

Г. А. ПАНОСЯН, Д. М. МАРТИРОСЯН, Н. У. НАДЖАРЯН

## ВЛИЯНИЕ НЕФРАКЦИОНИРОВАННОГО ГИСТОНА ТИМУСА ТЕЛЕНКА НА РАЗВИТИЕ САРКОМЫ РАУСА У КУР

В настоящее время становится все более вероятным утверждение ряда исследователей о том, что гистоны являются регуляторами генетической активности. Поэтому необходимо признать, что в различных клетках и тканях, отличающихся друг от друга функционально и морфологически, должен быть различный набор гистоновых фракций.

Раковая клетка представляет собой пример нарушенной регуляции генетической активности. Это значит, что в раковой ткани должен быть изменен набор гистонов. В литературе имеется много работ, в которых приводятся данные, говорящие в пользу наличия подобного измененного гистонового состава. Однако в силу несовершенства методов исследования различия в гистоновых наборах двух отличающихся функционально и морфологически клеток и тканей, а также нормальной и раковой клетки, обнаруженные рядом исследователей, пока еще не могут считаться твердо установленными [5, 8]. Поэтому определение биологической активности нефракционированного гистона (т. е. всего набора гистоновых фракций, имеющихся в клетке), выделенного из здоровой и опухолевой ткани, является довольно ценным методом обнаружения различий в гистоновом наборе этих тканей.

Еще в 1944 г. Стедман и сотрудники [17] и в 1954 г. И. Б. Збарский и К. А. Перевощикова [6] показали, что рост опухоли *in vivo* тормозится инъекций протамина или гистона. Позднее Беккер и Грин [11] в опытах с асцитной опухолью Крепса обнаружили, что протамин и гистоны в опытах *in vitro* входят в клетки быстро и в больших количествах, соединяются с нуклеиновыми кислотами, вызывают морфологические изменения и угнетают способность клеток расти *in vivo*.

Хнилица и Холоубек [14] также обнаружили ингибиторный эффект гистона при остром трансплантируемом лейкозе крыс. В 1963 г. В. М. Бреслер и В. И. Воробьев [2—4] отметили, что гистоны, выделенные из нормальных тканей, обладают биологической активностью и подавляют рост перевивного слизистого рака печени при воздействии на опухолевые клетки *in vitro* с последующей их имплантацией.

Шах и Рили [16] исследовали влияние гистонов и других основных белков на трансплантируемость опухолей молочной железы мышей.

Они показали, что богатый лизином гистон в концентрации 10 мг/л в 69% случаев тормозит рост опухоли, спермин в той же концентрации приводит к 35—36%-ному торможению, а протамин и спермидин не влияют на развитие опухоли; полилизин в концентрациях более чем 7 мг/мл полностью блокирует рост опухоли.

Из вышеизложенного видно, что гистоны обладают сильно выраженной биологической активностью и тормозят развитие некоторых опухолей.

Механизм действия гистона на развитие опухоли совершенно не ясен. Многие исследователи указывают, что гистоны обладают токсическим действием как на здоровые, так и на опухолевые клетки [5, 10, 12, 13, 15, 18]. По данным Бреслера и Воробьева [2—4] гистоны нетоксичны и не вызывают заметных повреждений опухолевых клеток. Хнилица и Холоубек [14] считают выводы о токсическом эффекте гистонов на опухолевые клетки необоснованными.

В настоящем сообщении приводятся результаты экспериментов по определению биологического эффекта нефракционированного гистона тимуса теленка на развитие саркомы Рауса у кур.

Гистоны выделяли из тимуса теленка следующим образом: ткань размельчали в микроразмельчителе, а затем многократно гомогенизировали в физиологическом растворе; промытый осадок экстрагировали 0,25 М соляной кислотой, экстракт просветляли фильтрованием через бактериальный фильтр, и гистон из диализованного против воды экстракта осаждали ацетоном и высушивали под вакуумом.

