

К. М. ПОЖАРИССКИЙ, В. Ф. КЛИМШЕВСКИЙ, В. А. ГУЩИН

**ОСОБЕННОСТИ КИНЕТИКИ ПОПУЛЯЦИЙ ЭНТЕРОЦИТОВ
РАЗЛИЧНЫХ СЕГМЕНТОВ КИШЕЧНОГО ТРАКТА КАК ФАКТОР,
ОБУСЛОВЛИВАЮЩИЙ РАЗВИТИЕ ОПУХОЛЕЙ**

(Представлено академиком Е. М. Крепом 18 VI 1974)

В последние годы получены сведения, что изменения пролиферативной активности тканей приводят к изменению чувствительности клеток к канцерогенным воздействиям (¹⁻³). Вместе с тем складывается представление о гетерогенности популяции пролиферирующих клеток различных тканевых систем (^{4, 5}), и поэтому возникает вопрос о роли различных субпопуляций этих клеток в качестве источника злокачественных опухолей. Разработанные в последние годы экспериментальные модели опухолей кишечника у грызунов позволяют изучить значение особенностей кинетики популяции энтероцитов в разных отделах кишки в реализации канцерогенного эффекта.

Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах весом 160—180 г. Крысам 6 раз каждые 6 час. вводили внутривенно ³H-тимидин (³H—Т) в дозе 0,5 мкС на 1 г веса тела (удельная активность 11,9 С/ммоль). О величине пролиферативного пула кишечного эпителия в зоне пролиферации судили по выходу кривой «насыщения» на плато после *j*-ой инъекции ³H—Т. Животных убивали через 1 час после очередной инъекции и через 1 час, 3, 7, 10, 15, 20, 30, 45, 60 и 90 суток после 6 введений ³H—Т. Долю меченых клеток вычисляли на всю крипту и на зону пролиферации, которая не включает в себя дно крипты. Число меченых энтероцитов для каждого животного подсчитывали при просмотре 1000 клеток на гистоавтографах. На каждый срок брали по 3—4 крысы. Для определения поражаемости опухолями различных сегментов кишечника при действии 1,2-диметилгидразина было исследовано 206 крыс с новообразованиями (^{6, 7}).

Из табл. 1 видно, что при практически одинаковой величине пролиферативного пула $n_{pr}^*(j, 0)$ частота возникновения опухолей в различных сегментах кишечника колеблется от 0 до 100%. Это обстоятельство позволяет предположить, что не все пролиферирующие клетки крипты вносят равный вклад в возникновение опухолей после воздействия канцерогенным веществом. Видно также, что чем чаще возникают опухоли в данном месте кишки, тем выше доля меченых клеток в крипте на поздних сроках наблюдения (на 10—15 сутки коэффициент корреляции $r = +0,60$).

Интенсивно меченные клетки, обнаруживаемые в эпителии кишки через 10 и более суток после последнего введения ³H—Т, указывают на существование популяции энтероцитов, способных выходить из митотического цикла на значительное время (например, в фазу относительного покоя R_1 (⁸)) или обладающих длительным генерационным временем. Такие клетки могут быть представителями различных типов энтероцитов. Так, в тощей и, особенно, в подвздошной кишках на поздних сроках наблюдения значительное их число приходится на долю панетовских клеток, представляющих собой образования *suī generis* и не являющихся, по-видимому, источником образования опухолей. Отдельные меченые панетовские клетки наблюдались вплоть до 60 суток (рис. 1). В то же время значи-



Рис. 1. Интенсивно меченные панетовские клетки подвздошной кишки крысы через 30 суток после введения ^3H -тимидина. 1500 \times

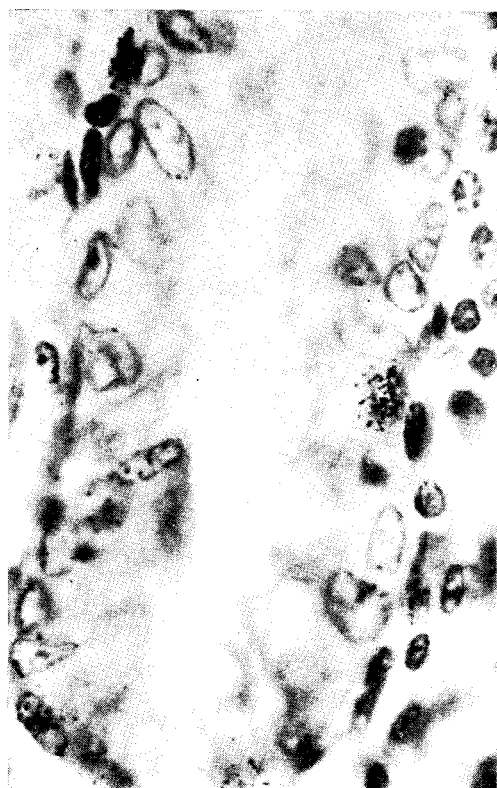


Рис. 2. Расположение меченых энтероцитов нисходящего отдела толстой кишки в нижних отделах крипты через 15 суток после введения ^3H -тимидина. 800 \times

