

ONKOLOŠKI INŠTITUT, LJUBLJANA  
**TUMOR NEKROZANTNI FAKTOR (TNF)**  
TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF)

Serša G.\*

**Abstract** – Synthesis of recombinant human TNF has promoted investigations of its biological activities. Research has been concentrated predominantly on r-TNF antitumor activities both in vitro and in vivo. It should be noted, however, that tumors respond to TNF treatment variable, being highly, moderately or nonresponsive, but the mechanisms of r-TNF antitumor action remain unsolved. Recent knowledge of interactions between r-TNF and the other cytokines has allied r-TNF among other immunoregulatory molecules. Since 1985 r-TNF has entered phase I clinical trials, where its therapeutic benefits have proved to be minor. Nevertheless combination of r-TNF with other cytokines, LPS or other cytotoxic drugs might prove that r-TNF can be beneficial in cancer treatment.

**UDC:** 616-006.6-085:616-008.853.2

**Key words:** tumor, necrosis factor

**Orig. sci. paper**

**Radiol. lugosl.** 21(3) 261–266, 1987

Imunološki pristop zdravljenju raka se je v zadnjem času osredotočil predvsem na dve področji. Eno je ugotavljanje novih antigenov na malignih celicah z uporabo monoklonalnih protiteles, drugo je preučevanje protitumorskega delovanja proteinov, ali celic, ki spodbujajo imunološke mehanizme. Invazivne bolezni, kot so infekcije ali maligna obolenja, pogosto povzročajo spremembe v metabolizmu organizma. Običajno so akutne in kronične metabolne spremembe posredovane z imunološkim sistemom, to je spodbujanjem mononuklearnih celic in limfocitov k izločanju molekul z različnimi biološkimi učinki, imenovane citokini. Citokini so v zadnjem času postali dostopni z izjemnim napredkom tehnike kloniranja humanih genov v genomu bakterij. Seznam rekombinantnih citokinov se je razširil od prvih alfa, beta, gama interferonov ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -IFN) na interleukin 2 (IL-2), interleukin 1 (IL-1), interleukin 3 (IL-3), granulocitno makrofagne kolonije spodbujajoči faktor (GM-CSF), limfotoksin in tumor nekrozantni faktor (TNF).

Med vsemi naštetimi zavzema TNF posebno mesto. Kot napoveduje njegovo ime je definiran po lastnosti, da povzroča nekrozo mišjih tumorjev. Zaradi tega je s pojavom rekombinantnega TNF na tržišču doživelo izjemen zagon raziskovanje njegovega protitumorskega delovanja in potencialna uporaba v kliniki. Mnogo manj je znanega o delovanju TNF kot imunomodulatorju ter njegov odnos do drugih citokinov.

Fenomen nekroze tumorjev je prvi opisal Coley pri bolnikih z malignimi tumorji, ki so imeli sočasno bakterijsko infekcijo (17, 18, 19). Pri nekaterih bolnikih je opazil zelo dober protitumorski učinek a sočasno je bilo nemogoče kontrolirati potek infekcije. Zato je leta 1893 uporabil mešanico bakterijskih toksinov *Streptococcus pyogenes* in *Serratia marcescens*, ki je bila mnogo manj toksična. To so verjetno bili prvi začetki zdravljenja raka z modulatorji biološkega odziva (MBO). Za tem je Shear izoliral iz Coleyvega toksina frakcijo polisaharidov brez primesi proteinov, ki je bila 1000-krat učinkovitejša v indukciji hemoragične nekroze mišjih tumorjev (55). Ta polisaharid je znan kot endotoksin ali bakterijski pirogen. Biokemično je lipopolisaharid (LPS) in glavna komponenta gram negativnih bakterij (36).