Опухоль Рауса на курах получали внутримышечным введением взвеси саркомных клеток (штамм Кара-Зильбера [19]) в растворе Хэнкса или в физиологическом растворе. Опухоли выделяли на 7—8-й день. Опухолевые клетки в опытах с воздействием гистона получали трипсинизацией куриной саркомы общепринятым методом [1]. Отмытые клетки инкубировали в забуференном растворе Хэнкса (рН 7,2) с гистоном тимуса теленка в трех концентрациях (0,5 мг/л, 1,5 мг/мл, 5 мг/мл) в течение 16—18 ч. при 4°C. После инкубации определяли выживаемость клеток путем подсчета количества живых и мертвых клеток (окрашивание витальной краской трипановой синью), затем клетки вводили взрослым курам или цыплятам в кожу крыльев. Контролем служили клетки саркомы, инкубированные в растворе Хэнкса в тех же условиях.

Было проведено две серии опытов на 30 курах: 1) введение контрольных и инкубированных с гистоном клеток разным курам и 2) введение контрольных и опытных клеток одной и той же особи в разные участки крыла. Опухолевые клетки до и после инкубации с гистоном окрашивали на гистон по методу Ольферта и Гешвинда [9].

Результаты проведенных опытов по влиянию инкубации опухолевых клеток с гистонами на рост саркомы Рауса у кур обобщены в табл. 1. Из таблицы видно, что через 6—12 дней у большинства контрольных кур введение опухолевых клеток приводит к появлению боль-

Таблица 1

Влияние инкубации клеток саркомы Рауса с нефракционированным гистонем тимуса теленка на развитие опухоли

Концентрация гистонов в мг/мл	Количество инъецированных клеток в млн	Появление опухоли в днях	Размер опухоли (максим.) в мм	Рассасывание опухоли в днях	Одновременное введение клеток, обработанных гистонем
Контроль	1,2	8	40×35	пала до 30-го дня	—
"	1,2	8	30×20	пала до 30-го дня	—
"	1,2	8	40×35	пала до 30-го дня	—
"	1,2	8	35×30	пала до 30-го дня	—
"	1,2	8	40×35	пала до 30-го дня	—
"	1,2	8	25×15	пала до 30-го дня	+
"	1,2	12	25×15	30	+
"	2,0	8	25×20 (20-й день)	47	+
"	2,0	8	21×16 (44-й день)	47	+
"	2,5	7	56×44 (22-й день)	пала на 30-й день	+
"	2,5	7	31×22 (15-й день)	21	+
"	0,8	6	18×18 (15-й день)	30	+
"	0,8	6	25×21 (15-й день)	25	+
"	0,8	6	45×35 (43-й день)	20×15 (65-й день)	+
"	0,8	6	70×65 (30-й день)	рост продолжается	+
0,5	2,0	13	20×10 (27-й день)	забита на 27-й день	+
1,5	2,0	15	11×7	28	
1,5	2,0	15	21×16 (44-й день)	70	
1,5	1,6	15	19×19 (22-й день)	пала не от опухоли	
1,5	1,6	15	22×15 (15-й день)	32	
1,5	0,8	13	менее 4×4	15	
1,5	0,8		отсутствие	опухоли	
1,5	0,8		отсутствие	опухоли	
1,5	0,8		отсутствие	опухоли	
5,0	2,0	15	11×7 (20-й день)	28	
5,0	1,0	15	11×8 (15-й день)	21	
5,0	0,8	9	менее 4×4	18	
5,0	0,8	13	менее 4×4	45	
5,0	0,8	13	50×30 (36-й день)	рост продолжается	
5,0	0,8		отсутствие	опухоли	
5,0	2,0		отсутствие	опухоли	
5,0	2,0		отсутствие	опухоли	

ших опухолей. Все контрольные куры погибли приблизительно в течение месяца. Обработка клеток гистонем *in vitro* в течение 16—18 ч. при 4°C приводит к резкому торможению развития опухоли, а часто наблюдается и полное отсутствие опухоли. Только в одном случае нам удалось отметить сильный рост опухоли после введения опухолевых клеток, обработанных гистонем в концентрации 5 мг/мл.

