

На правах рукописи

Аглиуллина Диляра Галимовна

7 5 0 1

29 АПР 1996

**РНК, СЕКРЕТИРУЕМАЯ ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ
И ЕЕ БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ**

03.00.04 - биохимия

А в т о р е ф е р а т

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва - 1996

Работа выполнена в лаборатории биохимии нуклеиновых кислот
Казанского государственного университета

Научный консультант - доктор биологических наук,
профессор Винтер В.Г.

Официальные оппоненты - доктор медицинских наук,
профессор Тогузов Р.Т.

доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
Потапова Г.И.

доктор биологических наук,
профессор Горбачева Л.Б.

Ведущая организация - Московская медицинская
академия им. акад. И.М.Сеченова

Защита состоится "24" мая 1996 г. в 14⁰⁰ час.
на заседании специализированного совета Д 053.22.02 при
Российском Университете дружбы народов по адресу: 117198, Москва
ул.Миклухо-Маклая, д.8, медицинский факультет

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке
Российского Университета дружбы народов по адресу: 117198,
Москва, ул.Миклухо-Маклая, д.6

Автореферат разослан "17" апреля 1996 г.

Ученый секретарь специализированного совета
доктор медицинских наук, профессор

В.Э.Торбек

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Развитие исследований в области молекулярной биологии злокачественного роста привело к накоплению большого количества экспериментальных данных, позволяющих сделать определенные выводы о роли отдельных макромолекул, образующихся в клетках при транскрипции онкогенов и протоонкогенов в опухолевой трансформации клеток (Bishop, 1991, Dasan et al., 1993, Steel, 1994) В результате появилось новое направление исследований в области онкологии - молекулярная онкология. Перспективность данного научного направления определяется тем, что изучение отдельных макромолекул - белков, нуклеиновых кислот может способствовать созданию новых методов молекулярной диагностики и геномной терапии рака (Felgner, Rhodes, 1991, Wainer, Cance, 1994).

В настоящее время ни у кого не вызывает сомнения, что клетки многоклеточного организма постоянно обмениваются информацией, и этот процесс реализуется посредством обмена макромолекулами через внеклеточный матрикс.

Можно считать установленным, что, кроме известной ранее роли, внеклеточный матрикс, взаимодействуя с рецепторами клеток типа интегринов, активно влияет на работу генома (Любимов, 1989) участвует в росте и дифференцировке клеток (Schlitter, 1991; Scott-Burden, 1994). В связи с этим внеклеточный матрикс рассматривается как одна из информационных систем целостного организма (Канторова, 1994).

Решение же вопроса о том, какие из компонентов внеклеточного матрикса выполняют роль носителей информационных сигналов, и каковы молекулярные механизмы его воздействия на функционирование генома - ещё находится на стадии накопления фактов.

В 40-е годы Браше с сотрудниками в составе внеклеточного матрикса на гистологических срезах тканей эмбрионов крыс обнаружил РНК (Bruchet, 1940). Позже РНК была выделена биохимическими методами из внеклеточного матрикса эмбрионов крыс (Curtis, 1957). Slavkin сообщил о появлении низкомолекулярной РНК в межклеточном пространстве при дифференциации ткани зачатков зубов у эмбрионов крыс (Slavkin, 1970).

Эти ранние исследования о внеклеточных РНК приобретают особый интерес в свете данных о способности различных типов клеток, в том числе опухолевых, секретировать РНК в окружающую среду (Винтер, 1968, Kolodny et al., 1972, Kandjan, Turian, 1976, Stroun et al., 1978, Sanchez et al., 1983).

Широта таксономического реестра организмов, клетки которых в интактном состоянии выделяют РНК - от бактерий и грибов до высших эукариот - свидетельствует о том, что этот феномен носит общебиологический характер, что позволило Dickson и Robertson высказать предположение об участии РНК в межклеточном переносе информации (Dickson, Robertson, 1979), которое нашло экспериментальное подтверждение в работах Jachertz, где была показана возможность передачи информации от клетки к клетке посредством РНК при формировании иммунного ответа (Jachertz, 1979).

Обнаружение генотипических эффектов, вызываемых экзогенными РНК (Смирнов и др., 1993, Николин и др., 1994), в особенности, антисмысловыми РНК, со всей определённой ставит вопрос о возможности участия внеклеточных РНК в функционировании второй системы регуляции экспрессии генов, в которой регуляторными факторами являются не белок, а малые РНК-транскрипты с коротких диспергированных повторов. Существование такой системы регуляции генов у эукариот находит все большее подтверждение в экспериментальных данных, полученных в последние годы (Lee et al., 1993, Конс-

тантинова и др.,1995). Сходные малые РНК обнаружены и в составе внеклеточных РНК частиц (Архипова и др.,1987, Семин, Ильин, 1994).

Роль внеклеточной РНК, выделяемой опухолевыми клетками, во взаимоотношениях опухоли и организма совершенно неясна, как неизвестна и её судьба после выхода из опухолевых клеток. Совершенно очевидно, что, если РНК, выделяемая опухолевыми клетками, выполняет какие-то функции, то она должна какое-то время сохраняться после выхода из клетки, что в свою очередь, зависит от скорости её синтеза и времени жизни до распада. Остается также неясным, каким образом РНК, выделяемая опухолевыми клетками, сохраняется в присутствии высокоактивной РНКазы асцитной жидкости?

И, наконец, может ли РНК, выделяемая опухолевыми клетками, попадать в кровоток и, какова реакция иммунной системы организма на появление внеклеточной РНК?

Целью настоящей работы было исследование РНК, выделяемой опухолевыми клетками и ее биологической активности.

Были поставлены следующие задачи:

1. Изучение кинетики синтеза РНК, секретируемой клетками асцитной опухоли Эрлиха в условиях *in vivo* и при культивировании опухолевых клеток *in vitro*.

2. Выделение и очистка РНК из бесклеточной асцитной жидкости опухоли Эрлиха. Характеристика её физико-химических свойств и фракционного состава.

3. Исследование влияния РНК, секретируемой опухолевыми клетками, на прививаемость и рост опухолевых клеток и её воздействия на функциональную активность клеток иммунной системы.

4. Исследование содержания РНК и аутоантител к РНК в сыворотке крови у здоровых лиц и онкологических больных.

Научная новизна. Данная работа является по существу первым комплексным исследованием РНК, секретируемой опухолевыми клетками, в которой обосновано новое направление исследований внеклеточных РНК, секретируемых интактными клетками, как биологически активных веществ *плейотропного* действия.

Установлено, что секреция РНК интактными клетками опухоли Эрлиха регулируется гомеостатическим механизмом по типу обратной связи.

Разработаны методы выделения и фракционирования РНК из биологических жидкостей (асцит, сыворотка крови) с низким содержанием РНК (менее 10 мкг/мл).

Дана характеристика фракционного состава РНК, секретируемой опухолевыми клетками. Установлено, что она состоит из фракций 5-12S, показано, что низкомолекулярные фракции, содержащиеся в составе внеклеточной РНК не являются результатом деградации ее высокомолекулярных фракций.

Выявлено, что РНК, выделяемая опухолевыми клетками обладает биологической активностью: она стимулирует прививаемость и рост гомологичной опухоли. Сделано предположение, что стимулирующее действие РНК опосредовано ее воздействием на иммунную систему организма опухоленосителя.

Установлено, что РНК, выделяемая опухолевыми клетками, обладает иммуномодулирующей активностью: она ингибирует регуляторную функцию макрофагов в отношении делящихся лимфоцитов и стимулирует реакцию бласттрансформации лимфоцитов.

Дана характеристика уровня содержания аутоантител к РНК в сыворотке крови практически здоровых людей разных возрастных групп, что позволило определить пороговое значение данного показателя у здоровых людей.

