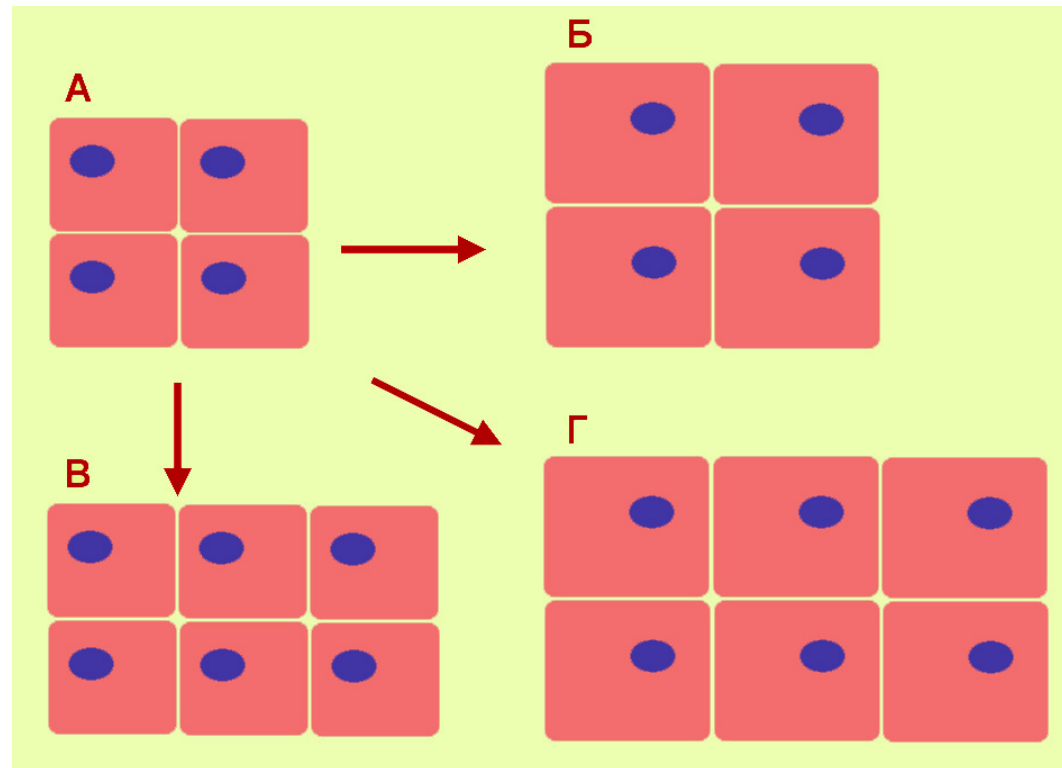


В. Ефремов

ЦИТОЛОГИЯ РОСТА

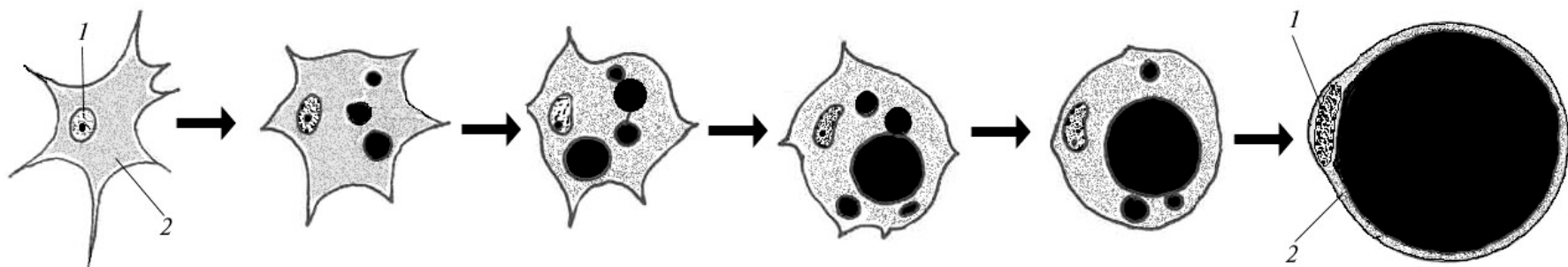
ГИПЕРТРОФИЯ
И ПРОЛИФЕРАЦИЯ КЛЕТОК

Рост размеров клеточной системы (ткани, органа) достигается разными путями. Система может становиться крупнее в результате деления входящих в её состав клеток и, следовательно, нарастания их количества (*гиперплазия* или *пролиферация*). Но её рост может осуществляться и за счет увеличения собственных размеров клеток при сохранении относительного постоянства их числа (*гипертрофия*).