Drugi del raziskav interakcij bakterij in raka se je osredotočil na nespecifično odpornost z uporabo mikroorganizmov kot so *Bacillus Calmette Guerin* (BCG) in *Corynebacterium parvum*. BCG in *C. parvum* injicirane živali imajo povišano odpornost na transplantabilnost tumorskih celic (45, 64). Ti MBO spodbujajo imunsko odzivnost organizma z aktivacijo mononuklearnega sistema celic. Glede na to lahko bakterijske produkte razdelimo na dva razreda, katerih prominentni predstavniki so BCG in LPS. Učinki BCG-ja, ki so odvisni od imunskega sistema in LPS kate-

rega nekrozantni učinek je neodvisen od imunskega sistema.

Dolgo časa je bilo znano, da imajo makrofagi pomembno vlogo v protitumorskem delovanju BCG in LPS, ker oba aktivirata makrofage k protitumorskem delovanju in vitro. Prvo potrdilo o povezanosti delovanja BCG, LPS, nekroze tumorjev, aktivacije makrofagov in citotoksičnih faktorjev je prišlo pred desetimi leti. Leta 1975 je Carswell s sodelavci (14) ugotovil, da serumi miši, ki so bile injicirane z BCG in za tem z LPS, povzročajo hemoragično nekrozo mišjih tumorjev in imajo citotoksični ali citostatični učinek na maligne celice in vitro. Faktor, ki posreduje te učinke so imenovali nekrozantni faktor (TNF). Za indukcijo TNF v miših je potrebno v prvi fazi spodbuditi proliferacijo makrofagov ter v drugi fazi inducirati izločanje s LPS. Na tem principu je mogoče inducirati TNF v serumu ne samo miši, temveč tudi v zajcih (29, 31, 41).

Kot standardni model in vivo testiranja TNF seruma na miših je zelo primeren Meth A sarkomski tumor (14). Že 24 ur po vbrizgavanju TNF seruma je vidna nekroza 6–7 mm velikih podkožnih tumorjev. TNF poleg na sarkom A deluje tudi na vrsto drugih tumorjev, ki pa so različno občutljivi, od zelo rezistentnih, do dobro občutljivih (14). In vitro je TNF serum citotoksičen na vrsto mišjih celičnih linij, Meth A sarkomsko linijo, L celice (NCTC Clone 929) in BALB/c embrionalne fibroblaste (14). Med njimi je L celična linija izbrana kot standardni model za določanje aktivnosti TNF, zaradi njene visoke občutljivosti.

Napredek v raziskovanju delovanja TNF je pomenila njegova izolacija in čiščenje iz seruma miši (28). Protein ima molekulsko težo 40.000 v natrijevem dodecil sulfatu in disociira v dve podenoti z molekulsko težo 18.000. Izolacija podklona iz TNF občutljivih L celic (Ls), ki so TNF rezistentne (Lr), pa je omogočila nadaljnje raziskave v smeri določanja, katere celice so glavni producenti TNF (62). Ugotovljeno je bilo, da so supernatanti mišjih makrofagov in histiocitomskih linij citotoksični na Ls celice in brez učinka na Lr celice. To spoznanje je podprlo splošna opažanja, da so makrofagi glavni viri serumskega TNF (38, 40).

Mišji TNF je bil testiran tudi na vrsti humanih celičnih linij (32, 63). Njegov učinek bi lahko kategorizirali na citotoksični, citostatični ali brez učinka (32, 63). Nasprotno, nobena od normalnih celic, ki so bile testirane na TNF, kot so fibro-

blasti, ledvični epitelij in melanociti, ni bila občutljiva na TNF (32, 63). To kaže na selektivno delovanje TNF samo na transformirane celice in njegovo specijsko nespecifičnost.