В результате сравнительного анализа содержания РНК и аутоантител к РНК в сыворотке крови здоровых людей и онкологических больных получены данные, свидетельствующие о возможности участия РНК, выделяемой опухолевыми клетками, в возникновении аутоиммунных симптомов у онкологических больных.

Практическая значимость. Результаты исследования иммуномодулирующего действия РНК, выделяемой опухолевыми клетками на функциональную активность макрофагов и лимфоцитов позволяют уточнить механизмы действия препаратов низкомолекулярных РНК и полирибонуклеотидов, применяемых в клинической практике для иммунокоррекции при злокачественных заболеваниях.

Данные о повышенном уровне содержания аутоантител к РНК в сыворотке крови онкологических больных и результаты по характеристике пороговых значений данного показателя для здоровых людей различных возрастных групп являются рациональной основой для разработки метода отбора групп риска с повышенной вероятностью наличия опухоли при массовых обследованиях населения.

Основные положения диссертации, которые выносятся на защиту:

1. Жизнеспособные клетки асцитной опухоли Эрлиха секретируют РНК, и этот процесс регулируется гомеостатическим механизмом по типу обратной связи.

2. РНК, выделяемая опухолевыми клетками, гетерогенна по фракционному составу, фракции РНК отличаются по метаболической активности.

3. РНК, секретируемая клетками асцитной опухоли Эрлиха, стимулирует прививаемость и рост гомологичной опухоли.

4. Внеклеточная РНК опухолевых клеток обладает иммуномодулирующей активностью.

5. РНК, секретируемая опухолевыми клетками, будучи биологически активным веществом плейотропного действия, является одним из основных факторов воздействия опухоли на организм.

Апробация работы. Результаты исследования были представлены в докладах на Итоговых научных конференциях Казанского государственного университета за 1985-1995 гг., IV Всесоюзном биохимическом съезде (Ленинград, 1979), Всесоюзном совещании "Нуклеазы" (Казань, 1981), XV конференции ФЕБО, (Бельгия, 1983), на научном семинаре по проблемам онкологии в Московском государственном университете (Москва, 1983), Всесоюзном съезде онкологов (Ленинград, 1985), Всесоюзном совещании "Внеклеточные нуклеиновые кислоты культуры культуральных сред и биологических жидкостей" (Москва, 1987), Всесоюзной конференции "Актуальные вопросы клеточной биологии" (Ленинград, 1989), XVI Европейском конгрессе по аллергологии и клинической иммунологии " (Мадрид, 1995), XVIII конференции ФЕБО (Базель, 1995), Евроазиатском симпозиуме по современным направлениям биотехнологии (Анкара, 1995).

Диссертационная работа апробирована 26 февраля 1996 года на расширенном заседании кафедры биохимии и лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Казанского университета.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры биохимии Казанского университета, кафедры терапии Казанской государственной медицинской академии.

Публикации. Материалы диссертации отражены в 24 научных работах, опубликованных в центральных и международных изданиях.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 261 странице машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, из 7 глав результатов собственных исследований, обсуждения полученных данных, выводов. Текст иллюстрирован 43 рисунками и 19 таблицами. Список исполь-

зованной литературы содержит 387 наименований, из которых 157 отечественных и 230 иностранных работ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные и штамм опухолей. В качестве перевивной опухолевой линии использован тетраплоидный штамм асцитной опухоли Эрлиха, полученный из Отдела клеточных культур Всесоюзного Онкологического Научного Центра (ВОНЦ), (г. Москва). В работе использовано 600 беспородных белых крыс весом 120 - 150г и около 15000 белых беспородных мышей весом 18 - 20г из питомников "Крюково" и "Столбовая" Московской области.

Онкологические больные. Анализировали сыворотку крови 258 больных, пациентов республиканского онкологического диспансера и 34 больных лейкозом из гематологического отделения 5-горбольницы г.Казани, сыворотки крови 32 доноров из республиканского центра переливания крови и 195 практически здоровых лиц, проходящих медицинское обследование в клиниках г. Казани

Выделение и очистка РНК из асцитной жидкости и плазмы крови. Асцитную жидкость собирали шприцом из брюшной полости мышей на 7-е сутки после перевивания опухоли. Опухолевые клетки удаляли центрифугированием. РНК из бесклеточной асцитной жидкости выделяли фенольно-детергентным методом по Кирби с некоторыми модификациями (Roberts, 1965).

Количество РНК определяли с орцином, флуоресцентным методом с бромистым этидием (Le Pecq, Paoletti, 1968) и спектрофотометрическим методом.

Для очистки и фракционирования РНК применяли хроматографию на колонках с целитом (Merk, ФРГ) и оксиапатитом, синтезированным нами по модифицированному методу Тизелиуса, электрофорез на агарозном и полиакриламидном гелях, ультрацентрифугирование в градиенте плотности сульфата цезия.

Аналитический электрофорез РНК в градиенте концентрации полиакриламидного геля проводили в пластинках размером 140x72,5x2,5 мм в камере для вертикального электрофореза (Pharmacia, Швеция). Градиентный гель получали смешиванием через смеситель равных объемов реакционных смесей, приготовленных для получения 2,5% и 10% полиакриламидного геля. Электродный буфер: 30мМ трис, 30мМ NaH_2PO_4 , 2мМ ЭДТА. Электрофорез проводили при силе тока 70мА на пластинку в течении 2,5ч. Гели фиксировали в 1М уксусной кислоте и окрашивали в 0,2%-ном растворе метиленового синего на 0,4М ацетатном буфере 2ч. Краску с фона отмывали 1М уксусной кислотой. Электрофореграммы снимали на денситометре ИФО-490. Иногда гели помещали для сжатия в смесь, содержащую 50% метанола и 1М уксусную кислоту (Гааль и др., 1982), высушивали в специальной вакуумной камере для сушки гелей (Pharmacia, Швеция) и фотографировали.

Вторичную структуру РНК, секретируемой опухолевыми клетками, исследовали по изменению флуоресценции бромида этидия при взаимодействии с РНК при различных условиях ее ренатурации.

Кинетику плавления асцитной РНК исследовали с использованием смонтированной нами системы приборов, состоящей из спектрофотометра СФ-4А, снабженного термостатированной камерой, в которую помещали кварцевую кювету с исследуемым образцом РНК. Термостатированную камеру соединяли с системой реостатов, что позволяло повышать температуру в камере от 20 до 80°C со скоростью 0,5° в минуту. Изменение оптического поглощения при длине волны 260нм по мере плавления РНК фиксировали при помощи самописца, который присоединяли к оптической системе спектрофотометра.

Исследование кинетики синтеза РНК, выделяемой опухолевыми клетками в асцитную жидкость in vivo. На шестые сутки развития опухоли мышам вводили внутривенно ^3H -урацил с из расчета

74000Бк на грамм веса животных. Через определенные интервалы времени отбирали асцит шприцом и в бесклеточной асцитной жидкости определяли количество РНК методом Шмидта и Тангаузера (Smidt, Thanhauser, 1945), радиоактивность РНК просчитывали на сцинтиляционном счетчике Mark II (Nuclear Chicago, США).

Жизнеспособность клеток определяли методом окрашивания нейтральным красным по методу, разработанному для клеток опухоли Эрлиха Вольфсоном с сотрудниками (Вольфсон и др., 1958), по окрашиванию 0.1%-ным раствором трипанового синего (Адамс, 1983). О гибели клеток при культивировании опухолевых клеток *in vitro* судили по появлению в культуральной среде внутриклеточного фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ), (Cook, Mitchell, 1989).

Исследование секреции РНК при инкубации опухолевых клеток *in vitro*. Предварительно меченые ^{14}C -уридином опухолевые клетки переносили в среду без метки. Через определенные промежутки времени отбирали по 3-5мл пробы, после удаления из них клеток фильтрованием РНК из пробы осаждали равным объемом 15% раствора ТХУ, на фильтрах из стекловолокна GF/C. и просчитывали радиоактивность.