Рост клеточной совокупности путем гипертрофии и пролиферации. Начальное состояние (А), гипертрофия (Б), пролиферация (В) и комбинация (Г)

ГИПЕРТРОФИЯ



Гипертрофия (от др.греч. ὑπερ- — «сверх» и τροφή — «питание») — увеличение объёма и массы объекта, за счет увеличения размеров клеток, его составляющих, под влиянием различных факторов. Как правило, гипертрофия это один из заключительных этапов жизни многих тканей, клетки которых утратили способность делиться. Примером может служить генезис жировой ткани. Клетки этой ткани – *липоциты* являются производными *перицитов* (клеток предшественниц). В зрелом состоянии липоциты обладают способностью ассимилировать и накапливать жиры в больших количествах, изменяя при этом свою форму. Жировая ткань у мужчин составляет 15-20 % от веса тела, у женщин на 5 % больше. У людей, предрасположенных к полноте, количество адипоцитов оказывается выше, чем у обычных. Полагают, это связано с тем, что у полных людей количество митотических делений на одно

на одно больше. Пока не установлено, какова природа этой склонности к тучности; является ли она наследственно обусловленной или представляет собой результат нарушения гормонального статуса индивидуума в зрелом возрасте. Во всяком случае, известно, что некоторые гормоны (адреналин, в частности) способны провоцировать дополнительные деления перицитов у взрослого организма. Рост посредством гипертрофии в период постнатального онтогенеза характерен также для скелетной мускулатуры и нервной ткани позвоночных животных.

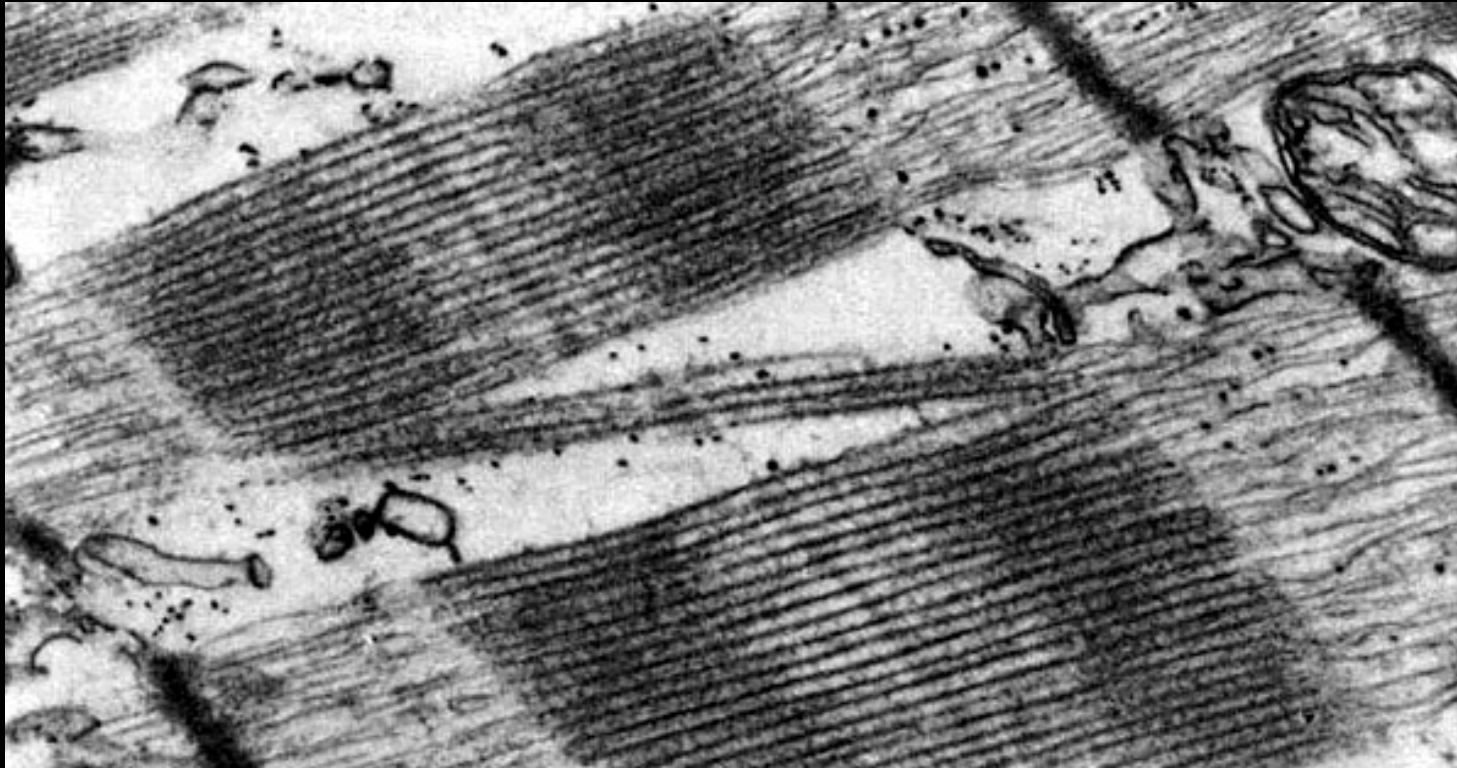
Гипертрофия соматической мускулатуры



Гипертрофия соматической мускулатуры

У человека большинство мышечных волокон появляется до рождения, и в конце первого года жизни в теле присутствуют уже все волокна. Но в постнатальном периоде мышцы, чтобы не нарушалась общая гармония в теле с другими тканями, должны расти. И они растут. Их рост на этом этапе, представляющий типичную *гипертрофию*, включает и утолщение, и удлинение. *Утолщение* происходит вследствие увеличения числа миофибрилл в каждом волокне путём продольного расщепления предсуществующих. *Удлинение* становится возможным в результате пристройки к концам миофибрилл новых *саркомеров* в местах, где концы мышечных волокон прикрепляются к плотной соединительной ткани. В этих, так называемых *терминальных участках*, как правило, мало филаментов, но много свободных рибосом. Подобный характер роста поперечнополосатой мускулатуры свойственен многим позвоночным животным. Исключением являются крысы, в мышечной ткани которых число волокон увеличивается на протяжении всей жизни.