Из 17 случаев, приведенных в табл. 1, в 8 предварительная инкубация опухолевых клеток с гистонем приводит к замедленному росту и к последующему рассасыванию, а в 6—к полному отсутствию опухоли. В двух случаях исход не выяснен (в одном случае птица забита на 27-й день с небольшой опухолью, в другом—пала на 22-й день также с небольшой опухолью от неизвестной причины). Интересно отметить, что, если одной и той же особи вводить в двух или трех различных участках крыла одновременно и контрольные и обработанные гистонем клетки, то в том случае, если наблюдается отсутствие опухоли или более

замедленный рост с последующим рассасыванием (а это происходит в большинстве случаев), то рассасываются также и контрольные опухоли (рис. 1); в том же случае, когда имеется рост опухоли и при введе-

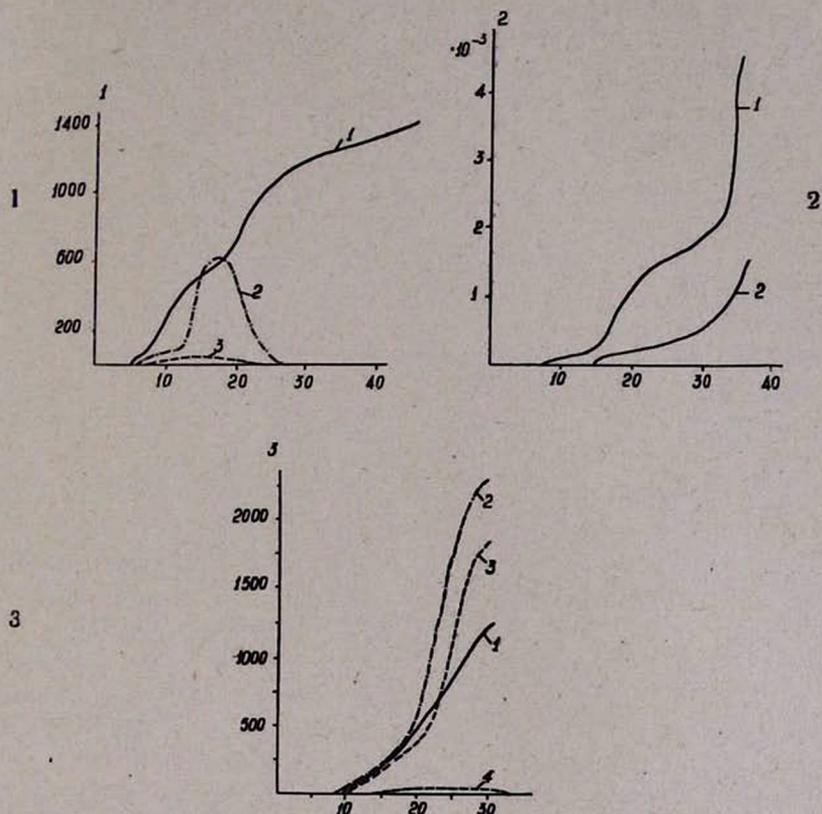


Рис. 1. Ингибиторный эффект гистона на рост саркомы Рауса. 1 — опухоль, растущая на курах, не инъецированных клетками, обработанных гистомом; 2 — контрольная опухоль, растущая на курах, инъецированных клетками, обработанными гистомом; 3 — опухоль, растущая из клеток, обработанных гистомом. Концентрация гистона — 5 мг/мл. По оси абсцисс — дни после введения опухолевых клеток, по оси ординат — размер опухоли в мм<sup>2</sup>.

Рис. 2. Рост саркомы Рауса после введения контрольных и обработанных гистомом опухолевых клеток. 1 — контрольные клетки; 2 — клетки, обработанные гистомом в концентрации 5 мг/мл. Обозначения те же.

Рис. 3. Зависимость ингибиторного эффекта гистона от времени инкубации. 1 — инкубация клеток в течение 1 ч. в растворе Хэнкса; 2 — инкубация клеток в растворе Хэнкса в течение 18 ч.; 3 — инкубация клеток с гистомом в течение 1 ч.; 4 — инкубация клеток с гистомом в течение 18 ч. Концентрация гистона 5 мг/мл. Обозначения те же.