Индивидуальное облучение мышей проводили на установке с источником облучения ^{60}Co поместив их по одной в деревянные станки-ячейки. Доза облучения, рассчитанная по времени, площади поля и расстояния, составляла 500 рентген.

При постановке реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) использован микрометод (Wasik et al., 1987) с культивированием лимфоцитов в 96 луночных микропланшетах (Linbro, США) в CO_2 - инкубаторе (Labomed, ФРГ). Лимфоциты выделяли из селезенки мышей и очищали наплавлением на раствор фиколл-верографина с плотностью 1,077г/мл (Бейум, 1980). Растворы РНК стерилизовали фильтрованием через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22мкм (Sartorius, ФРГ). Для определения включения ^3H -тимидина в ДНК

лимфоцитов содержимое лунок переносили на фильтры из стекловолокна с помощью 12 канального собирателя фракций "Harvester" (Flow, Англия), фильтры промывали 5%ТХУ и просчитывали радиоактивность. Результаты выражали в индексах стимуляции, которые определяются как отношение радиоактивности опытных проб к контрольным, где вместо РНК в лунки добавляли физраствор.

Монослойную культуру перитонияльных макрофагов получали путем посева стерильного смыва брюшной полости мышей в лунки 24 луночных планшетов (Linbro, США) с последующей отмывкой неприлипающих клеток.

Цитостатичность макрофагов определяли по их способности ингибировать включение ^3H -тимидина в ДНК опухолевых клеток и лимфоцитов при совместном культивировании.

Аутоантитела к РНК определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) на 96 луночных планшетах (НПО Полимед, г.Санкт-Петербург). В качестве антигена использована РНК из печени кролика (СКТБ БАВ г.Новосибирск). Для выявления аутоантител использовали меченые пероксидазой диагностические антитела против иммуноглобулинов человека (Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, г.Москва). Оптическую плотность (ОП) реакционной смеси измеряли на приборе "Мультикан" (Flow, Англия) при длине волны 492 нм. Результаты выражали в относительных единицах (отн.ед.) как отношение ОП исследуемой сыворотки к ОП стандартной сыворотки.

В работе использованы панкреатическая РНКазы (Serva, ФРГ), панкреатическая ДНКазы (Calbiochem, Англия), лизоцим (Serva, ФРГ).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При развитии ряда перевивных форм опухолей у экспериментальных животных накапливается асцитная жидкость в брюшной полости. В предварительных исследованиях нами было установлено,

что в асцитной жидкости таких перевивных форм опухолей, как саркома 37, гепатома Зайделя, асцитная карцинома Эрлиха обнаруживается РНК. При развитии асцитной опухоли Эрлиха у мышей показало, что максимальный уровень РНК в асците наблюдается на 6-7 день после перевивки и совпадает с периодом интенсивного роста и деления опухолевых клеток. На 8-9-е дни после перевивки опухоли, когда наступает фаза замедления роста опухолевых клеток, содержание РНК в асцитной жидкости уменьшается. Эти наблюдения дали основание предположить, что появление РНК в асцитной жидкости в первый период роста опухоли Эрлиха может быть обусловлено выходом РНК из жизнеспособных клеток, а не гибелью и распадом клеток.

Данное предположение подтверждается результатами исследования изменения содержания РНК в асцитной жидкости при гетеротрансплантации опухоли Эрлиха мышам крысам. Эта модель характеризуется тем, что в первые 3-4 дня после введения опухоли крысам наблюдается интенсивное деление опухолевых клеток, на 4-5 дни рост опухоли у крыс останавливается и наступает массовая гибель опухолевых клеток, асцит рассасывается и крысы выздоравливают. Модель удобна тем, что позволяет исследовать стадии развития опухоли и ее регрессии за короткий срок. В этих экспериментах наибольший уровень содержания РНК в асцитной жидкости наблюдался в период активного роста опухоли. С наступлением массовой гибели опухолевых клеток количество РНК в асцитной жидкости крыс снижалось, а количество ДНК возрастало. Следовательно, высокое содержание РНК в асцитной жидкости при развитии опухоли Эрлиха у крыс также не может быть объяснено гибелью и распадом опухолевых клеток, а связано с жизнедеятельностью интактных опухолевых клеток.

Принимая во внимание потенциальные возможности РНК участвовать в межклеточном переносе информации, мы

предположили, что РНК, выделяемая опухолевыми клетками, может играть существенную роль в межклеточных взаимодействиях при развитии опухоли.

Изучение биологической роли РНК, выделяемой опухолевыми клетками, невозможно без характеристики свойств этой РНК, исследования ее фракционного состава, особенностей структуры, кинетики синтеза и секреции ее опухолевыми клетками.

Для выделения РНК в бесклеточную асцитную жидкость добавляли 3М раствор Na-ацетатного буфера pH 5,3 до конечной концентрации 0,1М, 0,5% додецилсульфата натрия и 0,1М раствор ЭДТА до конечной концентрации 0,005М. К суспензии добавляли равный объем свежеперегнанного водонасыщенного фенола и встряхивали в течении 45мин при комнатной температуре, добавив в середине срока хлороформ из расчета 5мл на 100мл смеси. Водную фазу отделяли центрифугированием и депротеинизировали ее еще два раза с половинным объемом фенола. К последней водной фазе добавляли половинный объем смеси хлороформа и изоамилового спирта (1:9), встряхивали вновь отделяли водную фазу. Остатки фенола из водной фазы экстрагировали эфиром. РНК из водного слоя осаждали двумя объемами этанола, подкисленного уксусной кислотой до pH 4.5 и охлажденного до -20°C . Смесь оставляли на ночь при -20°C для формирования осадка. Осадок промывали спиртом, растворяли в дистиллированной воде, иногда диализовали и лиофилизировали. Растворив аликвоту препарата в 0,01М трис-HCl буфере pH 7,5, определяли в нем количество белка по Лоури, ДНК по Бартону, РНК - по Мейбауму. Используя этот метод, нам удавалось получать 0,8-1,0 мг РНК из 100 мл асцитной жидкости.

Характерной особенностью РНК, выделенной из асцитной жидкости, является наличие в ней двуспиральных участков. Степень спирализованности РНК асцитной жидкости определяли, принимая флуо-

ресценцию бромида этидия при взаимодействии с двухцепочечным синтетическим полинуклеотидом поли-(АУ) за 100% и, сравнивая ее с флуоресценцией красителя при взаимодействии с РНК асцитной жидкости (табл.1). Судя по изменению интенсивности флуоресценции бромистого этидия при взаимодействии с асцитной РНК, последняя на 60% состоит из спирализованных участков.

Таблица 1.

Изменение флуоресценции бромида этидия при взаимодействии с РНК асцитной жидкости и поли-(АУ).

Отношение N/D	Интенсивность флуоресценции (отн.ед.)		Отношение флуоресценции РНК /поли-АУ (в %)
	поли-АУ	РНК	
0,178	40	24	60
0,357	50	33	66
0,714	94	54	62

N/D - молярное отношение нуклеиновых кислот к бромиду этидия.

Результаты исследования взаимодействия бромида этидия с РНК при различных условиях денатурации и ренатурации РНК (табл.2) свидетельствуют о том, двуспиральные участки в асцитной РНК образуются в результате внутримолекулярных взаимодействий как у тРНК. В отличие от тРНК при ренатурации асцитной РНК не достигается полного восстановления двуспиральных структур. Это может быть связано с наличием длинных вставок между комплементарными участками по длине полинуклеотидной цепи, а также наличием в асцитной РНК шпилек, отличающихся по размеру от шпилек в тРНК.

Таблица 2.

