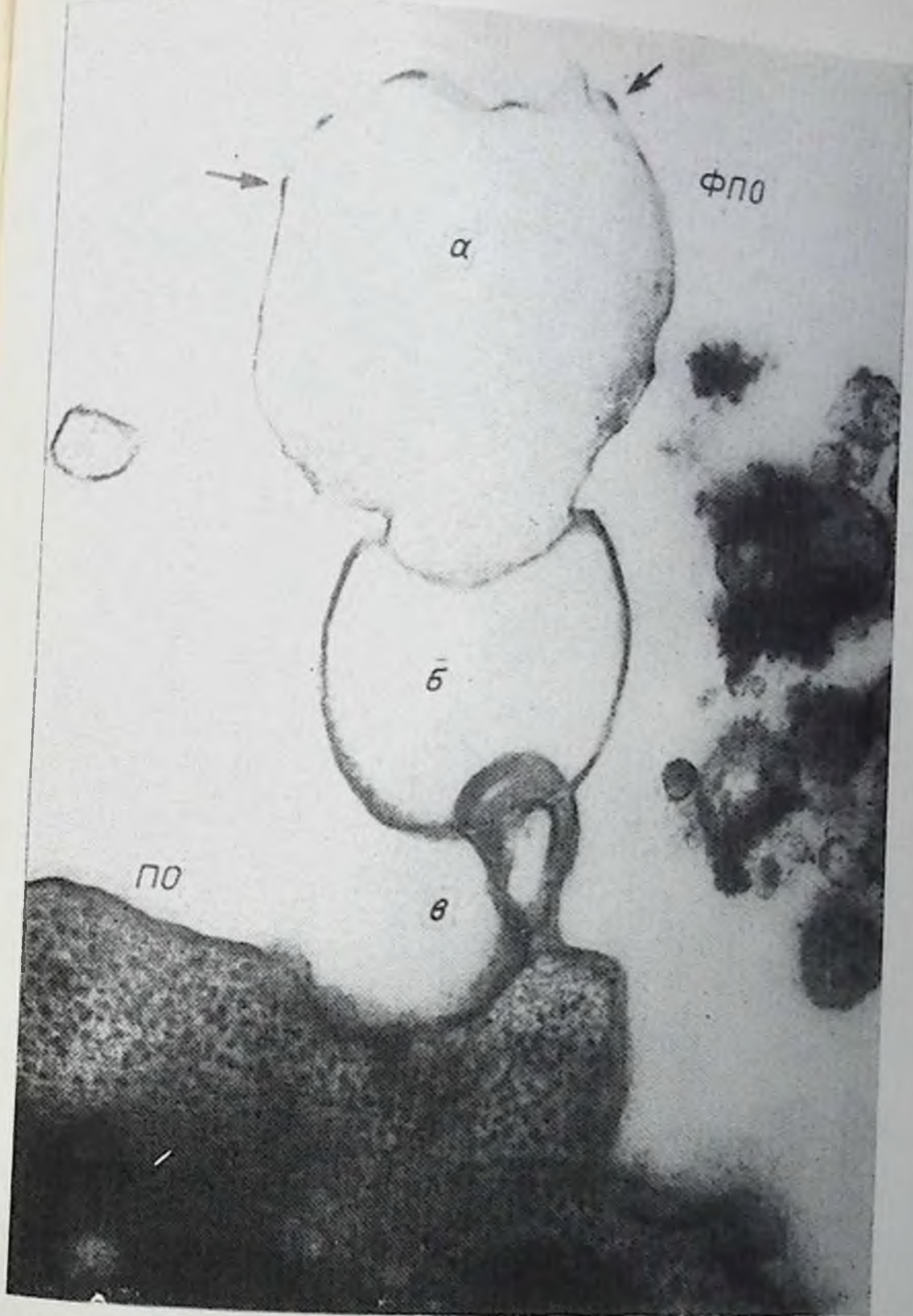


Рис. 72. Последовательное сдувание фрагментов (а, б, в) плазматической оболочки цитолитического Т-лимфобласта через 60 мин после контакта с клеткой-мишенью. Стрелками обозначены мембраносомы, локализующиеся на первом (а) фрагменте плазматической оболочки, отделившейся от поверхности лимфоцита. Стрелками обозначены мембраносомы. $\times 70\,000$.