Poleg mišjih makrofagov izloča TNF tudi vrsta humanih mielomonocitnih celičnih linij. Identificiranih je bilo več celic, med katerimi so Luk II in HL 60 bile najsposobnejše sintetizirati TNF (50, 62). Čiščenju in izolaciji je sledilo določanje aminokislinskega zaporedja, sinteza komplementarne DNA (cDNA) in konstrukcija plazmida v *E. coli* (2, 56, 61). Iz teh študij je znano, da ima rekombinantni humani TNF (r-TNF) molekulsko težo 45.000 določeno z gelsko filtracijo, kar se odlično sklada (80 %) s podatki o mišjem rekombinantnem TNF, ki je bil tudi nedavno sintetiziran (26, 39, 47). Gen humanega r-TNF je na 6 kromosomu, zelo blizu gena za limfotoksin, ki je citotoksični faktor stimuliranih limfocitov (44). Čeprav sta r-TNF in limfotoksin biološko različni molekuli in sintetizirani na ločenih genih, kažeta 28 % homologijo v aminokislinskem zaporedju (27). Klonirani limfotoksin je tako kot r-TNF citotoksičen za L celice in in vivo povzroča hemoragično nekrozo tumorjev (33, 49, 51). Še en faktor, kahektin, kaže izjemno podobnost s r-TNF. Ima enako aminokislinsko zaporedje in je verjetno identičen s r-TNF (6, 7). Kahektin je ravno tako produkt makrofagov a ima sposobnost supresije encima lipoproteinske lipaze v adipocitih, kar povzroča trigliceridemijo in hujšanje (8, 9). Vse to nakazuje, da v organizmu obstoja več sorodnih molekul, ki jih izločajo različne imunske celice a imajo podobne biološke lastnosti. Verjetno je, da obstoja v organizmu več citotoksičnih faktorjev s tumor nekrozantno aktivnostjo, ki so kodirani v različnih genih a imajo določeno stopnjo homolognosti, ki je zelo podobna sistemu molekul interferonov.

In kakšna naj bi bila biološka vloga TNF v organizmu? Verjetno je, da se v evoluciji vse te molekule niso razvile samo za protitumorsko delovanje, zato je vloga TNF v vnetni reakciji mnogo pomembnejša. Ker njegove imunoregulatorne funkcije še niso dovolj raziskane a nakazujejo vsestranski vpliv na celični in humoralni odgovor imunskih celic, lahko pričakujemo, da je to še eden izmed citokinov, ki ima pomembno vlogo v regulaciji že tako kompleksnega imunskega sistema.

Kljub temu so se raziskave osredotočile predvsem na protitumorsko delovanje r-TNF. Aktivnost r-TNF je bila testirana na različnih mišjih

tumorskih modelih in primarnih humanih tumorjih na golih miših (4, 12, 30). Uspeh zdravljenja variira, kajti tumorji reagirajo na r-TNF zelo različno (4, 12, 21). Odzivnost tumorja zaenkrat ni bila povezana z biološkimi lastnostmi tumorjev, kot so histološki tip ali imunogenost tumorja. Ravno tako in vitro citotoksičnost r-TNF ne zagotavlja dobro in vivo odzivnost iste tumorske linije (21), kar nakazuje na delovanje r-TNF s posredovanjem protitumorskih mehanizmov organizma in ne neposredno delovanje na tumorske celice. Ti mehanizmi so lahko dvojni, spodbujanje imunskih celic ali vpliv na vaskulaturu tumorja in inhibicija angiogeneze (37, 43, 52). To potrjujejo tudi rezultati na imunosuprimiranih živalih, kjer obsevanje celega telesa le delno zavre učinek zdravljenja z r-TNF (neobjavljeni podatki). Vsekakor je potrebno razširiti znanje o mehanizmih protitumorskega delovanja r-TNF, katere imunске celice so udeležene v odzivu na r-TNF in kateri neimunološki mehanizmi.

Kot poskusni tumorji, so tudi celice in vitro različno občutljive na r-TNF (57). Le na tretjino celičnih linij deluje r-TNF citotoksično, na ostale citostatično ali je brez učinka (32, 63). Zagonetka je mehanizem njegovega citotoksičnega in specifičnega delovanja samo na transformirane celice, dočim na normalne ne deluje ali celo spodbuja njihovo rast (57, 60). Za citolizo celic s r-TNF je potrebna vezava molekule na celični receptor, kateri sledi internalizacija tega kompleksa (3). Interferon gama lahko spodbuja izražanje in sintezo r-TNF receptorjev na celicah, kar lahko razloži sinergistični učinek IFN- in r-TNF v protitumorskem delovanju (1, 10). Mnoge r-TNF odporne celice, transformirane in normalne, imajo enako število receptorjev kot r-TNF občutljive celice (58). Zato je za citotoksičnost r-TNF potrebna ne samo vezava na celični receptor, temveč tudi kaskada še vedno neraziskanih procesov v celici. R-TNF deluje na celični ciklus s tem, da ustavi celice v G-2 in M fazi, kjer po 24 urah začne odmiranje celic (22). Liza celic nastopi predvsem v telofazi mitoze, ko so te najbolj občutljive (22).