Рост объема мышц



Электроннограмма участка поперечнополосатого мышечного волокна у растущего животного. В центре можно видеть переход из одной миофибриллы в другую. Это свидетельствует о продольном расщеплении с образованием новых миофибрилл в волокне.

По Т. Харроу из А. Ham & D. Cormack (1983)

ПРОЛИФЕРАЦИЯ КЛЕТОК

Митотический (клеточный) цикл

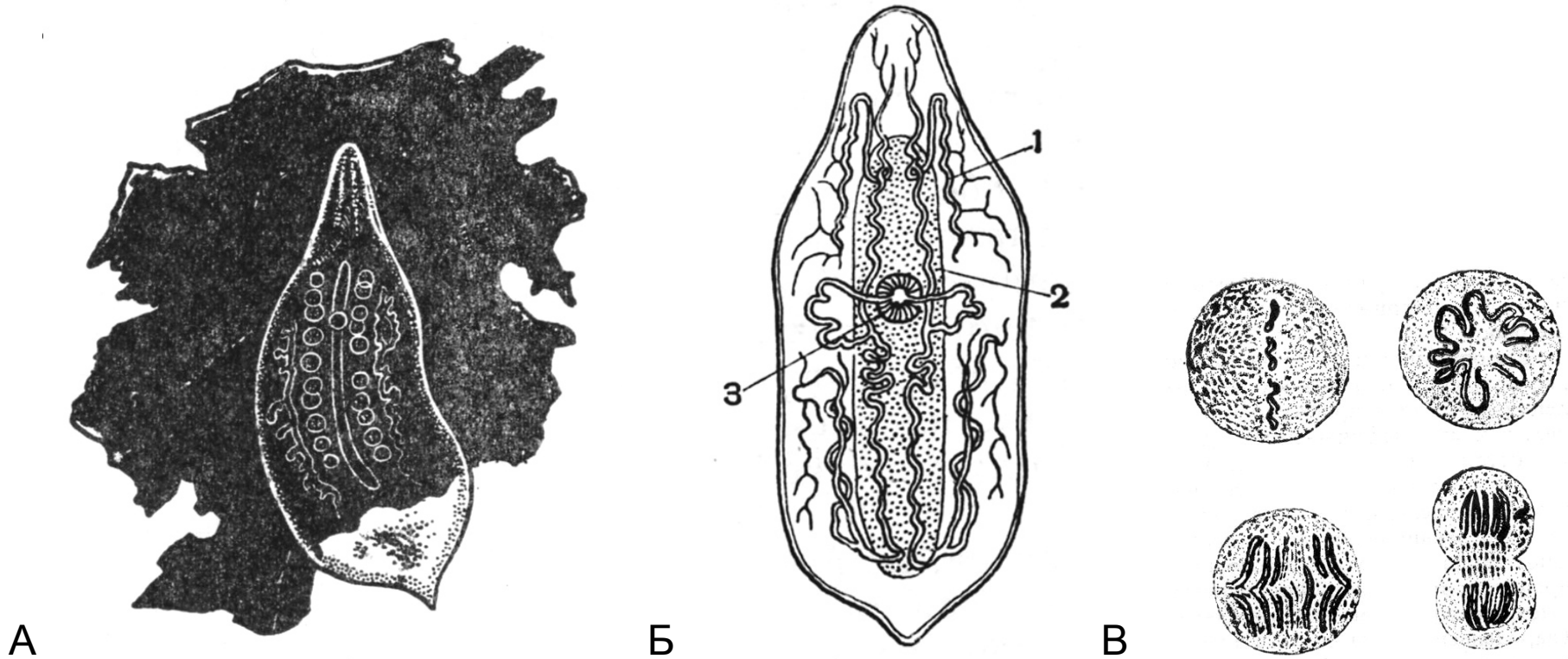
и

«фракция роста»

В основе пролиферации лежит уникальная способность клеток к последовательным биохимическим, физиологическим преобразованиям при подготовке и осуществлении их финального события - митоза. Эти преобразования циклически повторяются в клетках последовательных генераций, поэтому получили название **митотического** или **клеточного цикла**. Выдающиеся успехи в изучении пролиферации и митотического цикла нашли свое воплощение в концепции клеточного цикла и кинетики клеточных популяций.

Вся история развития учения о клеточном цикле охватывает период около 150 лет. Представления о способе деления клеток митозом возникли с момента описания **А. Шнейдером** в 1873 году картин непрямого деления ядра в клетках дробящегося яйца плоского равнореснитчатого червя *Mesostomum ehrenbergii* (слайд). В 1876 году последовало описание клеточного центра, представленное **Ван-Бенеденом**, а ещё три года спустя **Вальтер Шлейхер** предложил термин “*кариокинез*”. С 1882 года начинают одна за другой появляться работы **Вальтера Флемминга**. В одной из первых своих статей Флемминг дал подробное описание картин превращения ядра в ходе митоза (термин предложен им же), “возникновения” хромосом, их продольного расщепления и дальнейшего поведения. Эти очень точные описания сопровождаются совершенными рисунками (слайд). В. Флемминг - автор терминов: *митоз, амитоз, хроматин*.