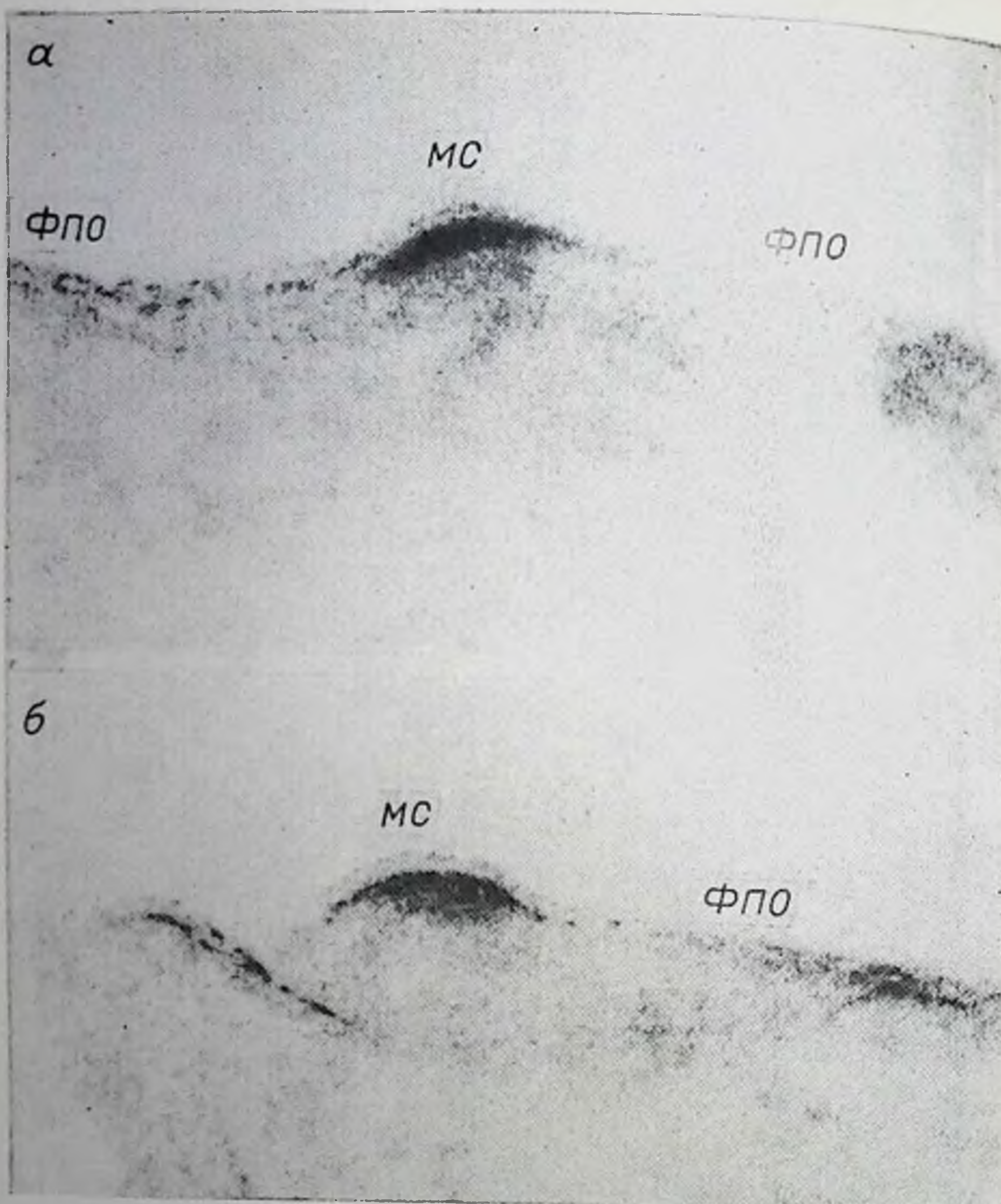


Рис. 73. Фрагменты предыдущей фотографии. Обозначены фрагменты сложенной плазматической оболочки и мембраносомы.

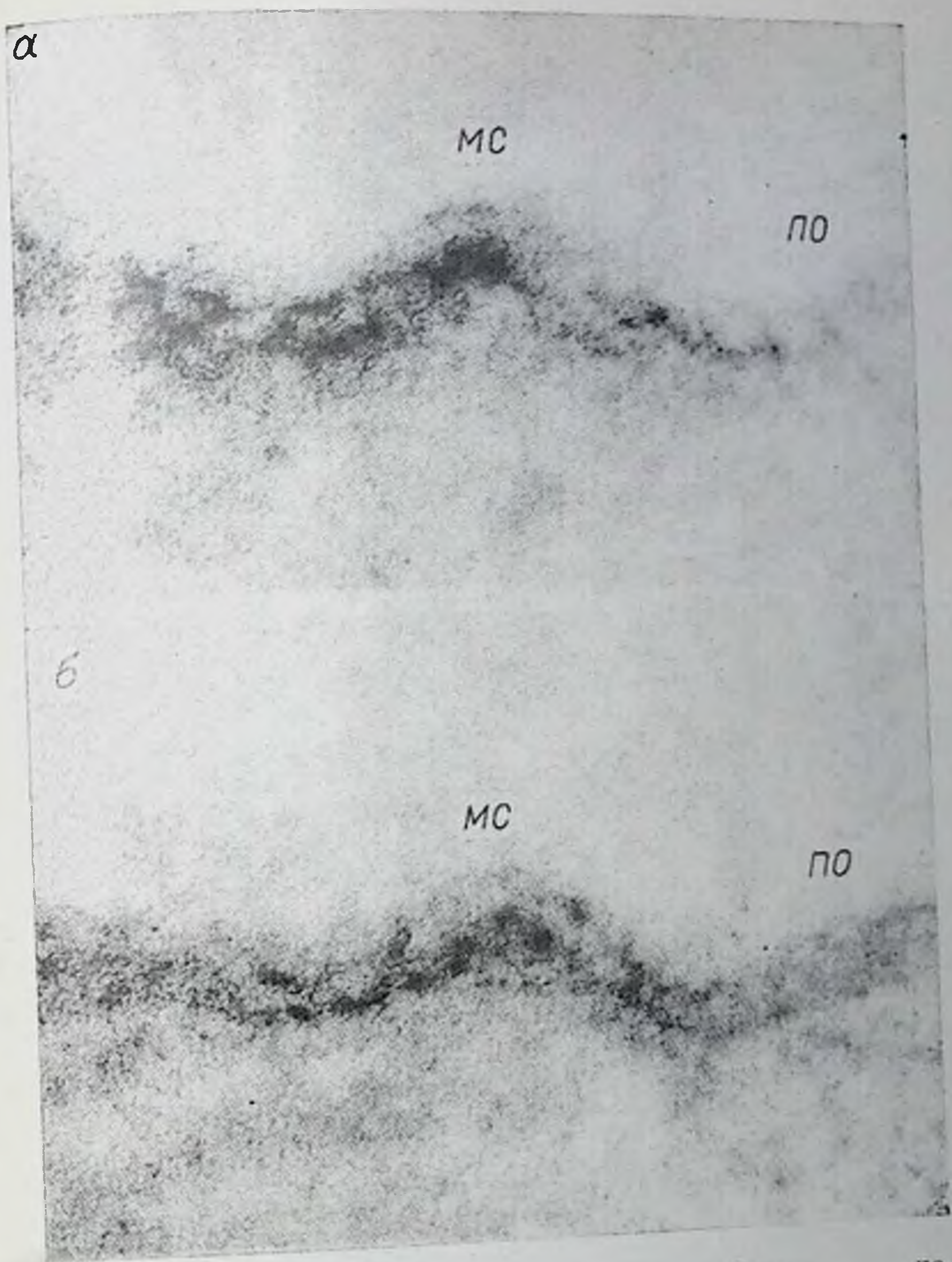


Рис. 74. Начальные этапы формирования мембраносом на поверхности ЦТЛ. $\times 760\,000$.