нии обработанных гистомом опухолевых клеток, то наблюдается интересная зависимость роста контрольной опухоли от опытной. Как видно из рис. 2, кривая роста опухоли в контрольном участке имеет сложную форму, зависящую от развития опухоли, полученной от обработанных гистомом клеток: медленное развитие опытной опухоли приводит к мед-

ленному развитию контрольной; как только опытная опухоль начинает быстрее расти, резко увеличивается скорость роста и контрольной.

Ингибиторный эффект зависит как от концентрации гистона, так и от времени инкубации клеток с гистонами *in vitro*. На рис. 3 приведены результаты опытов, где курам вводились опухолевые клетки, инкубируемые с гистонами в концентрации 5 мг/мл в течение 1 ч. и 18 ч. Как видно из рисунка, инкубация клеток с гистонами в 18 ч. полностью тормозит развитие опухоли.

Таблица 2  
Выживаемость опухолевых клеток при инкубации с гистонами\*

Концентрация гистона	Время инкубации (в ч.)	Количество клеток в млн		Процент торможения
		до инкуб.	после инкуб.	
1. Контроль 1,5 мг/мл 5,0 мг/мл	18	15,0	13,8	8
	18	15,0	7,2	52
	18	15,0	4,7	69
2. Контроль 1,5 мг/мл 5,0 мг/мл	18	9,0	5,0	45
	18	11,5	4,5	61
	18	21,5	3,5	84
3. Контроль  5,0 мг/мл	1	3,1	3,1	0
	3	3,1	3,1	0
	6	3,1	3,1	0
	18	3,1	2,6	16
	18	3,1	1,8*	43
5,0 мг/мл	1	3,1	2,6	16
	3	3,1	2,5	21
	6	3,1	2,0*	37
	18	3,1	1,8*	43

\* Расчет производился приблизительно, ввиду сильной агрегации клеток.

В табл. 2 приведены результаты опытов по выживаемости клеток при инкубации их *in vitro* с гистонами. Из этой таблицы видно, что клетки при часовой инкубации с гистонами в концентрации 5 мг/мл выживают в 84% случаев, при 3-часовой—в 82, при 6-часовой в 63, при 18-часовой—в 57% случаев. В контрольных опытах наблюдали 100%-ную выживаемость в условиях 6-часовой инкубации и 84%-ную—при 18-часовой инкубации.

Цитохимические данные на окрашиваемость зеленым прочным, который связывается с гистонами и другими основными белками, показали, что в контрольных опухолевых клетках (не инкубированных с гистонами) имеется слабая окрашиваемость цитоплазмы мелко зернистого характера и несколько интенсивнее окрашенное ядро с хроматиновым типом окраски. Инкубация контрольных клеток в физиологическом растворе в течение 18 ч. при 4°C не приводит к изменению окрашиваемости; наблюдается лишь частичное разрушение клеток. При инкубации клеток с гистонами (1,5 мг/мл и 5 мг/мл) наблюдается резкое увеличение интенсивности окрашивания цитоплазмы, особенно ядра, зависящее от времени инкубации и концентрации гистона. Причем вначале

увеличивается окрашиваемость цитоплазмы, а затем ядра. Иногда при 18-часовой инкубации наблюдается сильно окрашенное ядро при слабо окрашенной цитоплазме. Характер окрашиваемости цитоплазмы меняется со временем: вначале в цитоплазме обнаруживаются мелкие окрашенные зерна, затем эти зерна постепенно увеличиваются и к концу инкубационного периода превращаются в довольно крупные гранулы. Ядро же имеет хроматиновый тип окраски, который не зависит ни от времени инкубации, ни от концентрации гистона; меняется лишь интенсивность окраски.

Необходимо отметить, что в обработанных гистоном клетках оболочки клеток и ядра окрашиваются сильнее, чем цитоплазма и кариоплазма, что указывает на адсорбируемость гистона на мембранных структурах.

При действии гистонов, с одной стороны, наблюдается агрегация клеток, с другой—разрушение, которое зависит как от концентрации гистона, так и от времени инкубации. Имеющиеся в поле зрения эритроциты также окрашиваются зеленым прочным, причем при наличии гистона окрашиваемость как цитоплазмы, так и ядра эритроцитов увеличивается, и это увеличение также зависит от концентрации гистона и от времени инкубации.