Таблица 1

Взаимоотношения между частотой возникновения опухолей и особенностями кинетики популяций энтероцитов в различных отделах кишечника

	12-перстная кишка	Подвздошная кишка	Слепая кишка	Восходящая кишка	Поперечноободочная кишка	Нисходящая кишка
Частота возникновения опухолей, %	51±3,6	0	23±2,8	52±3,6	56±3,6	100
Пролиферационный пул энтероцитов после j -й инъекции ^3H -тимидина, $n_{pr}^*(j; 0)$, %	97,1±0,6(1,6) * $j=2$	98,4±0,6(0,4) $j=3$	97,4±0,6(2,1) *** $j=4$	86,2±1,1(6,9) *** $j=5$	96,3±0,7(3,8) $j=5$	97,3±0,7(1,0) $j=4$
Меченые энтероциты в различные сроки после 6-кратного введения ^3H -тимидина **, %						
1. 1 час	72,4±1,0(2,5)	88,6±0,7(1,1)	79,2±1,1(1,7)	83,9±1,0(5,3)	78,7±0,9(2,4)	80,9±1,2(2,2)
2. 3 сут.	97,2±0,3(2,2)	97,0±0,3(1,9)	91,2±0,8(4,2)	93,1±0,7(2,8)	90,3±0,6(1,0)	94,2±0,8
3. 7 сут.	95,8±0,8(4,3)	97,8±0,6(0,2)	89,2±1,4(0,5)	92,3±1,0(3,7)	90,7±1,1(7,1)	93,8±1,5
4. 10 сут.	33,7±0,6(12,6)	25,1±0,6(9,6)	46,1±0,9(13,9)	43,7±0,9(13,1)	45,0±1,0(10,4)	53,1±0,8(6,4)
5. 15 сут.	39,4±1,5(12,0)	27,2±1,6(8,9)	53,8±1,5(15,0)	45,0±1,4(13,3)	50,2±1,6(9,4)	64,3±1,7(11,7)
6. 15 сут.	3,1±0,3(2,6)	1,4±0,2(0,4)	7,5±0,6(2,2)	24,4±1,0(11,1)	18,8±0,7(12,0)	18,0±0,7(5,7)
	3,7±0,8(2,3)	3,8±1,1	9,4±1,0(3,6)	28,5±1,4(12,7)	14,2±1,3(1,6)	30,2±2,0(8,4)
	1,70±0,24(0,51)	0,9±0,2(0,3)	3,2±0,4(1,6)	7,4±0,5(5,4)	5,8±0,5(4,1)	8,0±0,5(7,3)
	0,5±0,2(0)	0,45±0,31(0,56)	3,5±0,6(1,9)	9,4±0,9(6,7)	9,0±0,9(6,8)	19,6±1,7(22,6)
	1,85±(0,81)	1,3±(1,6)	3,7±(1,7)	13,7±(9,8)	17,1±(9,8)	24±(27)
Длительность жизненного цикла стволовых клеток, $T_{ж1} = T_1 + (1-p) \cdot T_{R1}$, дн	86	120	44	11	9	6,5
Доля стволовых клеток в зоне пролиферации, n_1 , %	2,9	1,6	5,1	9,1	4,3	3,2
Пролиферативный пул стволовых клеток при $T_1 = 50-200$ час., P_1 , %	2,4-9,7	1,7-7,0	4,7-19	19-76	23-93	32-100
$P_1 \cdot n_1$, %	(7-28) · 10 ⁻²	(2,7-11) · 10 ⁻²	(24-97) · 10 ⁻²	(175-690) · 10 ⁻²	(99-400) · 10 ⁻²	(102-320) · 10 ⁻²
Среднее число делений энтероцитов, k	14	14	10	6	6	6

* Ошибку среднего рассчитывали а) по биномиальному распределению: $\sigma_{\bar{p}} = \sqrt{\frac{\bar{p}(1-\bar{p})}{n \cdot N}}$, где \bar{p} — средняя доля меченых клеток, $N = 1000$ — число клеток, просмотренных на крипах одного животного, n — число крыс; б) $\sigma_x = R/d_{2n} \sqrt{n}$, где R — размах, а d_{2n} — коэффициент Ермолаева. Величины σ_x указаны в скобках. Для последующих расчетов брали большую из ошибок.