Zanimanje za biološko vlogo makrofagov, predvsem v tumorski biologiji, sloni na dognanju da so to sposobne efektorske celice v specifičnem in nespecifičnem ubijanju tumorskih celic. Znano je, da je potreben tesen kontakt med makrofagi in tumorskimi celicami, vendar efektorska molekula ni bila znana. Reaktivni metaboliti kisika, komponente komplementa, neutralne

proteaze in arginaza, so možni mediatorji citolize, poleg r-TNF v zadnjem času (46, 59). To podpirajo dognanja, da stimulatorji makrofagov spodbujajo izločanje r-TNF ter da se citolitično delovanje r-TNF lahko izniči s specifičnimi anti r-TNF protitelesi (59). Vse več študij v zadnjem času potrjuje to domnevo, tako da je r-TNF ena glavnih molekul udeleženi v monocitno makrofagni citolizi (25, 59).

Poleg tega lahko r-TNF in vivo izrazi cel spekter bioloških aktivnosti poleg zaviranja rasti tumorskih celic. Kot ostali citokini deluje r-TNF na imunске in ortotopne celice kot spodbujevalec izločanja drugih citokinov. Tako lahko r-TNF spodbuja sintezo in izločanje IL-1 monocitov in endotelijskih celic (24), GM-CSF endotelijskih celic (13), kolagenaze in prostaglandina E-2 sinovijskih celic in dermalnih fibroblastov (23). Njegova imunoregulatorna vloga je tudi v tem, da lahko spodbuja delovanje imunskih celic, kot so polimorfonuklearni leukociti (42, 54), ter T in B limfociti (34, 53). Zanimive so tudi lastnosti kot so indukcija HLA-A, B antigenov endotelijskih celic in fibroblastov (20) ter inhibicija sinteze kolagenaze in resorpcija kosti (5). Tako se r-TNF vključuje v regulacijo imunskega odziva z ostalimi citokini, kot enakovreden predstavnik, saj je njegova vloga vsestranska.

Leta 1985 so v ZDA začeli predklinične študije s r-humanim TNF. Prva poročila o uspehih so bila objavljena šele nedavno (11, 16, 35). V prvi fazi kliničnih testiranj so ugotovili predvsem toksične doze r-TNF in primerjali intravensko s podkožnim apliciranjem. Najpogostejši stranski učinki zdravljenja so bili rigor, povišana telesna temperatura in glavobol, manj pogosti pa hipoin hipertenzija, periferna vasokonstrikcija, nausea in bruhanje. Podkožno injiciranje r-TNF je posebno v višjih dozah povzročilo lokalno vnetje z infiltracijo predvsem mononuklearnih celic. Zdravljenje ni imelo učinka na tumorsko maso, le začasno na velikost bezgavk.

Čeprav so prvi rezultati kliničnih testiranj razočarali, obstoja se vedno upanje na boljši uspeh v kombinaciji z drugimi vrstami zdravljenja. V prvi vrsti je zanimiva kombinacija dveh citokinov, IFN- in r-TNF, ki delujeta sinergistično in vitro in in vivo na eksperimentalnih modelih (4, 12). Drugo možno pot pa nakazuje kombinacija LPS in TNF, ki lahko v mnogo nižjih dozah dosežeta boljši uspeh zdravljenja (15), kar kaže na njuno sinergistično delovanje. Poleg tega obstoja možnost sinergističnega delovanja r-TNF z nekate-



rimi kemoterapeutiki (48). Ne nazadnje zaradi specifičnega delovanja r-TNF na celični ciklus, lahko pričakujemo sinergistično delovanje z ionizirajočim sevanjem, ker r-TNF zavre celice v fazah, ki so najbolj radiosenzitivne. Poleg tega pa rezultati študij nakazujejo delovanje r-TNF neposredno na vaskulaturu tumorja, kar omogoča dodatni terapevtski učinek v kombinaciji z drugimi vrstami zdravljenja.