Таким образом, наши эксперименты, а также известные в литературе данные показывают, что гистон в соответствующей концентрации и при достаточной инкубации тормозит развитие опухолей у различных животных. Объяснение природы подобного ингибиторного действия представляется исключительно важным.

Наши данные по определению выживаемости клеток *in vitro*, а также характер изменения клеток *in vitro* при инкубации их с гистонами указывают на прямое токсическое влияние гистона на опухолевые клетки. В опытах В. М. Бреслера и В. И. Воробьева [2—4] гистоны оказались нетоксичными и не вызывали заметных повреждений опухолевых клеток. Хнилица и Холоубек [14] вообще не считают выводы о цитотоксическом эффекте гистона на опухолевые клетки обоснованными.

Однако известные в литературе данные о действии гистона на опухолевые клетки говорят в пользу цитотоксического эффекта гистонов, хотя при этом не исключается более специфическое нетоксическое влияние гистонов, заключающееся в эффекте на генетический аппарат клетки.

Каким бы ни был механизм воздействия гистона на клетку, необходимо признать, что гистон проникает в клетку, поскольку не всякий эффект гистона можно объяснить его действием на процессы, протекающие на поверхности клетки.

Известно, что белковые молекулы с относительно низким молекулярным весом способны проникать в клетки и ядра [12]. Беккер и Грин [11] на асцитных опухолевых клетках показали, что протамин и

гистон очень быстро проникают из среды в опухолевые клетки. По мнению Мирсоко и Осава [5, 10], проникновение гистонов и протамина в ядро не является нормальным физиологическим актом, а есть результат повреждающего действия на клетки, поскольку эти белки оказывают при больших концентрациях токсическое действие. Наши данные также указывают на проникновение гистонов в цитоплазму и ядро клеток саркомы Рауса и эритроцитов кур.

К токсическому действию необходимо отнести влияние гистона (или протамина) на обмен веществ клетки. Беккер и Грин [11] показали, что протамин в концентрации 0,3 мг/мл не действует на поглощение кислорода опухолевыми клетками, но угнетает анаэробный гликолиз. А Фишер и Вагнер [12] установили, что дыхание клеток может быть подавлено более высокими концентрациями протамина.

Утсуми и Ямамото [18] обнаружили ингибиторное действие богатого аргинином гистона тимуса теленка на окислительное фосфорилирование и другие реакции изолированных митохондрий клеток печени крыс. О токсическом действии гистонов также говорят данные Кишера и Хнилица [15], проводивших исследования на эмбриональных тканях. Олфри и др. [10] показали, что добавление гистонов к изолированным ядрам или ядерным рибосомам тормозит полностью или подавляет некоторые ферментативные процессы. Под действием гистона, протамина или полилизина наблюдается подавление включения  $C^{14}$ -аминокислот в белок и  $C^{14}$ -аденозина в РНК изолированных ядер тимуса. Многие авторы на основании прямого эффекта гистонов на различные функции клетки считают, что роль гистонов заключается именно в прямом действии на клетку, а не опосредованном через генетический аппарат [13, 15].

Исходя из всего вышесказанного, можно заключить, что гистоны, проникая в опухолевые клетки, вызывают в них резкие нарушения различных биохимических процессов или повреждение внутриклеточных структур, что в конечном счете приводит к гибели клетки. Часть же клеток, оставшаяся неразрушенной после указанной обработки гистоном *in vitro*, очевидно, оказывается настолько измененной, что, подвергаясь иммунологическому воздействию организма, или совсем не образует опухолей, или, если последние образуются, то в итоге рассасываются.

Вопрос о специфическом воздействии гистонов на генетический аппарат опухолевых клеток остается открытым, хотя точно установлен факт связывания экзогенного гистона с ядерными структурами опухолевых клеток.

## В ы в о д ы

1. Нефракционированный гистон тимуса теленка при инкубации опухолевыми клетками *in vitro* вызывает торможение роста куриной саркомы Рауса *in vivo*. Тормозящее действие гистона зависит от его концентрации и времени инкубации.