У истоков учения о клеточном (митотическом) цикле



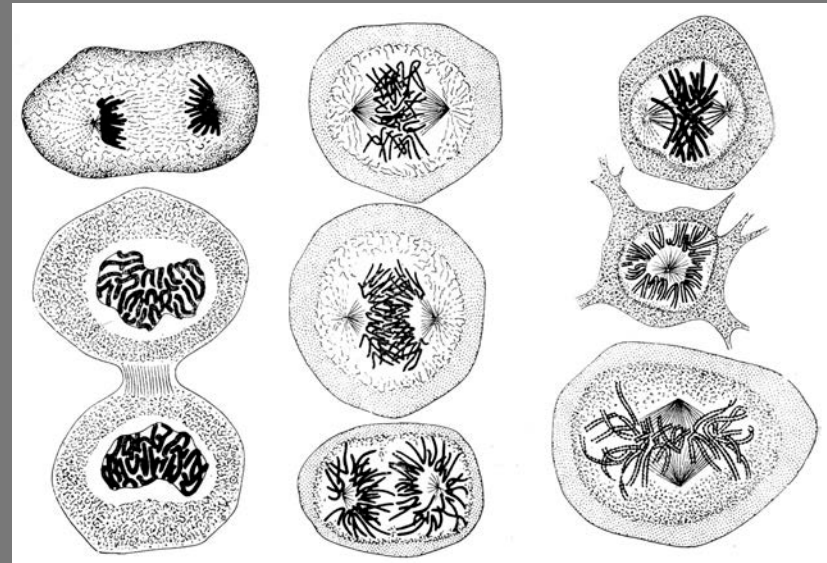
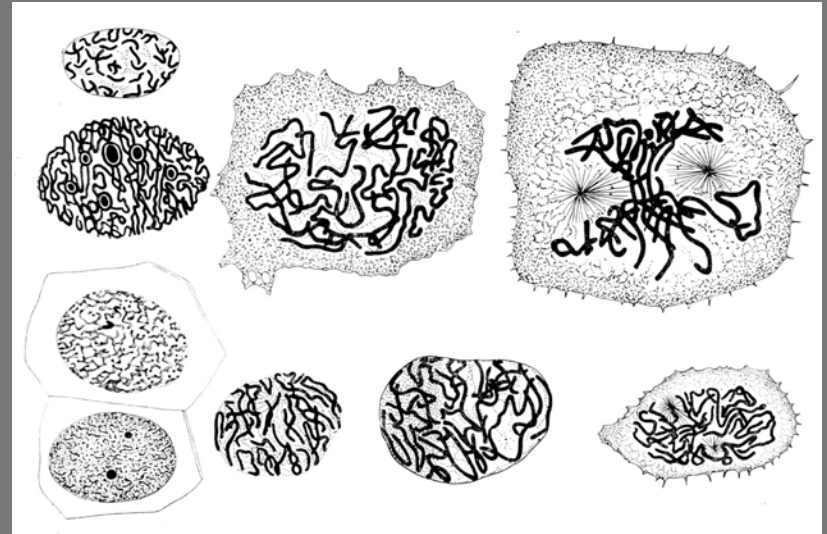
Представления о способе деления клеток митозом возникли с момента описания **А. Шнейдером** в 1873 году картин непрямого деления ядра в клетках дробящегося яйца прямокишечной турбеллярии *Mesostomum ehrenbergii*. А. Турбеллярия на листе; Б – строение тела; В – первое изображение митоза в дробящихся яйцах *M. ehrenbergii*. Рисунок А. Шнейдера (1873). 1 – каналы экскреторной системы, 2 – кишечник; 3 – ротовое отверстие.

У истоков учения о клеточном (митотическом) цикле



Walther Flemming
(1843-1905)

С 1882 года начинают выходить работы Вальтера Флемминга, выдающегося немецкого биолога, цитолога и первого цитогенетика, в которых он дал точные описания картин превращения ядра в ходе митоза и документировал их своими прекрасными рисунками



Однако в этот начальный период понятия феномена клеточного цикла ещё не существовало. Поскольку основными объектами в то время (время торжества эволюционной эмбриологии) были дробящиеся яйца с быстрым чередованием фаз митоза, то клеточный цикл отождествляли с митозом собственно. Лишь позднее появился термин «*интерфаза*», обозначавший подготовительный период к делению, собственно. При этом митоз противопоставлялся интерфазе как активное состояние клетки пассивному, о чем свидетельствует и первоначальное название интерфазы – «*интеркинез*».

Развитие гистохимии, цитохимии и появление первых методов биохимического анализа клеточного состава тканей способствовало обнаружению определенной неоднородности физиологии клетки в ходе интерфазы.