Изменение флуоресценции комплекса РНК с бромидом этидия
в зависимости от условий ренатурации РНК.

Исследуемые РНК	РНК ренатурирована в 0,3 М NaCl, (отн. ед)		РНК ренатурирована в 0,001 М трис-НСl, (отн. ед)	
	контроль	опыт	контроль	опыт
тРНК	39	42	41	42
РНК асцитной жидкости	49	51	77	45
поли-АУ	80	70	162	66

Аналитический электрофорез в градиенте концентрации полиакриламидного геля 2,5 - 10% показал, что основная часть асцитной РНК представлена низкомолекулярными фракциями с молекулярным весом 5-7S, фракции 9-12S составляют не более 20%. Обработка препарата РНКазой при низкой ионной силе приводит к исчезновению всех полос на электрофореграмме и к снижению интенсивности диффузной полосы в области 5-7S. Она претерпевает некоторые изменения и при обработке ДНКазой. При этом вместо широкой диффузной полосы проявляются четко обозначенные фракции, которые полностью элиминируются при последующей обработке препарата РНКазой (рис.1). Эти данные свидетельствуют о том, что в составе фракции, выявляемой в виде диффузной полосы в области 5 - 7S, наряду с РНК, содержится некоторое количество ДНК.

Кинетику синтеза РНК, выделяемой клетками опухоли Эрлиха, исследовали по включению в РНК меченого предшественника ^3H -урацила. Меченая РНК появляется в асцитной жидкости уже в первые полчаса после инъекции мышам ^3H -урацила, уровень удельной

радиоактивности асцитной РНК достигает максимума на 6-ой час инкубации (рис.2). Это свидетельствует о метаболической гетерогенности фракций асцитной РНК и о присутствии в нем, наряду с быстро-меняющимися фракциями, медленно обменивающихся фракций, которые сохраняются в асцитной жидкости в течение нескольких часов.

Рис.1 Электрофорез РНК асцитной жидкости опухоли Эрлиха (АОЭ) в градиенте концентрации полиакриламидного геля 2,5- 10,0%.

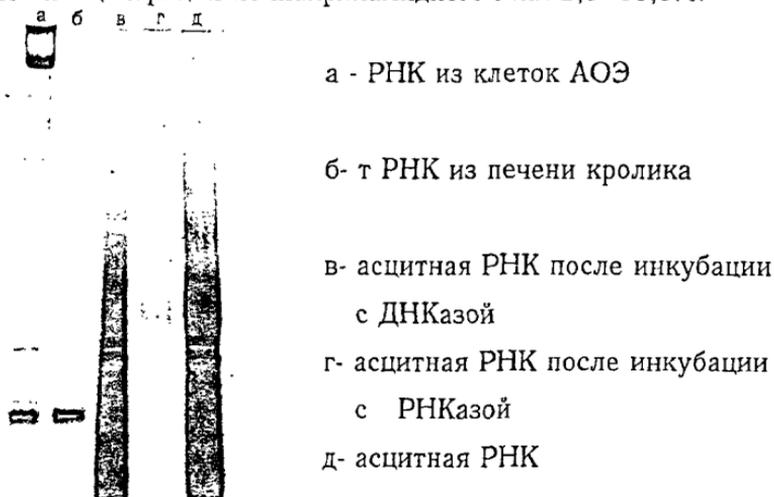
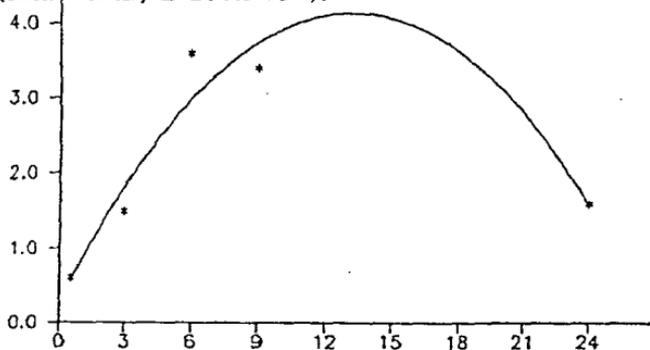


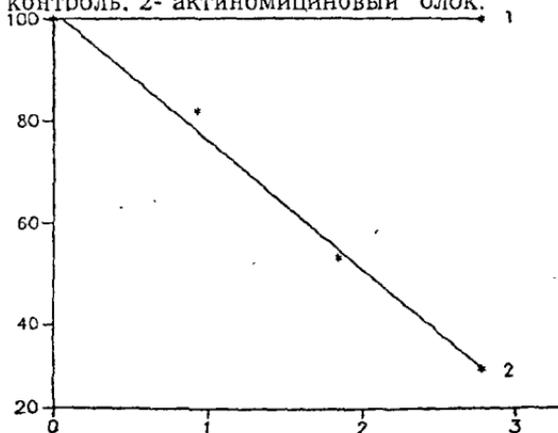
Рис.2 Включение ^3H - урацила в РНК асцитной жидкости опухоли Эрлиха (in vivo). По горизонтали - время после инъекции ^3H - урацила (часы), по вертикали - удельная радиоактивность РНК асцитной жидкости (имп/ мин/Е 260x 10⁻⁶).



Об этом свидетельствует также картина динамики распада вновь синтезированной асцитной РНК, полученной в экспериментах с блокированием синтеза РНК актиномицином D. Актиномицин D

вводили мышам через 5 часов после инъекции ^3H -урацила. О времени распада асцитной РНК судили по убыли радиоактивной метки в асцитной РНК через определенные интервалы времени после блока синтеза РНК актиномицином D. Как видно из рис.3, в условиях остановки дальнейшего синтеза РНК удельная радиоактивность асцитной РНК в течение двух часов снижается почти на 50%. Это означает, что основную часть РНК, выделяемой опухолевыми клетками в асцитную жидкость, составляют фракции, период полужизни которых около 2-х часов.

Рис.3. Кинетика синтеза РНК, выделяемой клетками опухоли Эрлиха, в условиях актиномицинового блока (*in vivo*). По горизонтали - время после инъекции мышам актиномицина Д (часы), по вертикали - удельная радиоактивность РНК после блокирования ее синтеза (в % от контроля). 1 - контроль. 2 - актиномициновый блок.



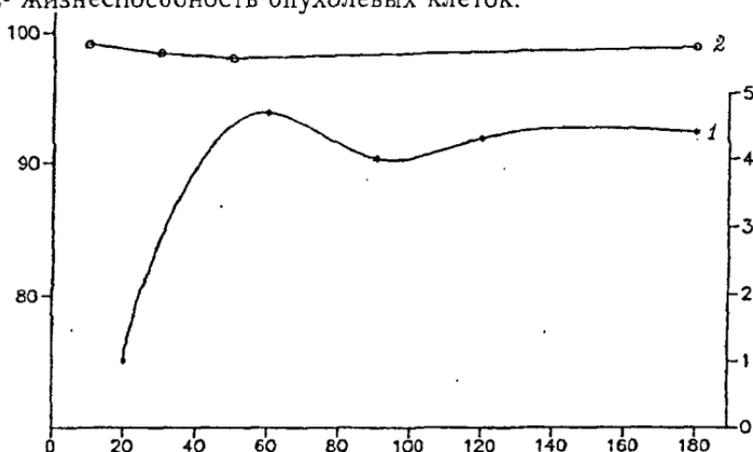
Анализ фракций асцитной РНК по кинетике включения в них ^{14}C -уридина показал, что фракции асцитной РНК отличаются по скорости синтеза. ^{14}C -уридин в первые часы после инъекции мышам, обнаруживается в составе низкомолекулярных фракций асцитной РНК. В последующие часы метка появляется и во фракциях 9-12S, т.е. низкомолекулярные фракции асцитной РНК являются наиболее быстросинтезирующимися и относительно стабильными.