** В строках 1-5 верхний ряд чисел относится ко всей популяции энтероцитов, нижний — только к зоне пролиферации, $n_{pr}^*(6; t)$. Числа в 6 строке вычислены по 1-4 рядам клеток крипы.

*** Согласно кривым $n_{pr}^*(6; t)$ для слепой и восходящей кишок были исправлены значения $n_{pr}^*(j; 0)$, которые для последующих расчетов были приняты равными 96% и 92%, соответственно.

тельная часть меченых клеток в тонкой кишке через 15 суток располагалась вне зоны пролиферации. Вместе с тем, в толстой кишке меченые клетки чаще располагались в зоне пролиферации (рис. 2).

Падение доли меченых клеток в зоне пролиферации с 92—100% тотчас после последней инъекции до 0,5—20% на 15 сутки, несомненно, указывает на гетерогенность популяции пролиферирующих энтероцитов. Расположение же немеченых энтероцитов сразу после 6 инъекций $^3\text{H}-\text{T}$ в основном в нижней части зоны пролиферации свидетельствует о локализации стволовых клеток в этой части крипты. Это обстоятельство, а также анализ кривых меченых митозов и кривых «насыщения» приводят к модели жизненного цикла энтероцитов, представленной на рис. 3.

Полученные данные об изменении доли меченых энтероцитов в зоне пролиферации после многократных введений $^3\text{H}-\text{T}$ позволяют оценить численность популяции стволовых клеток, длительность их жизненного цикла ($T_{ж1}$), величину их пролиферативного пула (P_1) и число делений (k), которое испытывает энтероцит при его превращении из стволовой клетки в дифференцированную. Согласно модели жизненного цикла, после $j=2-5$ последовательных инъекций $^3\text{H}-\text{T}$ в зоне пролиферации немечеными будут только те стволовые клетки, которые находятся в фазе относительного покоя R_1 длительностью T_{R1} и в периоде G_1 , если $T_1 > (j-1) \cdot 6 + T_{S1} > T_i$, где $i=2, 3, \dots, k$, а T_i — длительность митотического цикла i -ой популяции. Так как состояние кишечного эпителия близко к стационарному (0), то доля стволовых клеток в зоне пролиферации

$$n = N_1 / \sum_1^k N_i = 1 - n_{pr}^*(j; 0) + n_1 \frac{6 \cdot (j-1) + T_{S1}}{T_1 + (1-p) T_{R1}} = \frac{1 - n_{pr}^*(j; 0)}{1 - [6 \cdot (j-1) + T_{S1}] / T_{ж1}}.$$

Здесь N_1 — число стволовых клеток в крипте, $\sum_2^k N_i$ — число пролиферирующих нестволовых клеток в крипте, $n_{pr}^*(j; 0)$ — доля меченых клеток в зоне пролиферации через 1 час после j инъекций $^3\text{H}-\text{T}$, T_{S1} — длительность фазы S стволовых клеток, p — вероятность того, что стволовая клетка не выйдет из G_1 в R_1 , $T_{ж1} = T_1 + (1-p) \cdot T_{R1}$.

В соответствии со значениями $T_1 = 80-130$ час. для других эпителиев ($^{10-12}$), можно допустить, что для стволовых энтероцитов $50 < T_1 < 200$ час. Тогда, при $T_S = 7-8$ час. и $T_i = 10-20$ час ($i=2, 3, \dots, k$) через 15 суток после введения $^3\text{H}-\text{T}$ можно ожидать более или менее равномерное распределение меченых клеток по всем фазам жизненного цикла энтероцитов и считать, что доля меченых клеток в зоне пролиферации через 15 суток примерно равна доле меченых стволовых клеток через 1 час после 6 инъекций $^3\text{H}-\text{T}$: $n_1^*(6; 0) \approx n_{pr}^*(6; 15)$. (Учитывая возможность сильного разбавления метки в верхней части зоны пролиферации в результате многократных делений энтероцитов, величину $n_{pr}^*(6; 15)$ оценивали по доле меченых клеток в первых 4 рядах крипты, $n_{1-4}(6; 15)$.) Отсюда

$$T_{ж1} = \frac{T_1}{P_1} = [6 \cdot (j-1) + T_{S1}] \cdot \frac{N_1 - N_1(R_1)}{N_1 \cdot P_1} = \frac{30_{\text{час}} + T_{S1}}{n_1^*(6; 0)} \approx \frac{30_{\text{час}} + T_{S1}}{n_{1-4}^*(6; 15)}.$$

Оценку для k получим согласно (5) из формулы

$$\sum_2^k 2^{i-2} = 2^{k-1} - 1 \geq \frac{n_S \cdot T_{ж1} - T_{S1}}{T_{S1} - n_S \cdot T_k}, \quad T_k \leq T_i, \quad n_S = \sum_1^k N_{S_i} / \sum_1^k N_i,$$

где N_{S_i} — число клеток в фазе S i -ой популяции.