Glede na dosedanje znanje o r-TNF lahko ugotovimo, da je njegova vloga v organizmu vsestranska. Od prvih študij, ki so raziskovale predvsem njegov protitumorski učinek, se v zadnjem času širi znanje o njegovih ostalih bioloških aktivnostih. Klinična preizkušanja so do sedaj razočarala a verjetno je bodočnost uporabe bioloških modifikatorjev odziva v sočasni uporabi večih citokinov. Za to pa je potrebno poglobiti znanje o njihovem medsebojnem delovanju in vsestranskih učinkih na organizem.

### Povzetek

Sinteza rekombinantnega humanega TNF je spodbudila raziskovanja njegovih bioloških aktivnosti. Študije so se usmerile predvsem v proučevanje protitumorske aktivnosti na malignih celičnih linijah in vitro in in vivo. Pokazale so se velike razlike v odzivnosti različnih tumorskih linij, mehanizem citotoksičnega delovanja TNF pa ostaja še vedno nerazjasnjen. Vedno bolj je jasna vloga TNF v regulaciji imunskega odziva, ker sodeluje v izločanju ostalih citokinov in lahko regulira aktivnost imunskih celic. Od leta 1985 je r-TNF uporabljan v prvi fazi kliničnih študij. Nedavna poročila o uspehu zdravljenja niso dosegla pričakovane rezultate, vendar se kljub temu nakazujejo nove poti v kombinaciji z drugimi citokini in ostalimi vrstami zdravljenja raka.

### Literatura

- Aggarwal B. B., Eessalu T. E., Hass P. E.: Characterization of receptors for human tumor necrosis factor and their regulation by  $\gamma$ -interferon. *Nature* 318: 665–667, 1985.
- Aggarwal B. B., Kohr W. J., Hass P. E., Moffat B., Spencer S. A., Henzel W. J., Bringman T. S., Nedwin G. E., Goeddel D. V., Harkins R. N.: Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.* 260: 2345–2354, 1985.
- Baglioni C., McCandless S., Tavernier J., Fiers W.: Binding of human tumor necrosis factor to high affinity receptors on HeLa and lymphoblastoid cells sensitive to growth inhibition. *J. Biol. Chem.* 260: 13395–13397, 1985.
- Balkwill F. R., Lee A., Aldam G., Moodie E., Thomas J. A., Tavernier J., Fiers W.: Human tumor xenografts treated with recombinant human tumor necrosis factor alone or in combination with interferons. *Cancer Res.* 46: 3990–3993, 1986.
- Bertolini D. R., Nedwin G. E., Bringman T. S., Smith D. D., Mundy G. R.: Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factors. *Nature* 319: 516–518, 1986.
- Beutler B., Mahoney J., LeTrang N., Pekala P., Cerami A.: Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin induced RAW 264.7 cells. *J. Exp. Med.* 161: 984–995, 1985.
- Beutler B., Greenwald D., Hulmes J. D., Chang M., Pan Y. C. E., Mathison J., Ulevitch R., Cerami A.: Identity of tumor necrosis factor and the macrophage secreted factor cachectin. *Nature* 316: 552–554, 1985.
- Beutler B., Milsark I. W., Krochin N., Cerami A.: Cachectin (tumor necrosis factor; TNF): The molecule responsible for the lethal effect of endotoxin. *Blood* 66: 83 a, 1985.
- Beutler B., Cerami A.: Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 320: 584–588, 1986.
- Beutler B., Tkacenko V., Milsark J., Krochin N., Cerami A.: Effect of  $\gamma$ -interferon on cachectin expression by mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 164: 1791–1796, 1986.
- Blick M. B., Sherwin S. A., Rosenblum M. G., Gutterman J. U.: A phase I trial of recombinant tumor necrosis factor (rTNF) in cancer patients. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 5: 14, 1986.
- Brouchaert P. G. G., Leroux-Roels G. G., Guisez Y., Tavernier J., Fiers W.: In vivo anti-tumor activity of recombinant human and murine TNF, alone and in combination with murine IFN- $\gamma$ , on a syngeneic murine melanoma. *Int. J. Cancer* 38: 763–769, 1986.
- Broudy V. C., Kauschansky K., Segal G. M., Harlan J. M., Adamson I. W.: Tumor necrosis factor stimulates human endothelial cells to produce granulocyte/macrophage colony stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 7467–7471, 1986.
- Carswell E. A., Old L. J., Kassel R. L., Green S., Fiore N., Williamson B.: An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 3666–3670, 1975.
- Chun M., Hoffmann M. K.: Combination immunotherapy of cancer in a mouse model: Synergism between tumor necrosis factor and other defense systems. *Cancer Res.* 47: 115–118, 1987.
- Chapman P. B., Lester T. J., Casper E. S., Gabrilove J. L., Kempin S., Welt S., Sherwin S., Old L. J., Oettgen H. F.: Phase I study of recombinant tumor necrosis factor (r-TNF). *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 5: 231, 1986.
- Coley W. B.: Treatment of malignant tumors by repeated inoculation of erysipelas: With a report of ten original cases. *Am. J. Med. Sci.* 105: 487–511, 1893.
- Coley W. B.: Treatment of inoperable malignant tumors with the toxin of erysipelas and the *Bacillus prodigiosus*. *Trans. Am. Surg. Assoc.* 12: 183–212, 1894.
- Coley W. B.: The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxins (the mixed toxins of the *Streptococcus erysipelatis* and the *Bacillus prodigiosus*). *Proc. R. Soc. Med. Surg. Sec.* 3: 1–48, 1909.
- Collins T., Lapierre L. A., Fiers W., Strominger J. L., Pobel J. S.: Recombinant human tumor necrosis factor increases mRNA levels and surface expression of HLA-A, B antigens in vascular endothelial cells and