Секрецию РНК из опухолевых клеток в опытах *in vitro* исследовали

по выходу меченой радиоактивным изотопом РНК из опухолевых клеток, предварительно инкубированных в среде ^{14}C - уридином.

Уже в первые 20 мин инкубации предварительно меченых ^{14}C - уридином клеток опухоли Эрлиха в культуральной среде обнаруживается меченая ^{14}C РНК. При этом жизнеспособность клеток сохраняется на высоком уровне (рис.4). Увеличение содержания ^{14}C РНК в культуральной среде происходит до определенного уровня и стабилизируется в виде плато. При дальнейшей инкубации клеток, количество меченой РНК в среде остается на постоянном уровне. Обнаружение плато в динамике выхода РНК из жизнеспособных опухолевых клеток косвенно указывает на возможность регуляции секреции внеклеточной РНК уровнем содержания этой РНК в среде.

Рис.4. Секреция РНК при инкубации клеток опухоли Эрлиха (in vitro) По горизонтали- время инкубации (мин.), по вертикали: справа- радиоактивность РНК в культуральной жидкости (имп/мин $\times 10^{-6}$), слева - жизнеспособность клеток (%). 1- накопление радиоактивной РНК в среде, 2- жизнеспособность опухолевых клеток.



Нами обнаружено, что радиоактивность РНК, секретируемой предварительно мечеными опухолевыми клетками, при инкубации их в культуральной среде с добавлением асцитной РНК (5мкг/мл) значительно ниже (1110 ± 97 имп/мин), чем в контрольной, без добавления РНК (2730 ± 110 имп/мин). Снижение секреции РНК из

опухолевых клеток при инкубировании их в среде с добавлением РНК свидетельствует о наличии обратной связи между выходом РНК из опухолевых клеток и ее концентрацией в среде.

Обнаружение гомеостатического механизма регуляции выделения РНК жизнеспособными опухолевыми клетками является весьма существенным для понимания биологического значения секреции внеклеточных нуклеиновых кислот, т.к. наличие ауторегуляции свидетельствует о тесной взаимосвязи выделения нуклеиновых кислот с физиологическим состоянием клеток.

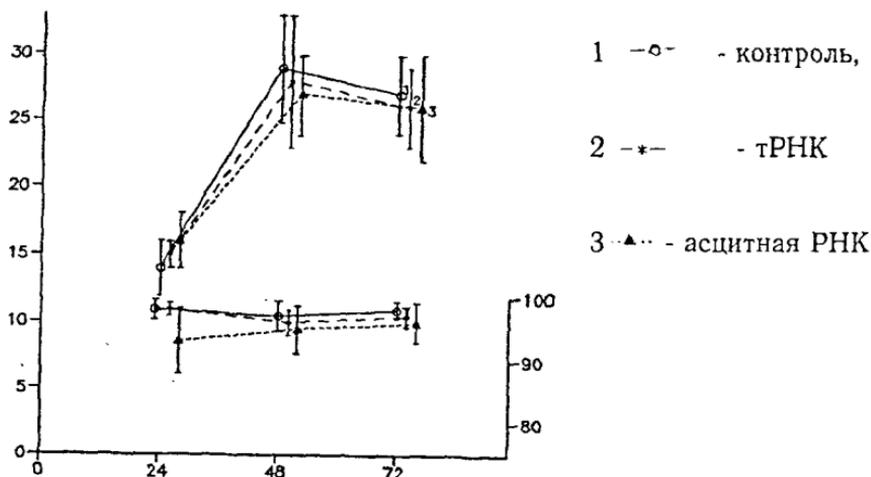
Нами исследовано влияние на прививаемость и рост опухоли, наряду с асцитной РНК, следующих препаратов РНК: суммарной РНК из печени крупного рогатого скота, тРНК, выделенной из печени кролика (СКТБ БАВ, Новосибирск), синтетических полирибонуклеотидов поли-А, поли-У (Calbiochem, США). В этих экспериментах схема прививки опухоли нами была выбрана, исходя из того, что существует минимальный порог количества опухолевых клеток, которое необходимо вводить животным, чтобы у них развивалась опухоль (Васильев, 1950). Для асцитной опухоли Эрлиха это число составляет 40-50 тысяч клеток на мышь. При введении мышам 25 тыс. клеток опухоль прививается у 50-60% животных. В группе мышей, которым вместе с опухолевыми клетками вводили асцитную РНК (10 мкг/мл на г веса животных) прививаемость опухоли составляла 100%. Другие виды РНК не оказывали такого эффекта (Табл. 3).

Стимулирующее действие асцитной РНК на рост опухоли может осуществляться двумя путями: либо ее непосредственным аутоимулирующим действием на опухолевые клетки, либо ее влиянием на иммунную систему организма.

Возможность непосредственного действия асцитной РНК на рост опухолевых клеток по типу аутокринных ростовых веществ, выделяемых опухолевыми клетками исследовали в опытах *in vitro*. Интенсив-

ность синтеза ДНК и деления опухолевых клеток в среде с добавлением асцитной РНК не отличалась от контрольных проб, где опухолевые клетки инкубировали без добавления в среду РНК.(Рис.5)

Рис.5 Влияние асцитной РНК на синтез ДНК в клетках опухоли Эрлиха (in vitro). По горизонтали-время инкубации (часы), по вертикали:справа- жизнеспособность клеток(%), слева- включение ^3H -тимидина в ДНК (имп/мин $\times 10^{-4}$)



Это означает, что РНК, выделяемая опухолевыми клетками, не обладает аутостимулирующим действием на опухолевые клетки.

Исследование влияния асцитной РНК на прививаемость и рост опухоли у мышей, получивших сублетальную дозу γ -облучения(табл.4) показало, что у интактных животных при добавлении асцитной РНК к инокуляту наблюдается заметное повышение прививаемости опухоли, в то время как у облученных мышей РНК не оказывает стимулирующего действия на прививаемость опухоли. Отсутствие эффекта асцитной РНК на прививаемость опухоли у мышей с лучевым поражением иммунной системы говорит о том, что влияние РНК может быть опосредовано через ее воздействие на иммунную систему организма.

Ввиду чрезвычайно сложной системы регуляции иммунных процессов в целостном организме, влияние асцитной РНК на иммунную

Таблица 3.

Влияние препаратов РНК на прививаемость и рост опухоли Эрлиха.

№ п/п	Условия опыта	Вес животных (г)			Вес асцита (г)	Привива- емость (%)
		до опыта	с опухолью	после удаления опухоли		
1.	Контроль	27,68±0,97	39,80±4,04	22,65±0,83	17,16±2,88	66
2.	Суммарная РНК печени крупного рогатого скота	0,37±29,32	41,05±3,44	28,60±1,46	14,70±3,62	62
3.	тРНК печени кролика	28,06±0,52	44,17±3,88	27,91±1,70	16,20±5,65	44
4.	ПолиА	29,17±0,13	40,07±1,16	24,72±1,06	15,30±4,60	55
5.	ПолиУ	28,61±0,86	42,13±1,90	26,28±0,99	16,87±2,67	85
6.	РНК асцитной жидкости опухоли Эрлиха	27,00±0,71	49,52±2,92	25,24±1,75	25,51±2,28	100
	Р	н	0,05	н	0,05	0,05

Примечание: Р - уровень значимости различия контроля и опыта, н - различие недостоверно.

Таблица 4.

Действие асцитной РНК на прививаемость и рост опухоли
у облученных мышей.