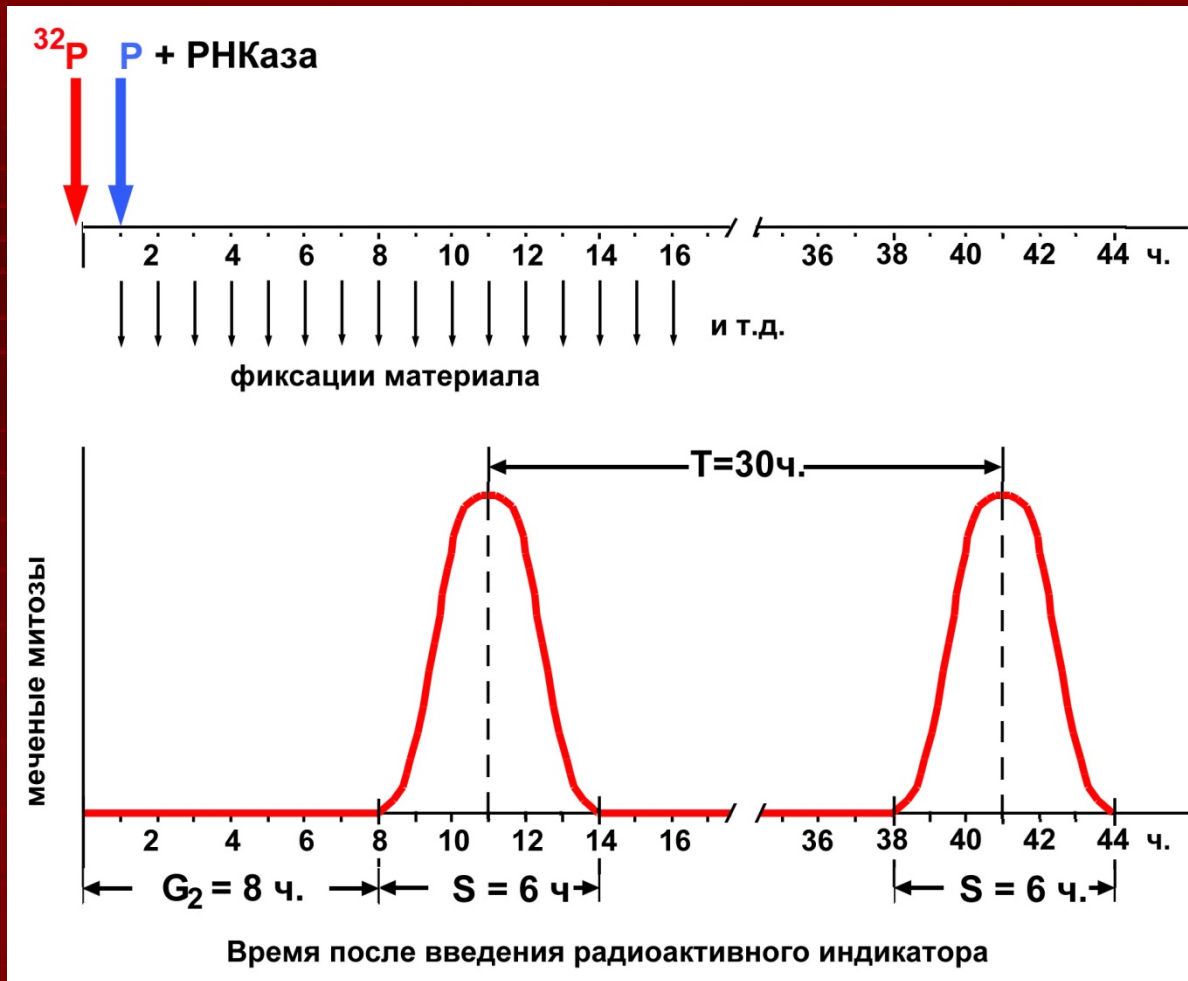
Первая успешная попытка расчленить интерфазу принадлежит Альме Говард и Стивену Пелку в 1953 г, показавшим методом радиоавтографии, что включение радиоактивного фосфора (^{32}P) в ДНК клеток меристемы корешков конского боба *Vicia faba* происходит только в середине интерфазы, заканчиваясь за определённое время до митоза. Открытие Говард и Пелка положило начало учению о митотическом (клеточном цикле). Однако в полной мере значение полученных ими результатов было оценено лишь позднее, когда они нашли блестящее подтверждение в более точных радиоавтографических исследованиях с применением специфических предшественников ДНК, прежде всего, ^3H -тимидина. Введение в 1957 году в практику исследований ^3H -тимидина, специфического для ДНК нуклеозида, меченого тритием, а также установление факта *метаболической стабильности ДНК*, обусловило новый

чении митотических циклов. С этого момента началась особенно интенсивная работа по совершенствованию метода радиоавтографии в исследовании длительности, параметров и структуры митотических циклов и кинетики клеточных популяций.

При описании ростовых процессов в период нотогенеза или органогенеза иногда употребляют термин *гиперплазия*. **Гиперплазия** (от греч. *гипер* - сверх.. и *плазис* - образование, возникновение) - это рост клеточных совокупностей разного уровня (популяций, тканей, органов, организмов, наконец) за счёт клеточного размножения при относительном постоянстве размеров клеток. Г. – это не очень строгий термин, употребляемый, порой, не только для обозначения клеточного размножения, собственно, но и увеличения цитоплазматических ультраструктур (изменяются в первую очередь [митохондрии](#), миофиламенты, [эндоплазматический ретикулум](#), [рибосомы](#)).