dermal fibroblasts in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 446–450, 1986.

21. Creasey A. A., Reynolds M. T., Laird W.: Cures and partial regression of murine and human tumors by recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Res.* 46: 5687–5690, 1986.

22. Darzynkiewicz Z., Williamson B., Carswell E. A., Old L. J.: Cell cycle-specific effects of tumor necrosis factor. *Cancer Res.* 44: 83–90, 1984.

23. Dayer J. M., Beutler B., Cerami A.: Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E-2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J. Exp. Med.* 16: 2163–2168, 1986.

24. Dinarello C. A., Cannon J. G., Wolff S. M., Bernheim H. A., Beutler B., Cerami A., Figari I. S., Palladino M. A., O'Connor J. V.: Recombinant tumor necrosis factor-alpha is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin-1. *J. Exp. Med.* 163: 1433–1450, 1986.

25. Feinman R., Henriksen-DeStefano D., Tsujimoto M., Vilcek J.: Tumor necrosis factor is an important of tumor cell killing by human monocytes. *J. Immunol.* 138: 635–640, 1987.

26. Fransen L., Muller R., Marmenout A., Tavernier J., Van der Heyden J., Kawashima E., Chollet A., Tizard R., Van Heuverswyn H., Van Vliet A., Ruyschaert M. R., Fiers W.: Molecular cloning of mouse tumor necrosis factor cDNA and its eukaryotic expression. *Nucleic Acids Res.* 13: 4417–4429, 1985.

27. Gray P. W., Aggarwal B. B., Benton C. V., Bringham T. S., Henzel W. J., Jarrett J. A., Leung D. W., Moffat B. Ng. P., Svedersky L. P., Palladino M. A., Nedwin G. E.: Cloning and expression of cDNA of human lymphotoxin, a lymphokine with tumor necrosis activity. *Nature* 312: 721–724, 1984.