Развитие опухоли	Необлученные		Облученные	
	Контроль	+РНК	Контроль	+ РНК
Прив. Опухоли (%)	20	33	40	36
Объем асцита на мышь (мл)	9,14±1,07	12,34±1,41	10,33±0,93	7,79±2,87
Кол-во опух. кл. В асците (млн/мл)	93,40±14,60	110,70±7,9	87,70±9,50	101,30±17,7

систему исследовали на модельных опытах *in vitro*. В качестве одной из моделей использовали активность макрофагов, которые, как известно, являются первым барьером в противоопухолевой защите организма. О цитостатической активности макрофагов судили по снижению синтеза ДНК в опухолевых клетках при совместном их инкубировании с макрофагами *in vitro* (табл.5).

Преинкубация макрофагов с РНК в дозах 0,1мкг/мл и 0,01мкг/мл приводит к значительной стимуляции их цитостатической активности (табл.5;4,5), эффект усиления цитостатической активности элиминируется, если те же дозы РНК до добавления к макрофагам инкубировать с РНКазой (табл.5;7,8). Полученные результаты отчетливо показывают, что преинкубация макрофагов с РНК, выделенной из асцитной жидкости опухоли Эрлиха, стимулирует цитостатическую

активность макрофагов в отношении опухолевых клеток.

Таблица 5.

Действие разных доз асцитной РНК на цитостатическую
активность макрофагов.

№.	Состав инкубационной смеси	Вкл. ³ H-тимидина в ДНК(имп/мин)	% ингибиции	по отн. к контр.
1.	Опухолевые клетки	57600±2450	-	-
2.	1 + МФ (контроль)	29000±1800	49,5	
3.	1 + МФ + РНК	28400±800	51,7	н
4.	1 + МФ + РНК	17800±620	69,0	0,001
5.	1 + МФ + РНК	20200±2200	64,9	0,001
6.	1 + МФ + РНК	31030±1200	46,2	н
7.	1 + МФ + гидр.	31000±860	46,2	н
8.	1 + МФ + гидр.	30600±1100	49,6	н

Примечание: МФ+РНК - макрофаги, предварительно проинкубированные с асцитной РНК, с 3 по 6 - в дозах: 1,0; 0,1; 0,01; 0,001 мкг/мл, соответственно. МФ+гидр. - макрофаги, предварительно проинкубированные с РНКазами гидролизатами асцитной РНК, 7 и 8 - в дозах: 0,1; 0,01 мкг/мл, соответственно, н - нет статистической значимости.

Макрофаги являются важнейшим звеном иммунорегуляции, и одной из основных регуляторных функций макрофагов является контроль за пролиферацией лимфоцитов (Ковальчук, Череев, 1991), который они реализуют с помощью цитостатического механизма. Влияние РНК, выделяемой опухолевыми клетками, на регуляторную активность макрофагов исследовали по изменению ингибирующего действия макрофагов на синтез ДНК в лимфоцитах после

преинкубации макрофагов с РНК.

При совместном культивировании селезеночных лимфоцитов мышей с перитониальными макрофагами синтез ДНК в лимфоцитах ингибируется на 40%. Предварительная инкубация макрофагов с различными дозами асцитной РНК не оказывает заметного влияния на ингибицию макрофагами синтеза ДНК в спонтанно делящихся лимфоцитах).

Совершенно иная ситуация наблюдается в случае митоген-стимулированных, активно делящихся лимфоцитов. Интактные макрофаги подавляют бласттрансформацию стимулированных конканавалином А лимфоцитов на 49,5%, после преинкубации макрофагов с асцитной РНК (0,01мкг/мл) , последние проявляют лишь слабое цитостатическое действие, снижая включение ^3H -тимидина в ДНК лимфоцитов всего на 20%.

РНК, выделяемая опухолевыми клетками, обладает и митогенной активностью и способна стимулировать синтез ДНК в лимфоцитах в крайне низких концентрациях (0,0001мкг/мл). Митогенный эффект асцитной РНК зависит от ее дозы. Дозовые эффекты РНК, по-видимому, отражают последовательную активацию лимфоцитов, принадлежащих к разным функциональным субпопуляциям лимфоцитов (Рис.6).

Лимфоциты опухоленосителей не реагируют на добавление РНК в среду активацией синтеза ДНК (рис.6,Б). Отсутствие ответа у лимфоцитов опухоленосителей на дозы РНК, митогенные для лимфоцитов здоровых мышей, вряд ли связано с общей иммунологической недостаточностью опухоленосителей, т.к. те же лимфоциты активно реагируют на действия других митогенов. Мы полагаем, что причиной "глухоты" лимфоцитов опухоленосителей к действию асцитной РНК может быть загруженность их мембранных рецепторов РНК, циркулирующей в сыворотке крови опухоленосителей.

Рис. 6. Действие асцитной РНК на реакцию бласттрансформации лимфоцитов здоровых мышей (А) и опухоленосителей (Б). По вертикали - индекс стимуляции синтеза ДНК в лимфоцитах, горизонтальная линия - уровень синтеза ДНК в лимфоцитах без добавления РНК. 1-6 - дозы асцитной РНК от 0.0001 до 10 мкг/мл. 7,8 - КонА и ФГА, соответственно.

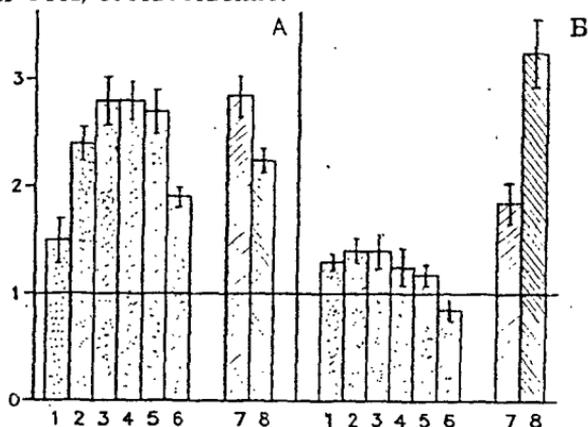
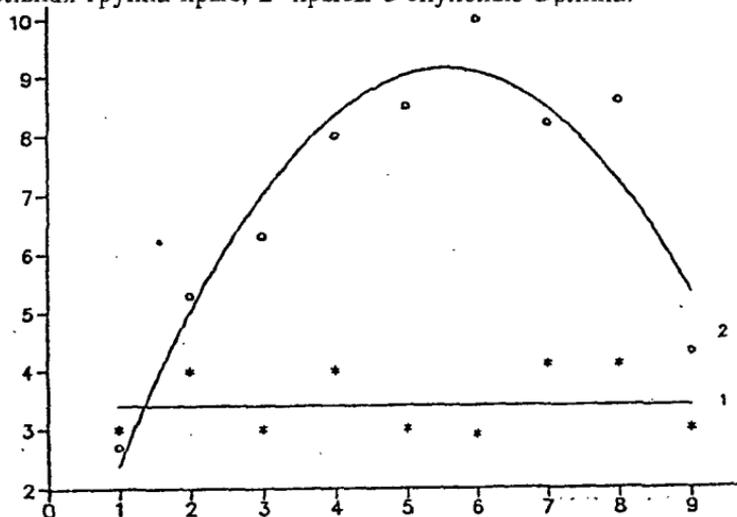


Рис.7.Изменение содержания РНК в плазме крови крыс при развитии и регрессии опухоли.По горизонтали- дни после перевивки опухоли, по вертикали - содержание РНК в плазме крови (отн.ед/ мл).1-контрольная группа крыс, 2- крысы с опухолью Эрлиха.



Нами обнаружено, что при развитии опухоли в плазме крови экспериментальных животных повышается содержание РНК, уровень

ее содержания коррелирует со стадиями развития опухоли (рис.7).

Анализ содержания РНК в сыворотке крови онкологических больных, пациентов с доброкачественными опухолями и здоровых доноров показал, что у большинства пациентов со злокачественными опухолями в сыворотке крови обнаруживается повышенное содержание РНК (табл.6). Установлено, что это различие наиболее четко выявляется у больных со злокачественными опухолями II стадии, с тенденцией к снижению в III и IV стадиях.