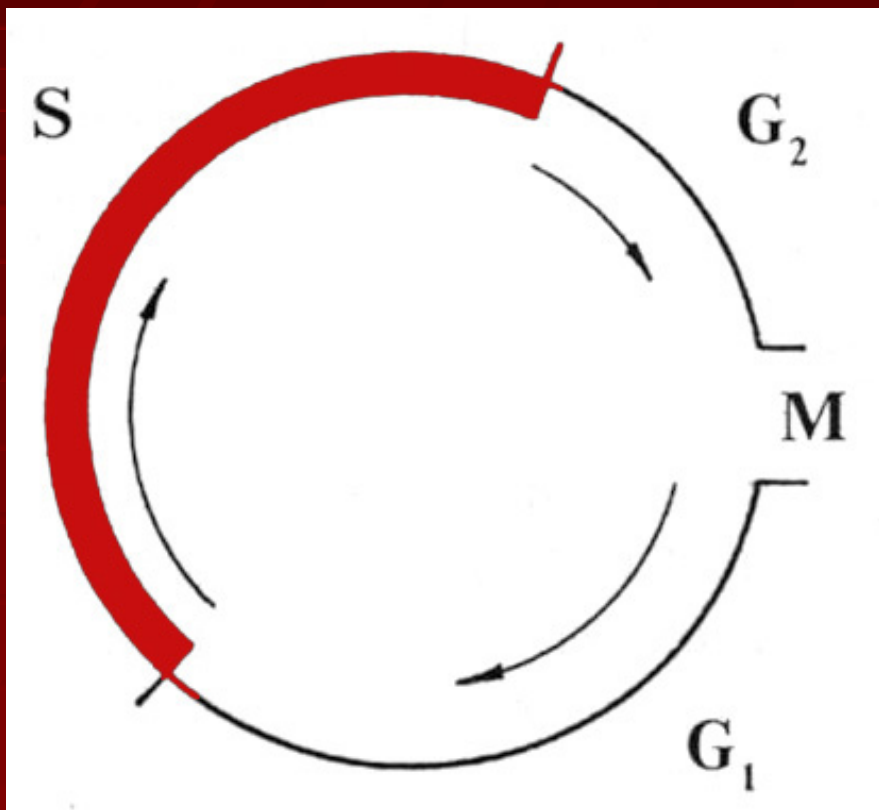
С начала прошлого века в терминологии, связанной с описанием митотического клеточного размножения утвердилось применение термина *пролиферация*. **Пролиферация** (от лат. *proles...* - отпрыск, потомство и *...fero* - несу) - слово не новое.

Раньше оно употреблялось в более широком смысле и означало буквально поступление клеток из одного участка в другой, при этом способ поступления не уточнялся. Ещё сравнительно недавно в научных статьях или учебниках можно было встретить, например, такое выражение“... клетки хрящевой мезенхимы пролиферируют из склеротома”. В настоящее время этот термин употребляется в более строгом смысле и означает *увеличение числа клеток в результате митотических делений вдвое*.



- Первая успешная попытка радиоавтографического анализа митотического цикла. Схема опыта Говард и Пелка (Howard, Pelc, 1953), обнаруживших с помощью радиоактивного фосфора неоднородность интерфазы в клетках корневой меристемы конского боба *Vicia faba*.

Митотический цикл – биография клетки



Общепринятое изображение модели четырехфазного митотического (клеточного) цикла, получившее признание после открытия Говард и Пелка.

M – митоз; **G₁** – пресинтетический период (фаза **G₁**) ; **S** – период синтеза (фаза репликации ДНК); **G₂** – премитотический период (фаза **G₂**). Литера **G** от английского слова gap – интервал, промежуток.

РАДИОАВТОГРАФИЯ

- ◎ Радиоавтография – важнейший количественный метод изучения метаболических процессов без нарушения целостности клетки и клеточных структур, объединяющий принципы морфологического и биохимического анализов.
- ◎ Радиоавтография позволяет локализовать при помощи радиоактивных изотопов биохимические процессы в клетках, и, таким образом, изучать жизнедеятельность последних

Впервые радиоавтографию для анализа клеточного размножения применили, как уже говорилось, Говард и Пелк; они же предложили принципиальную схему кинетического анализа временных параметров и структуры митотического цикла. Вслед за ними в работу по разработке принципов анализа кинетики клеточной пролиферации включилась большая группа энтузиастов, во главе которой стоял **Генри Квастлер** – разносторонне образованный, великолепный методист, умеющий глубоко вникать в проблему и находящий неожиданные решения самых сложных на первый взгляд задач. Он существенно модифицировал метод Говард и Пелка, превратив его в совершенный инструмент исследования клеточного цикла. Не случайно метод получил название «*метода кривых меченых митозов Квастлера*». Квастлер дал детальный анализ кинетики размножения клеток в так называемых «*равновесных популяциях*», составляющих основу обновляющихся клеточных систем. Кроме того, он высказал гениальную догадку о клеточной основе пролиферативного резерва тканей и органов в ходе их репарации после повреждений различной природы и обеспечивающих естественное воспроизводство клеток в так называемых «*обновляющихся*» тканях. Он связал эту способность тканей с наличием в них особой совокупности клеток, временно вышедших из митотического цикла, но при этом не утративших способность к возобновлению пролиферации. Эти клеточные совокупности были названы G_0 – *популяциями*. С именем этого замечательного учёного связывают превращение радиоавтографического подхода при исследовании митотического цикла в самостоятельное направление клеточной биологии, получившее название «*кинетика клеточных популяций*».