Вычисленные величины кинетических параметров n_1 , $T_{ж1}$, k и P_1 носят ориентировочный характер, в частности, из-за малого числа крыс на

точку. Несмотря на большие величины $T_{ж1}$, особенно для тонкой кишки, они кажутся реальными, так как наш расчет $T_{ж1}$ по литературным данным для эпителиев с малым значением P_1 (гепатоциты ⁽¹³⁾, мезотелий ⁽¹⁴⁾) показал, что и здесь эта величина исчисляется десятками и сотнями суток. Если действительно величина T_1 для энтероцитов не превышает 130 час., то из неравенства $T_{ж1} > 6 \text{ суток} \geq T_1$ следует существование фазы R_1 в жизненном цикле стволовых клеток слизистой кишки. Согласно расчетам, в этой фазе может находиться до 70% и более стволовых

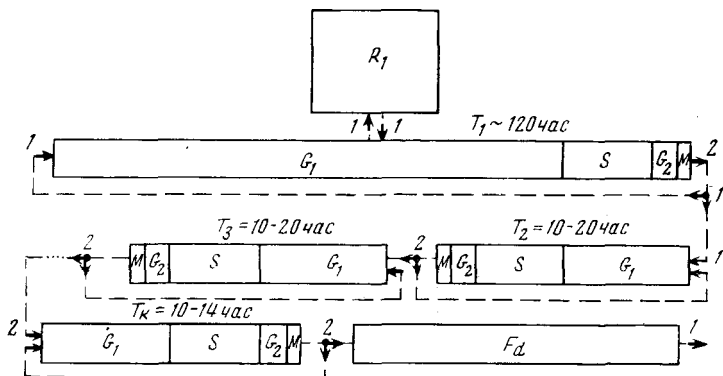


Рис. 3. Модель жизненного цикла энтероцитов: T_1 — длительность митотического цикла и R_1 — фаза относительного покоя стволовых клеток; k — среднее число делений энтероцита до выхода его из зоны пролиферации в фазу F_d , в которой находятся дифференцированные функционирующие энтероциты; G_1 , G_2 , S и M — фазы митотического цикла. Прерывистыми линиями указаны переходы клеток из одной фазы цикла в другую. Цифра 2 указывает, что переходу предшествует митоз; цифра 1 указывает на переход клетки из одной фазы цикла в другую (фаза $G_1 \rightleftharpoons R_1$), на выход из системы (фаза $F_d \rightarrow$) и на возврат в популяцию стволовых клеток в среднем одной дочерней клетки

энтероцитов. Обнаруженная в настоящей работе корреляция между частотой возникновения опухолей и величиной параметров, отражающих особенности кинетики энтероцитов в различных сегментах кишечного тракта, позволяет предположить, что акцепторами канцерогенных воздействий являются стволовые клетки, находящиеся в митотическом цикле.

Научно-исследовательский институт онкологии
им. Н. Н. Петрова
Ленинград

Поступило
23 V 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ U. Iversen et al., J. Nat. Cancer Inst., v. 45, 2, 269 (1970). ² G. P. Warwick, Federat. Proc., v. 30, 6, 1760 (1971). ³ M. F. Rajewsky, Zs. Krebsforsch., B. 78, 1, 12 (1972). ⁴ M. Lipkin, H. Quastler, Nature, v. 194, 4834, 1198 (1962). ⁵ В. А. Гуцын, Цитология, т. 11, 9, 11 (1969). ⁶ К. М. Пожарисский, Вопр. онкол., т. 18, 1, 64 (1972). ⁷ К. М. Pozharisski, In: Pathology of Tumours in Laboratory Animals, v. 1, Part 1, Lyon, 1973, p. 119. ⁸ О. И. Енифанова, Клеточный цикл, М., 1973. ⁹ H. Quastler, F. G. Sherman, Exp. Cell Res., v. 17, 3, 420 (1959). ¹⁰ А. В. Димент, Цитология, т. 11, 8, 951 (1969). ¹¹ Н. Г. Чумаков, ДАН, т. 149, № 4, 960 (1963). ¹² T. Yamaguchi, J. Tabachnik, Radiation Res., v. 50, 1, 158 (1972). ¹³ J. W. Crisham, Cancer Res., v. 22, 7, 842 (1962). ¹⁴ А. В. Димент, Синтез ДНК и пролиферация однослойных плоских эпителиев у крыс (мезотелия и эндотелия). Автореф. канд. дисс., Л., 1970.