Таблица 6.

Содержание РНК в сыворотке крови здоровых лиц
и онкологических больных.

Диагноз	Кол-во людей	Содержание РНК (мкг/мл)
Рак молочной железы	35	8,98 ± 2,03
Рак шейки матки	20	9,46 ± 1,18
Рак кожи	9	9,32 ± 0,98
Рак пищевода	7	13,19 ± 1,35
Рак щитовидной железы	4	8,32 ± 1,02
I	21	8,84 ± 1,09
II	33	11,33 ± 2,31
III	40	9,40 ± 1,27
IV	42	5,40 ± 1,17
Доброкачественные опухоли	26	7,50 ± 0,87
Здоровые доноры	26	7,46 ± 1,02

I, II, III, IV - стадии развития злокачественных опухолей.

Повышение содержания РНК в сыворотке крови при развитии опухоли может индуцировать синтез аутоантител к РНК.

Как показали результаты анализа аутоантител к РНК методом ИФА в сыворотке крови 179 больных со злокачественными опухолями и 195 здоровых лиц, средний уровень аутоантител к РНК в сыворотке

крови онкологических больных составляет $0,610 \pm 0,010$ отн.ед., что значительно превышает значение данного показателя в группе здоровых лиц ($0,366 \pm 0,070$ отн.ед.). По всей вероятности, эти данные отражают иммунный ответ организма на появление РНК, секретируемой опухолевыми клетками в сыворотке крови онкологических больных.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

1. В бесклеточной асцитной жидкости опухоли Эрлиха обнаружена РНК. Содержание РНК зависит от стадии развития опухоли. Наибольшее количество РНК приходится на 6-7 дни развития опухоли - на период активного роста опухоли. При гетеротрансплантации асцитной опухоли Эрлиха крысам, для которой характерно интенсивный рост и деление опухолевых клеток в первые 4 дня с последующей быстрой их гибелью и рассасыванием асцита к 5-6 суткам, максимальное содержание РНК обнаруживается на 3-4е сутки после перевивки.

2. При инкубации предварительно меченых ^{14}C -углеродом клеток опухоли *in vitro*, при сохранении высокого уровня жизнеспособности клеток, через 20 минут в культуральной среде обнаруживается меченая РНК, количество которой увеличивается до определенного уровня и выходит на плато. Предварительное добавление в среду асцитной РНК снижает выход РНК из опухолевых клеток.

3. Из бесклеточной асцитной жидкости мышей с опухолью Эрлиха методом фенольной депротенинизации выделена низкомолекулярная РНК. При хроматографии полученных препаратов РНК на целите, оксиапатите и при ультрацентрифугировании в градиенте концентрации сульфата цезия получено несколько фракций РНК, что указывает на гетерогенность внеклеточной РНК. В результате аналитического электрофореза РНК в градиенте концентрации

полиакриламидного геля 2,5 - 10% установлено что, внеклеточная РНК представлена низкомолекулярными фракциями от 5 до 12S.

4. Внеклеточная РНК асцитной опухоли Эрлиха устойчива к действию панкреатической РНКазы в растворах с высокой ионной силой и около 60% РНК представлена в виде двуспиральных структур. Взаимодействие РНК с бромидом этидия, сопровождается усилением флуоресценции красителя, установлена прямая пропорциональная зависимость усиления флуоресценции от молярного отношения РНК к бромиду этидия. Кривая плавления РНК имеет дискретный характер. Вторичная структура РНК полностью восстанавливается при ренатурации в растворах с высокой ионной силой. Это свидетельствуют о том, что двуспиральные участки в РНК имеют тип шпилек, образованных скручиванием полинуклеотидных нитей на себя.

5. В препарате РНК, выделенном из асцитной жидкости мышей с опухолью Эрлиха, кроме РНК, содержатся гетеродуплексы с плавучей плотностью в сульфате цезия 1,42-1,45, состоящие из ДНК и низкомолекулярных РНК, которые связаны водородными связями и отделяются при денатурации, что было показано методом ультрацентрифугирования в градиенте концентрации сульфата цезия.

6. При инъекции экспериментальным животным с опухолью Эрлиха меченых радиоактивными изотопами предшественников РНК, через 30 минут они обнаруживаются в составе внеклеточной РНК. При блокировании синтеза РНК актиномицином Д радиоактивность внеклеточной РНК снижается на 50% в течении двух часов после блокирования.

7. Добавление к инокуляту клеток опухоли Эрлиха препарата РНК, выделенного из бесклеточной асцитной жидкости, приводит к стимуляции прививаемости и роста опухоли. Суммарная РНК из печени крупного рогатого скота, транспортная РНК и синтетические

полирибонуклеотиды таким свойством не обладают. Стимулирующий эффект асцитной РНК на прививаемость и рост опухоли не проявляется у мышей, получивших сублетальную дозу γ - облучения.

8. РНК, выделяемая опухолевыми клетками, оказывает митогенное действие на лимфоциты, ингибирует цитостатическую активность макрофагов в отношении активно делящихся лимфоцитов и стимулирует цитостатическое действие макрофагов на опухолевые клетки (*in vitro*). Эффект элиминируется обработкой РНК РНКазой.

9. В сыворотке крови экспериментальных животных-опухоленосителей содержится РНК. Фракционный состав, кинетика синтеза и особенности вторичной структуры РНК сыворотки крови опухоленосителей сходны с РНК, секретируемой опухолевыми клетками.

10. В сыворотке крови у онкологических больных обнаруживаются РНК и антитела к РНК, уровень содержания которых у пациентов со злокачественными опухолями значительно выше по сравнению с их содержанием в сыворотке крови здоровых доноров.

ВЫВОДЫ

1. РНК, обнаруженная в асцитной жидкости мышей с опухолью Эрлиха, и в культуральной среде при инкубации опухолевых клеток *in vitro*, выделяется интактными опухолевыми клетками.

2. Установлена ауторегуляция выхода РНК из опухолевых клеток ее концентрацией в культуральной среде, что свидетельствует о том, что секреция РНК интактными опухолевыми клетками регулируется гомеостатическим механизмом по типу обратной связи.

3. Стабильность РНК, выделяемой опухолевыми клетками и накопление ее в асцитной жидкости в присутствии высокоактивной РНКазы обусловлена особенностями ее вторичной структуры.

4. Препараты РНК, выделенные из бесклеточной асцитной жидкости опухоли Эрлиха обладают способностью стимулировать

прививаемость и рост гомологичной опухоли. Стимулирующее влияние РНК опосредовано ее воздействием на иммунную систему организма.

5. РНК, секретируемая опухолевыми клетками, является биологически активной, оказывает плейотропное действие на клетки иммунной системы и рассматривается как один из основных факторов воздействия опухоли на организм.

Список опубликованных работ по теме диссертации:

1. Винтер В.Г., Аглиуллина Д.Г., Андреева И.Н. Специфичность действия РНК, выделяемой клетками карциномы Эрлиха на прививаемость и рост гомологичной опухоли // Вопросы онкологии. - 1978. - Т.24. - N10. - С.38-41.

2. Аглиуллина Д.Г., Эстулина Л.А., Винтер В.Г. Вторичная структура РНК, секретируемой клетками асцитной опухоли Эрлиха // Биохимия. - 1979. - Т.44. - Вып.8. - С.1409-1415.

3. Винтер В.Г., Зоткина Н.Л., Аглиуллина Д.Г., Алимова Ф.К., Хамидуллина Н.Г., Багаева Т.В. РНК - природные ингибиторы ДНКаз // Тезисы IV Всесоюзного биохимического съезда. - Ленинград, 1979. 4. Аглиуллина Д.Г., Вегнер Е.О., Винтер В.Г. Синтез РНК, выделяемой клетками опухоли Эрлиха // Эксперим.онкология. - 1982. - Т.4.-N2.- С.38-40.