2. Цитохимические исследования показали, что гистоны, действуя на поверхностные структуры, проникают в цитоплазму, а затем и в ядро клетки.

3. Тормозящий эффект гистона связан с его токсическим действием на опухолевые клетки и, возможно, со вторичными изменениями иммунологических реакций организма, приводящих в конечном счете к рассасыванию опухоли.

Институт экспериментальной биологии  
АН АрмССР

Поступило 25/IX 1969 г.

Գ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ, Դ. Մ. ՄԱՐՏԻՐՈՍՅԱՆ, Ն. Հ. ՆԱԶԱՐՅԱՆ

ՀՈՐԹԻ ՔԻՄՈՒՄԻ ՉՉՏՎԱԾ ՀԻՍՏՈՆԻ ԱԶԴԵՅՈՒԹՅՈՒՆԸ ՀԱՎԵՐԻ ՌԱՌՈՒՄԻ ՍԱՐԿՈՄԱՅԻ ԶԱՐԳԱՑՄԱՆ ՎՐԱ

#### Ա մ փ ն փ ու մ

Բացահայտված է, որ հորթի քիմուսի չլսված հիստոնը ուռուցքային բջիշների հետ in vitro ինկուբացիայի դեպքում առաջացնում են հավերի սարկոմայի in vivo աճման արգելակում: Հիստոնի արգելակիչ ազդեցությունը կախված է ինկուբացիայի ժամանակից և հիստոնի խտությունից: Ցիտոքիմիական հետազոտությունները ցույց են տվել, որ հիստոնը ազդելով ուռուցքի բջի մակերեսային գոյացումների վրա, թափանցում է ցիտոպլազմայի և ապակորիզի մեջ:

Եզրակացվում է, որ հիստոնի արգելակիչ էֆեկտը ուռուցքային բջի վրա կախված է նրա տոքսիկ ազդեցությունից, ինչպես նաև օրգանիզմի իմունոլոգիական ռեակցիաների երկրորդային փոփոխություններից, որոնք վերջին հաշվով հանգեցնում են ուռուցքների ներծծմանը:

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Анджапаридзе О. Т., Гаврилов В. И., Семенов Б. Ф., Степанова Л. Г. Культура тканей в вирусологических исследованиях. М., 1962.
2. Бреслер В. М., Воробьев В. И. Цитология, 1963, 5, стр. 69.
3. Бреслер В. М., Воробьев В. И. Тезисы докладов I Всесоюзного биохимического съезда, II. 1963, стр. 40.
4. Бреслер В. М., Воробьев В. И. В кн.: Электронная и флуоресцентная микроскопия клетки. Л., 1964, стр. 124.
5. Буш Х. Гистоны и другие ядерные белки. М., 1967.
6. Збарский И. Б., Перевощикова К. А. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1954, 38, 10, стр. 61.
7. Мартиросян Д. М., Наджарян Н. У., Паносян Г. А. Материалы II научной конференции ИЭБ АН АрмССР, 1968, стр. 27.
8. Паносян Г. А. Биологический журнал Армении, 1967, 20, 9, стр. 8.

9. *Alfert M., Geschwind J. J.* Proc. Natl. Acad. Sci., 1953, 39, 10, 991.
10. *Allfrey V. G., Littau V. C., Mirsky A. S.* Proc. Natl. Acad. Sci., 1963, 49, 414.
11. *Becker F. F., Green H.* Exptl. Cell Res., 1960, 19, 361.
12. *Fischer H., Wagner N. L.* Naturwissenschaften, 1954, 41, 532.
13. *Hancock R., Ryser J. P.* Nature, 1967, 213, 701.
14. *Hnilica L., Holoubek V.* Nature, 1961, 191, 922.
15. *Kischer C. W., Hnilica L. S. J.* Cele Biol., 1965, 27, 138A.
16. *Shah V. C., Rielly P.* Nature, 1967, 191, 922.
17. *Stedman E., Pettigrew F. W.* Biochim. J., 1944, 38, 5, XXXI.
18. *Utsumi K., Yamamoto G.* Biochim. Biophys. Acta, 1965, 100, 606.
19. *Zilber L. A.* in Progr. Exptl. Tumor Res., 1965, 7, 216.