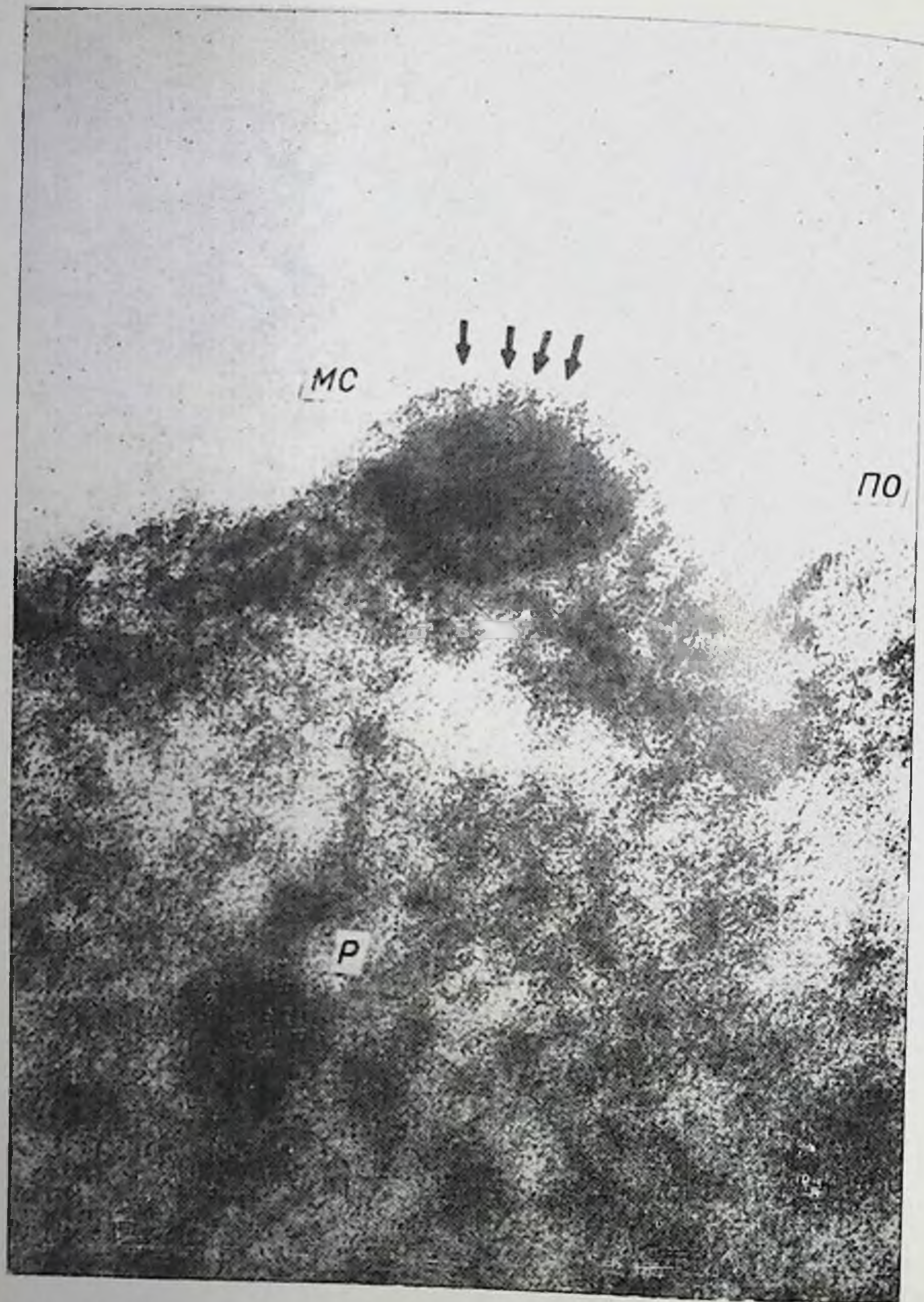


Рис. 75. Ультраструктура «зрелой» мембраносомы. Стрелками обозначены «отростки» мембраносомы. $\times 760\ 000$.