5. Винтер В.Г., Алимова Ф.К., Зоткина Н.Л., Аглиуллина Д.Г. Нейтральная ДНКазы хроматина печени при развитии опухоли у животных опухоленосителей и участие РНК в регуляции ее активности // Эксперим.онкология. - 1983. - Т.5. - N3. - С.29-32.

6. Аглиуллина Д.Г., Лапина Л.А. Обнаружение нуклеаз методом электрофореза в гелях. // Мол.генетика и биофизика. - 1983. - N8.- С.111-113.

7. Аглиуллина Д.Г., Вегнер Е.О., Лапина Л.А., Винтер В.Г. Характеристика нуклеиновых кислот, выделяемых клетками асцитного рака Эрлиха // Эксперим.онкология. - 1984. - Т.6. - N2. - С.29-32.

8. Vinter V. G. Zotkina N.L. Agliullina D.G. The participation of RNA in the regulation of the DNAase from chromatin // Abstracts XV Meeting of Federation of European Biochemical Societies.- Brussel, July 24-29 1983.

9. Аглиуллина Д.Г., Винтер В.Г. Низкомолекулярные РНК - один из факторов воздействия опухоли на организм // Тезисы докладов Всесоюзного съезда онкологов. - Ленинград, 1985.

10. Аглиуллина Д.Г., Лапина Л.А., Винтер В.Г. Изменение содержания РНК в плазме крови крыс с асцитным раком Эрлиха // Эксперим.онкология. - 1988. - Т.10. - N4. - С.49-51.

11. Аглиуллина Д.Г. Участие внеклеточных нуклеиновых кислот во взаимоотношениях опухоли и организма // Материалы итоговой научной конференции КГУ за 1987 год. - Казань. - 1989. - С.102-104.

12. Аглиуллина Д.Г., Винтер В.Г. Низкомолекулярные РНК, секретлируемые опухолевыми клетками в окружающую среду // Тезисы докл. I Всесоюзного совещания "Внеклеточные нуклеиновые кислоты культуральных и биологических жидкостей". Москва, 10-12 июня, 1987.

13. Попова Т.И., Аглиуллина Д.Г., Винтер В.Г. Действие РНК, выделяемой опухолевыми клетками на функциональную активность макрофагов // Тезисы Всесоюзного совещания "Актуальные вопросы клеточной биологии: факторы роста, дифференцировки, злокачественной трансформации". - Ленинград, 17-19 ноября 1989. - Цитология. - 1989. - Т.31. - N9. - С.1118 - 1119.

14. Баймуратова Р.К., Лезин Г.Т., Аглиуллина Д.Г. Применение однофакторного дисперсионного анализа для оценки систематических

ошибок при работе на планшете.- М., 1989. - 6 с. - Деп.ВИНИТИ от 24.04.89, N 2765-B-89.

15. Абдулхаев Ф.А., Аглиуллина Д.Г., Винтер В.Г. Ауторегуляция секреции РНК клетками опухоли Эрлиха в культуральную среду //Тезисы Всесоюзного совещания "Актуальные вопросы клеточной биологии: факторы роста, дифференцировки, злокачественной трансформации"- Ленинград, 17-19 ноября 1989. - Цитология. - 1989. - Т.31. - №9. - С.1090.

16. Аглиуллина Д.Г. Биохимические аспекты взаимодействия опухоли и организма // Центр научно-технической информации, Заключительный отчет N 2910005378 за 1986-1990 гг.

17. Попова Т.И., Аглиуллина Д.Г., Винтер В.Г. Иммуномодулирующее действие низкомолекулярной РНК, выделяемой клетками асцитного рака Эрлиха // Эксперим.онкология. - 1991. - Т.10. - N3. -С.43-47.

18. Саттарова Л.И., Аглиуллина Д.Г., Винтер В.Г. Аутоантитела к ДНК и ДНП в сыворотке крови здоровых доноров . - М., 1993. -13с. Рукопись представлена редакцией журнала "Иммунология". -Деп.в ВИНИТИ от 23.12.93г. N 3177-B93

19. Саттарова Л.И., Гафиатуллина Л.А., Аглиуллина Д.Г., Винтер В.Г. Оптимизация иммуноферментной тест-системы для определения антител к ДНК // Биотехнология. - 1994. - N11-12. - С.38-41.

20. Vinter V.G. Agliullina D.G. Sattarova L.I. Autoantibodies to nucleic acids in neoplasia/Europ J. of Allergy and Clin. Immunology.-1995.-v.50, N26.- p.431.Abstacts XVI European congress of Allergy and Clinical Immunology, Madrid, June, 1995.

21. Agliullina D.G. Vinter V.G. The participation of RNA ,secreted by tumor cells in the tumor-host immunological interactions//Abstracts

23rd Meeting of Federation of European Biochemical Societies.-Basel, August 13-18, 1995.

22. Vinter V.G. Sattarova L.I. Agliullina D.G. Sainullina A.S. Anti-DNA antibodies in the normal subjects and in patients with malignancies // Abstracts 23rd Meeting of Federation of European Biochemical Societies -Basel, August 13-18, 1995.

23. Agliullina D.G. Vinter V.G. Immunomodulating activity of RNA, secreted by intact tumor cells//Euroasian symposium on current trends in biotechnology:gene diagnostics, gene therapy and informational immunity, Ankara, Oct. 29-Nov.6.1995. Abstracts first Turkish-Russian Meeting.p.224 - 225.

24. Semashco L.I. Agliullina D.G. Vinter V.G. Autoantibodies to DNA and deoxyribonucleoprotein in patients with malignancies //Karadeniz J. of Med. Sciences. - 1995. - V.8. - N4. - p.224.

25. Зайнуллина А.С., Саттарова Л.И., Гафиатуллина Л.А., Аглиуллина Д.Г., Винтер В.Г. Разработка условий иммобилизации РНК на полистироловом планшете отечественного производства для иммуноферментного анализа антител к РНК. - Каз. ун-т.- Казань, 1995. - Деп. в ВИНТИ от 27.10.95. N2869-B95.

Аглиуллина Д.Г. (Россия). РНК, секретируемая опухолевыми клетками, и ее биологическая активность.

Интактные клетки асцитной опухоли Эрлиха секретируют в среду низкомолекулярную РНК, которая состоит из фракций 5 - 12 S, отличающихся по метаболической активности. Процесс регулируется гомеостатическим механизмом по типу обратной связи. Сходная низкомолекулярная РНК обнаруживается в сыворотке крови животных - опухоленосителей. Препараты РНК, выделенные из бесклеточной асцитной жидкости опухоли Эрлиха, обладают иммуномодулирующей активностью, стимулируют прививаемость и рост гомологичной опухоли. РНК, секретируемая опухолевыми клетками, будучи биологически активным веществом плейотропного действия, является одним из основных факторов воздействия опухоли на организм.

Agliullina D.G. (Russia) Biological activity of RNA, secreted by tumor cells.

Intact cells of Ehrlich ascites carcinoma secrete low molecular RNA into surrounding medium. The certain RNA level in the medium is constantly kept up on feedback regulation principle. RNA preparations isolated from cell free ascites fluid stimulate the tumor transplantability and growth of a homologous tumor. The effect don't appear at γ - irradiated mice having defective immune system. It is supposed that stimulating action of RNA, secreted by tumor cells, is connected with its influence on immune system. Extracellular RNA, secreted by tumor cells, exhibited an immunomodulating effect on functional activity of macrophages and lymphocytes. It is assumed that RNA, secreted by tumor cells, is able to desorganize the co-ordinated interaction of immunocompetent cells and participate in tumor - host immunological interactions.