28. Green S., Dobrjansky A., Carswell E. A., Kassel R. L., Old L. J., Fiore N., Schwartz M. K.: Partial purification of a serum factor that causes necrosis of the tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 381–385, 1976.

29. Haranaka K., Satomi N., Sakurai A.: Differences in tumor necrosis factor productive ability among rodents. *Br. J. Cancer* 50: 471–478, 1984.

30. Haranaka K., Satomi N., Sakurai A.: Antitumor activity of murine tumor necrosis factor (TNF) against transplanted murine tumors and heterotransplanted human tumors in nude mice. *Int. J. Cancer* 34: 263–267, 1984.

31. Haranaka K., Satomi N., Sakurai A., Nariuchi H.: Purification and partial amino acid sequence of rabbit tumor necrosis factor. *Int. J. Cancer* 36: 395–400, 1985.

32. Helson L., Green S., Carswell E. A., Old L. J.: Effect of tumor necrosis factor on cultured human melanoma cells. *Nature* 258: 731–732, 1975.

33. Hiserodt J. C., Granger G. A.: The human lymphotoxin system. *J. Reticuloendoth. Soc.* 24: 427–438, 1978.

34. Kashiwa H., Wright S. C., Bonavida B.: Regulation of B cell maturation and differentiation. I. Suppression of pokeweed mitogen-induced B cell differentiation by tumor necrosis factor (TNF). *J. Immunol.* 138: 1383–1390, 1987.

35. Khan A., Pardue A., Aleman C., Dickson J., Pichyankul S., Hill J. M., Hilario R., Hill N. O.: Phase I clinical trial with recombinant tumor necrosis factor. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 5: 226, 1986.

36. Leuderitz O., Galanos C., Lehman V., Nurminen M., Rietschel E. T., Rosenfelder G., Simon M., Westphal O.: Lipid A: Chemical structure and biological activity. *J. Infect. Dis.* 128: S259–S264, 1973.

37. Mano-Hirano Y., Sato N., Sawasaki Y., Haranaka K., Satomi N., Nariuchi H., Goto T.: Inhibition of tumor induced migration of bovine capillary endothelial cells by mouse and rabbit tumor necrosis factor. *JNCI* 78: 115–120, 1987.

38. Mannel D. N., Moore R. N., Mergenhagen S. E.: Macrophages as a source of tumoricidal activity (tumor necrotizing factor). *Infect. Immunol.* 30: 523–530, 1980.

39. Marmenout A., Fransen L., Travernier J., Van der Heyden J., Tizars R., Kawashima E., Shaw A., Johnson M. J., Semon D., Muller R., Ruyschaert M. R., Van Vliet A.: Molecular cloning and expression of human tumor necrosis factor and comparison with mouse tumor necrosis factor. *Eur. J. Biochem.* 152: 515–522, 1985.

40. Matthews N.: Tumor necrosis factor from the rabbit. II. Production by monocytes. *Br. J. Cancer* 38: 310–315, 1978.

41. Matthews N., Ryley H. C., Neale M. L.: Tumor necrosis factor from the rabbit. IV. Purification and chemical characterization. *Br. J. Cancer* 42: 416–422, 1980.

42. Ming W. J., Bersani L., Mantovani A.: Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* 138: 1469–1474, 1987.

43. Nawroth P. P., Stern D. M.: Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 163: 740–745, 1986.

44. Nedwig G. E., Naylor S. L., Sakaguchi A. Y., Smith D., Jarrett-Nedwin J., Pennica D., Goeddel D. V., Gray P. W.: Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: Structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res.* 13: 6361–6373, 1985.

45. Old L. J., Clarke D. A., Benacerraf B.: Effect of *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) infection on transplanted tumors in the mouse. *Nature* 184: 291–292, 1959.

46. Patek P. Q., Lin Y., Collins J. L.: Natural cytotoxic cells and tumor necrosis factor activate similar lytic mechanisms. *J. Immunol.* 138: 1641–1646, 1987.

47. Pennica D., Hayflick J. S., Palladino M. A., Goeddel D. V.: Cloning and expression in *E. coli* of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6060–6064, 1985.