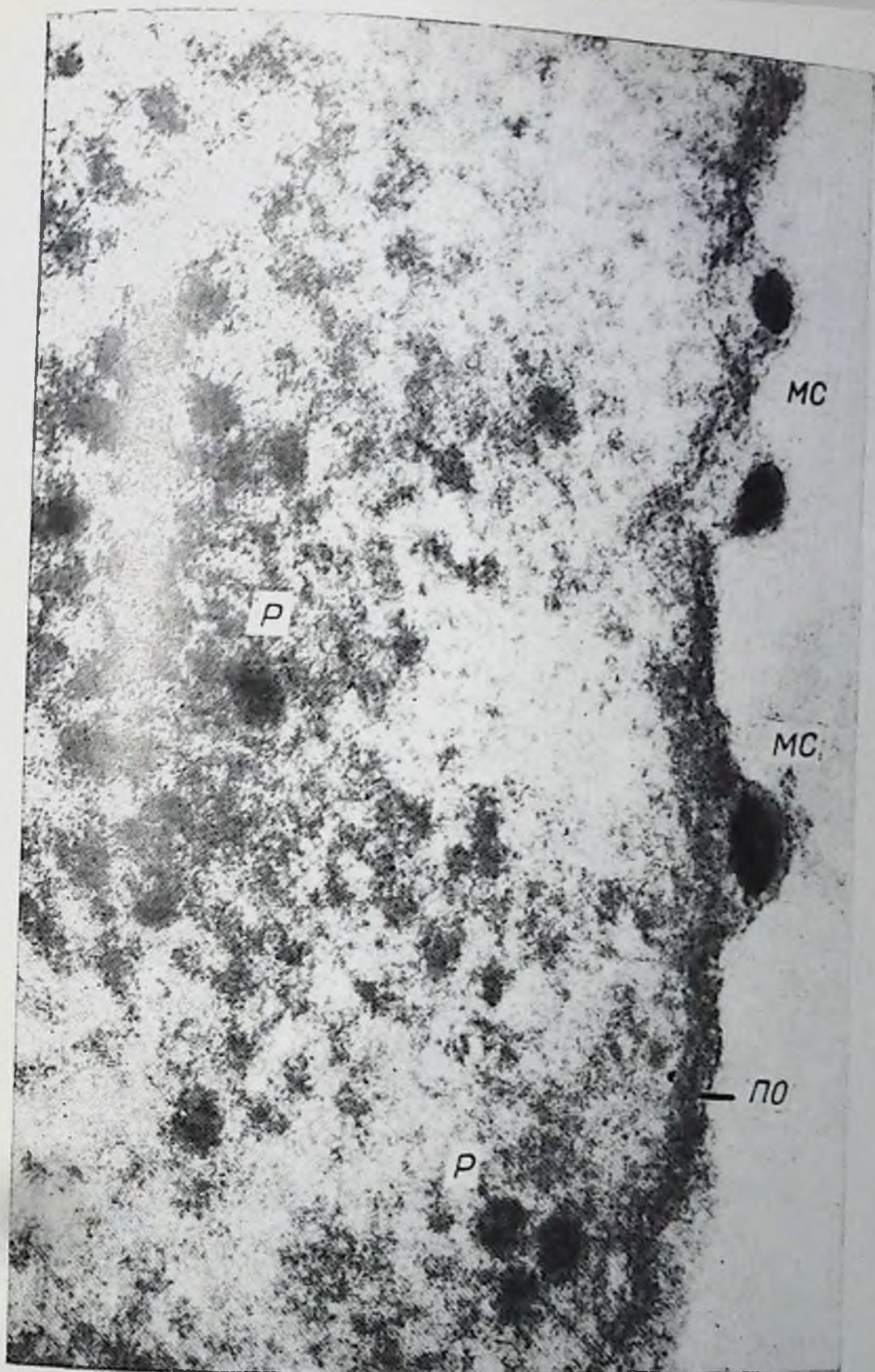


Рис. 76. Скопление мембраносом на поверхности ЦТЛ через 30 мин после контакта с клеткой мишенью. $\times 300\,000$.

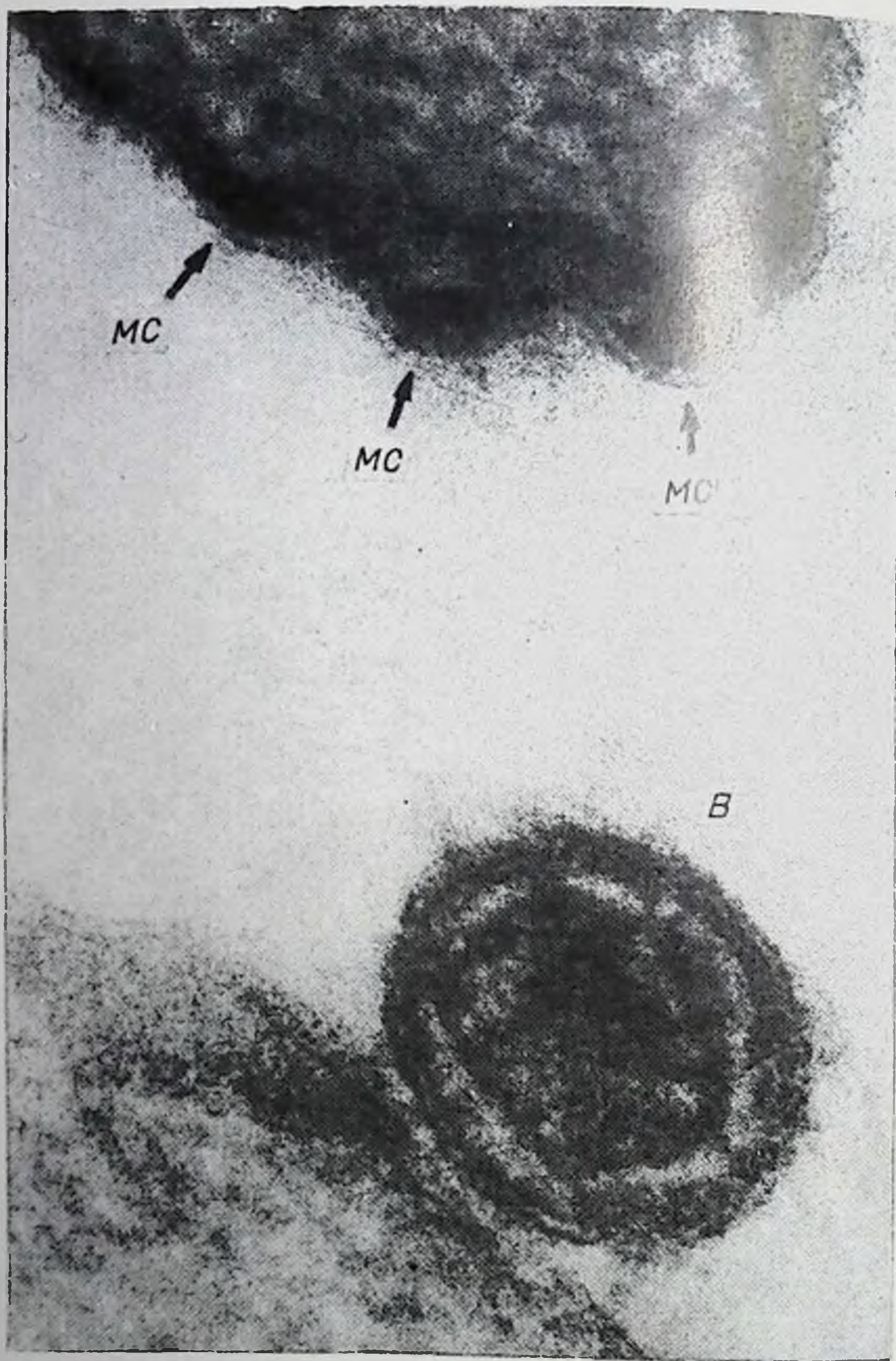


Рис. 77. Сравнение ультраструктуры мембраносом и внеклеточного онкорнавируса типа С. $\times 360\,000$.