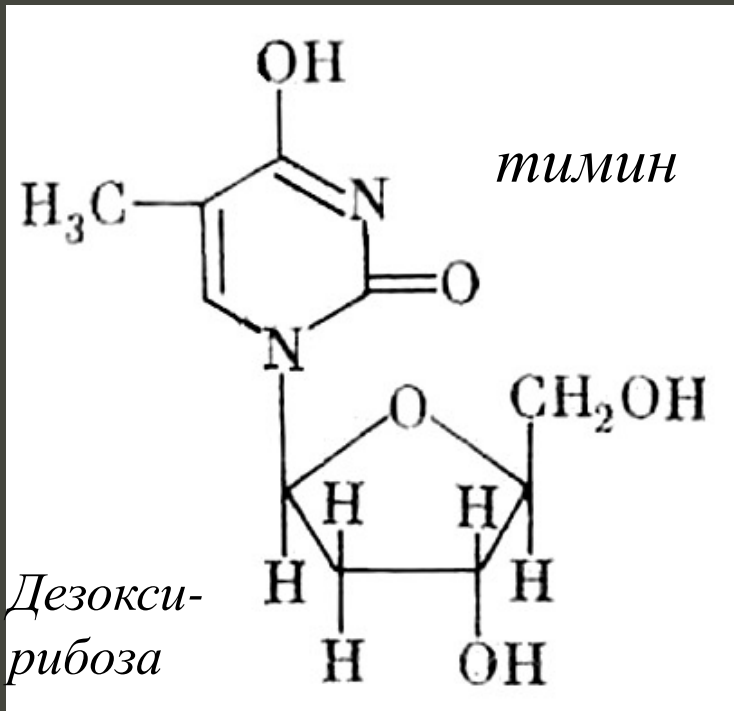
Главные элементы метода радиоавтографии

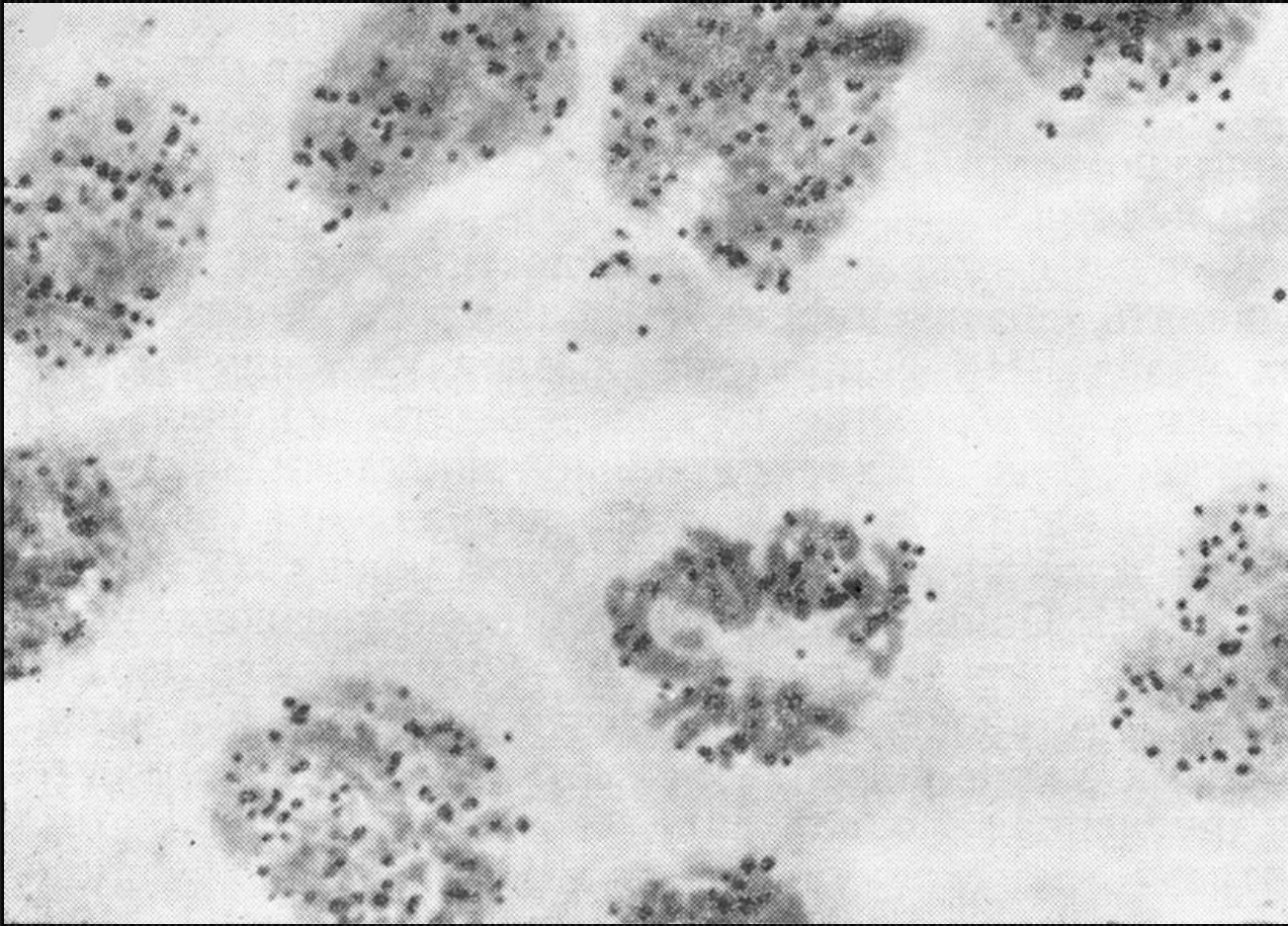
- ▶ Самые значительные успехи в изучении митотического цикла связаны с использованием в радиоавтографии специфического предшественника ДНК – **тимидина**, меченого **тритием**,
- ▶ и с установлением факта **метаболической стабильности ДНК**.