48. Regenass U., Muller M., Curschellas E., Matter A.: Anti-tumor effects of tumor necrosis factor in combination with chemotherapeutic agents. *Int. J. Cancer* 39: 266–273, 1987.

49. Rosenau W.: Lymphotoxin: Properties, role and mode of action. *Int. J. Immunopharmacol.* 3: 1–8, 1981.

50. Rubin B. Y., Anderson S. L., Sullivan S. A., Williamson B. D., Carswell E. A., Old L. J.: Purification and characterization of a human tumor necrosis factor from the LuKII cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6637–6641, 1985.

51. Ruddle N. H., Powell M. B., Cota B. S.: Lymphotoxin, a biologically relevant model lymphokine. *Lymphokine Res.* 2: 23–31, 1983.

52. Sato N., Goto T., Haranaka K., Satomi N., Nariuchi H., Mano-Hirano Y., Sawasaki Y.: Action of tumor

- necrosis factor on cultured vascular endothelial cells: Morphologic modulation, growth inhibition, and cytotoxicity. *JNCI* 76: 1113–1121, 1986.
53. Scheurich P., Thoma B., Ucer U., Pfizenmeier K.: Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF): Induction of TNF receptors on human T cells and TNF mediated enhancement of T cell responses. *J. Immunol.* 138: 1786–1790, 1987.
54. Shalaby M. R., Aggarwal B. B., Rinderknecht E., Svedersky L. P., Finkle B. S., Palladino M. A.: Activation of human polymorphonuclear neutrophil formations by interferon- and tumor necrosis factors. *J. Immunol.* 135: 2069–2073, 1985.
55. Shear M. J., Turner F. C., Perrault A., Shovelton T.: Chemical treatment of tumors. V. Isolation of the hemorrhage-producing fraction from *Serratia marcescens* (*Bacillus prodigiosus*) culture filtrate. *JNCI* 4: 81–97, 1943.
56. Shirai T., Yamaguchi H., Ito H., Todd C. W., Wallace R. B.: Cloning and expression of the gene for human tumor necrosis factor. *Nature* 31: 803–806, 1985.
57. Sugarman B. J., Aggarwal B. B., Hass P. E., Figari I. S., Palladino M. A., Shepard H. M.: Recombinant human tumor necrosis factor alpha: Effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 230: 943–945, 1985.
58. Tsujimoto M., Yip Y. K., Vilcek J.: Tumor necrosis factor: Specific binding and internalization in sensitive and resistant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7626–7630, 1985.
59. Urban J. L., Shepard H. M., Rothstein J. L., Sugarman B. J., Schrelber H.: Tumor necrosis factor: A potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5233–5237, 1986.
60. Vilcek J., Palombella V. J., Henriksen-de Stefano D., Swenson C., Feinman R., Hirai M., Tsujimoto M.: Fibroblast enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *J. Exp. Med.* 163: 632–643, 1986.
61. Wang A. M., Craesy A. A., Ladner M. B., Lin L. S., Stricker J., Van Arsdell J. N., Yamamoto R., Mark D. F.: Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor. *Science* 228: 149–154, 1985.
62. Williamson B. D., Carswell E. A., Rubin B. Y., Pendergast J. S., Old L. J.: Human tumor necrosis factor produced by human B-cell lines: Synergistic cytotoxic interaction with human interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 5397–5401, 1983.
63. Yamamoto A., Williamson B. D., Carswell E. A., Fiore N., Old L. J.: In Homma J. Y., Kanegasaki S., Luederitz O., Shiba T., Westphal O. (eds): *Bacterial endotoxin-Chemical, Biological and clinical aspects.* pp223–234, Basel, Verlag Chemie, 1984.
64. Zbar B., Bernstein I. D., Rapp H. J.: Suppression of tumor growth at the site of infection with living *Bacillus Calmette Guerin*. *JNCI* 46: 831–839, 1971.

Naslov avtorja: mag. Gregor Serša, Onkološki inštitut, Zaloška c.2, 61000 Ljubljana, Jugoslavija.