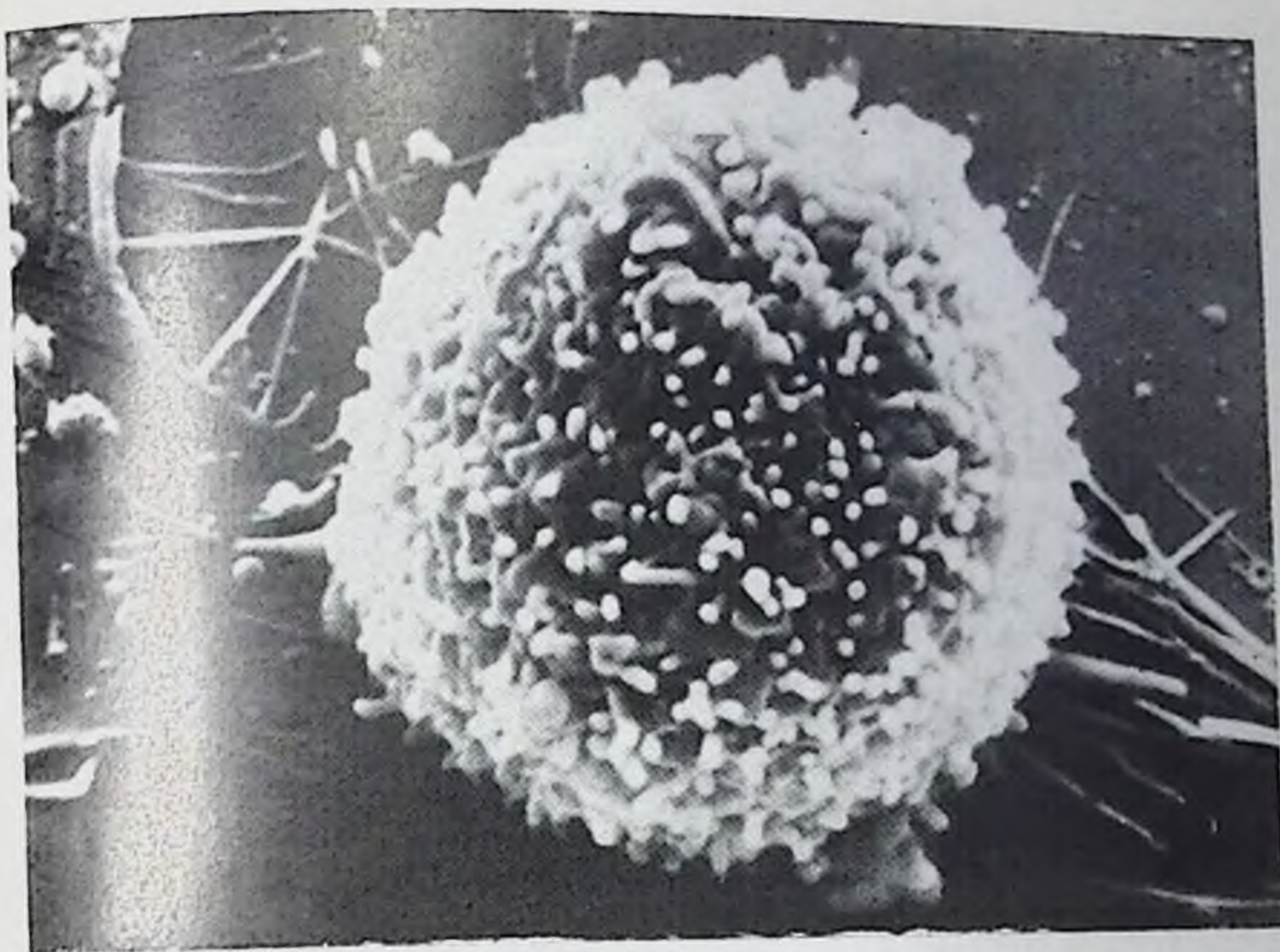


Рис. 78. Т-киллер, адсорбированный на поверхности клетки-мишени, через 5 мин от начала взаимодействия. $\times 15\ 000$.

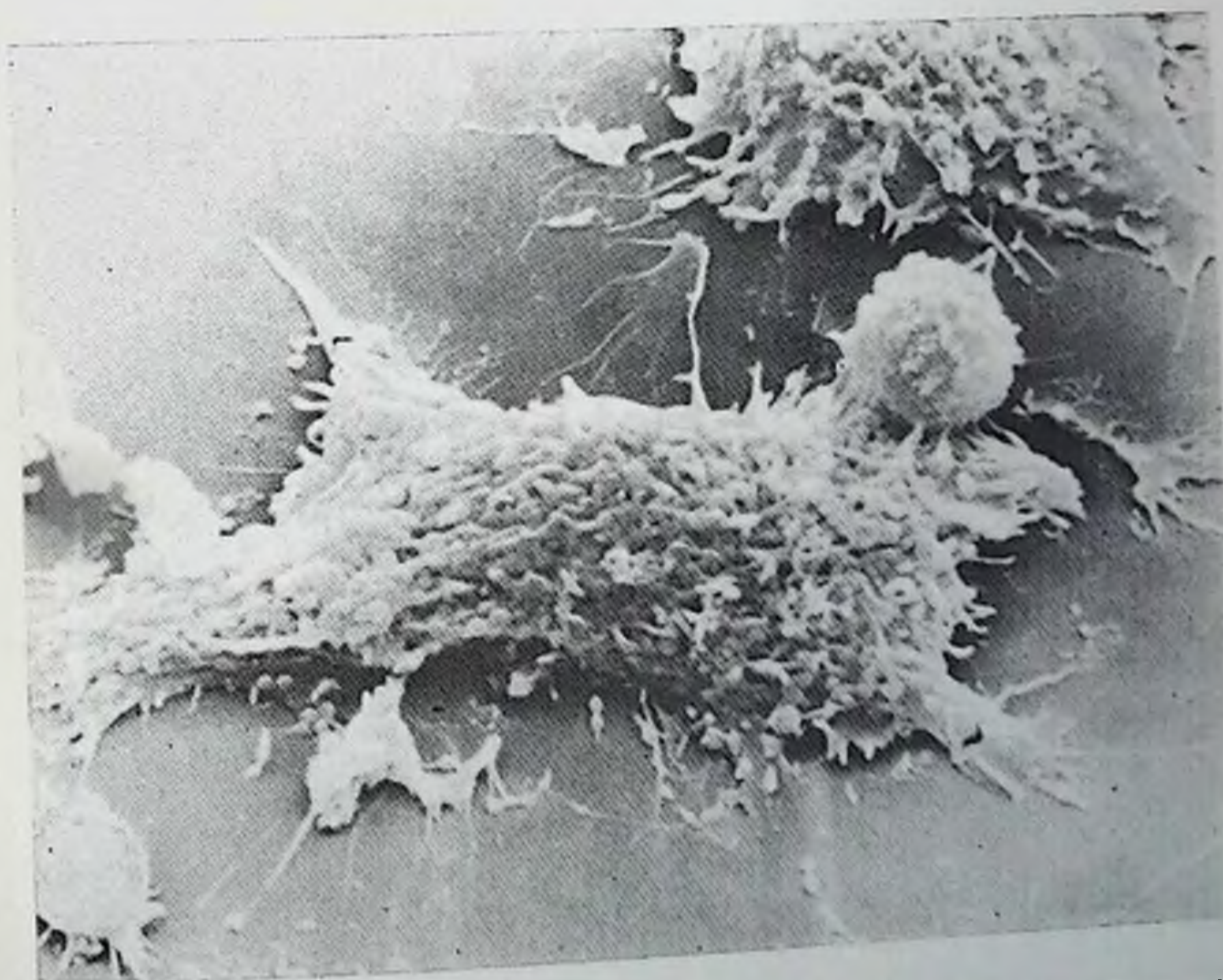


Рис. 79. Через 30 мин от начала взаимодействия зона контакта Т-киллера и КМ увеличивается. $\times 5\ 000$.

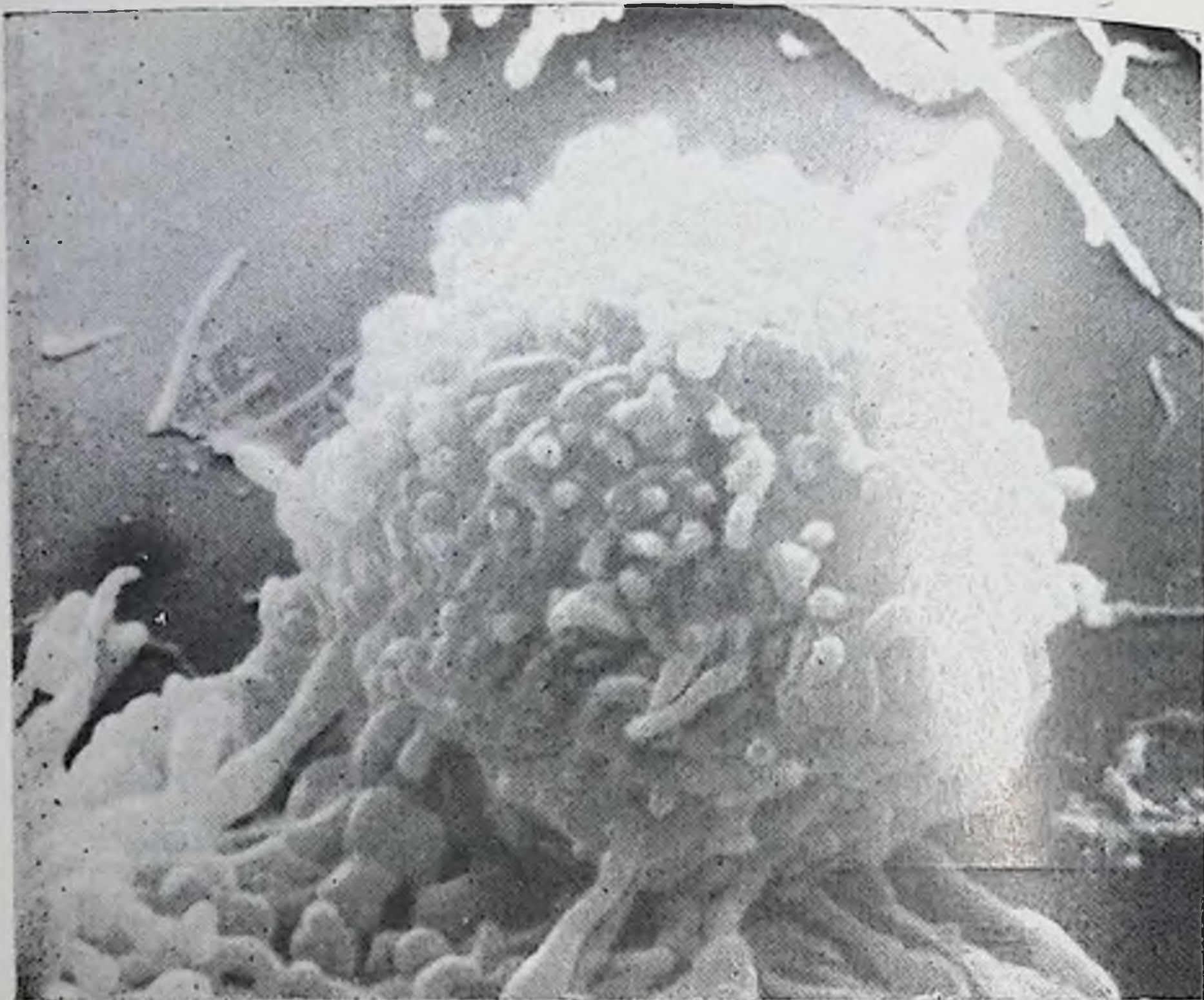


Рис. 80. Фрагмент рис. 79. Видны многочисленные микроворсинки, посредством которых Т-киллер адсорбируется на поверхности КМ. $\times 15\ 000$.

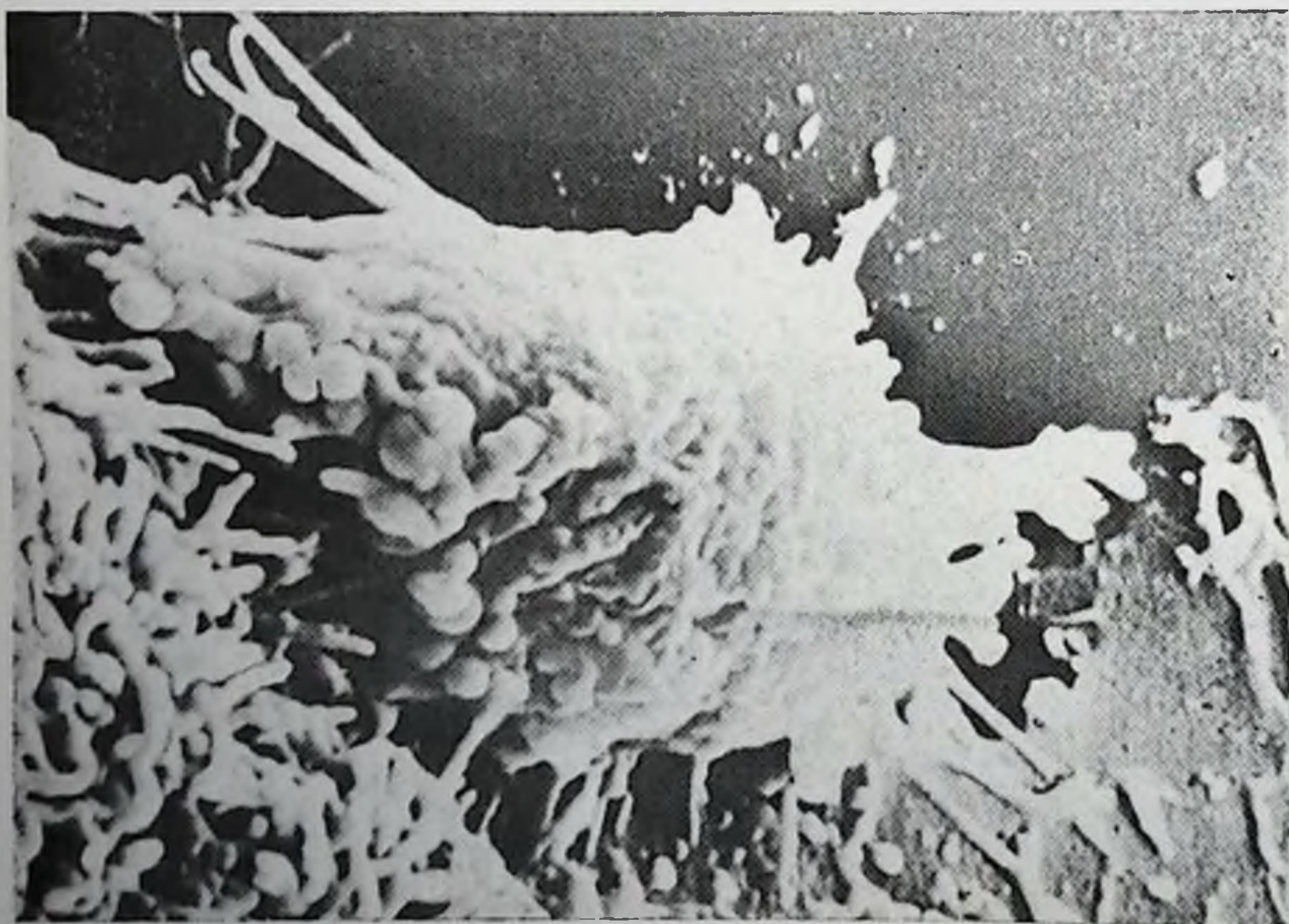


Рис. 81. С увеличением времени взаимодействия (60 мин) обнаруживаются складчатость мембраны лимфоцита и утолщение микроворсинок. $\times 15\ 000$.

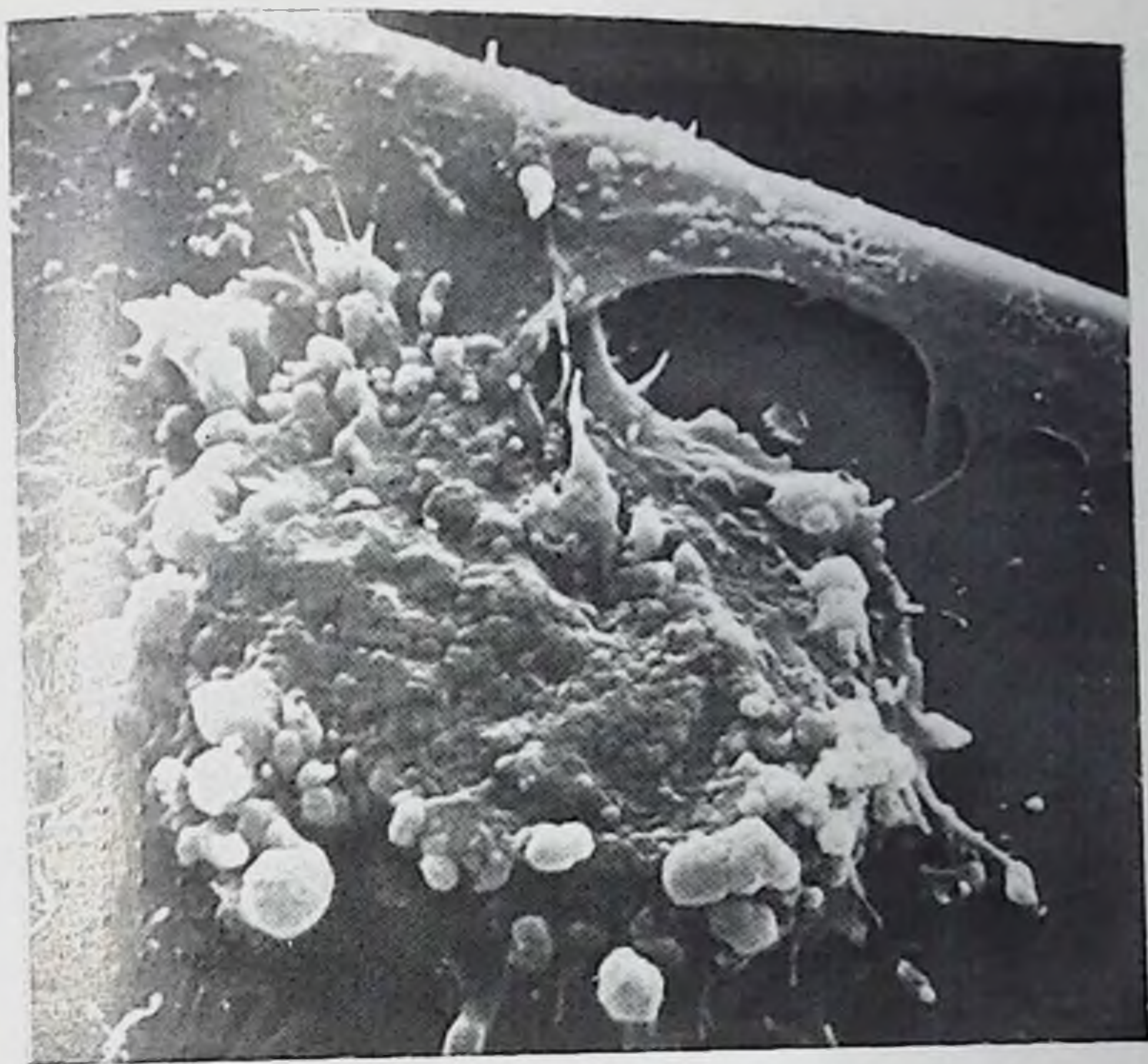


Рис. 82. Гибель клетки-мишени (120 мин взаимодействия) характеризуется пузырением цитоплазмы, клазмотозом и отделением ее от субстрата. $\times 5\,000$.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
Глава I. Субпопуляции Т-лимфоцитов и их участие в иммунном ответе на антигены, ассоциированные с главым комплексом гистосовместимости	6
Поверхностные антигены Т-лимфоцитов	7
Смешанная культура лимфоцитов (MLC)	9
Т-хелперы	13
Т-киллеры	22
Т-супрессоры	28
Глава II. Взаимодействие Т-киллеров с сингенными и аллогенными опухолевыми клетками-мишенями	34
Цитологическое исследование взаимодействия Т-киллеров и клеток-мишеней	35
Теоретические представления о механизме цитолиза клеток-мишеней	40
Три стадии цитолиза, опосредованного Т-киллерами	43
Глава III. Пролиферация и дифференцировка эффекторных Т-лимфоцитов	52
Сравнение пролиферативной и цитолитической активности в смешанной культуре лимфоцитов тимуса и селезенки	54
Ультраструктура эффекторных лимфоцитов, адсорбированных на поверхности клеток-мишеней	57
Клетки памяти	59
Дифференцировка секреторного аппарата в цитоплазме вторичных Т-киллеров	68
Глава IV. Активация секреторного аппарата Т-киллеров, взаимодействующих с клетками-мишенями	73
Механизмы секреции	—
Выход секрета	77
Свойства Т-киллеров перитонеального экссудата	81
Морфология экзоцитоза	88
Шеддинг плазматической мембраны Т-киллера и ее компонентов	91
Мембраносомы	94
Выделение и характеристика лимфотоксина	97
Глава V. Злокачественные процессы у бестимусных животных	106
Ранняя тимэктомия и индукция опухолей химическими канцерогенами	—

	Иммунодепрессия и индукция опухолей онкогенными ви- русами	107
	«Чистая» иммунодепрессия, врожденное отсутствие ти- муса и опухоли у мышей	114
Глава VI.	Влияние тимэктомии на возникновение и рост опухолей в зависимости от экспериментальной системы	126
	Иммунодепрессия и опухоли молочных желез у мышей высокоракковых линий	128
	Генетическая дифференциация тимуса мышей в связи с предрасположенностью к злокачественному росту	135
	Зависимость действия ранней тимэктомии на развитие опухолей молочной железы от генотипа мышей	139
	Повышение частоты возникновения опухолей молочной железы у крыс, инфицированных мышечным вирусом Бит- тнера	141
Глава VII.	Иммуногенетические аспекты злокачественного роста	146
Литература	152
Приложение	180

11212121

11212121

11212121