Главные элементы метода

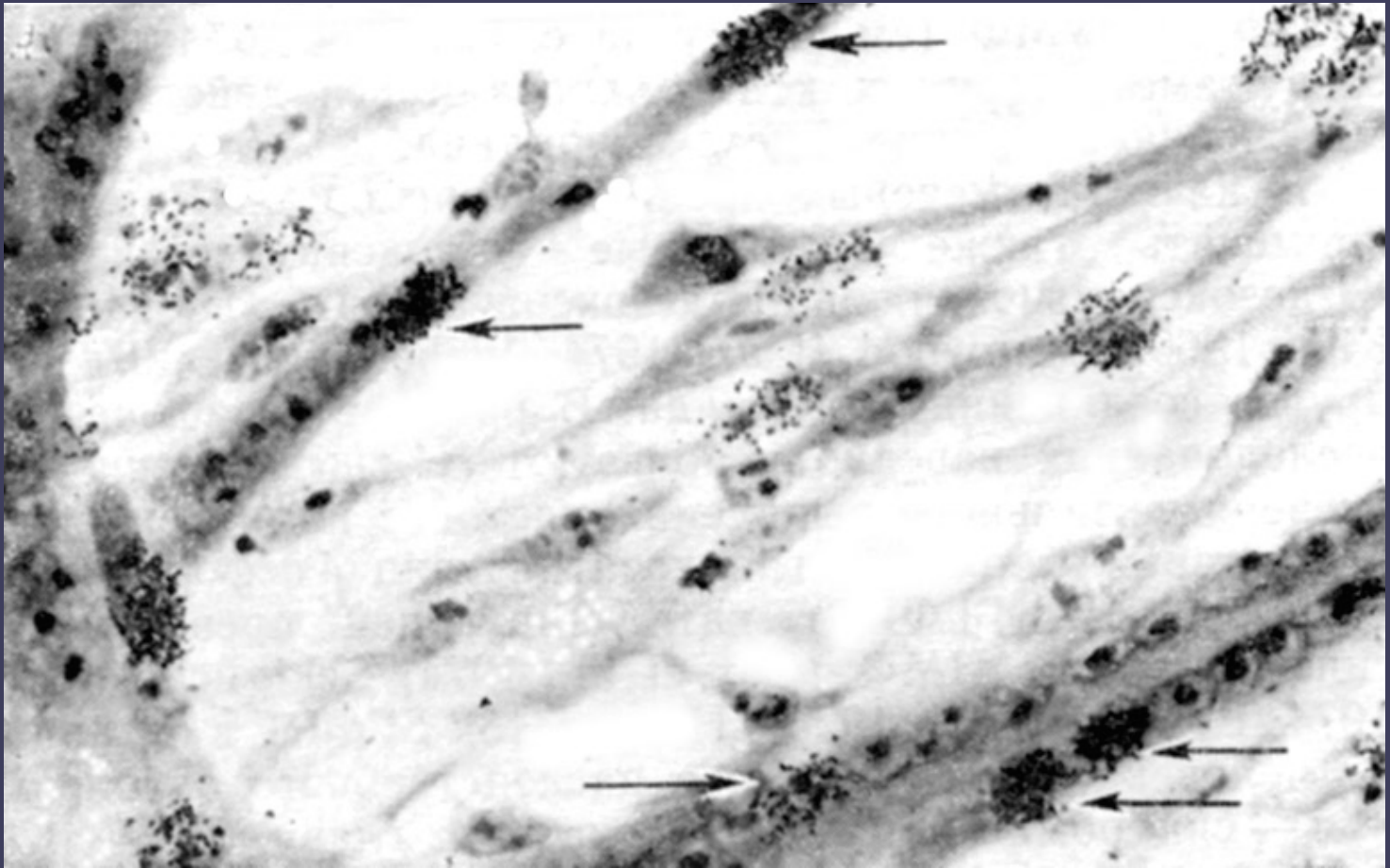
Тимидин – один из четырёх нуклеозидов, участвующих в образовании полинуклеотидной структуры ДНК, характерный только для молекулы ДНК. Именно по этой причине он является её специфическим предшественником.

Тритий (^3H) – единственный радиоактивный изотоп водорода; период его полураспада равен 12 годам. Возникающие при распаде трития β -частицы обладают малой энергией и поэтому небольшим пробегом в фотоэмульсии (1-2 μm). Это означает, что два объекта, отстоящие на срезе друг от друга на 1 μm , на автографе будут выявлены как два отдельных зерна фотоэмульсии





Радиоавтограф культуры клеток китайского хомячка, меченых ³H-тимидином. Черные точки на изображении клеток – это зерна восстановленного серебра (треки) фотоэмульсии в местах, содержащих включившийся в ДНК радиоактивный тимидин.



Радиоавтограф миоцитов, меченых ^3H -тимидином ($^3\text{HTdR}$), стрелками показаны меченые ядра, содержащие метку

Определение понятия **клеточная популяция**. Различные зачатки, ткани и органы содержат клеточные совокупности, элементы которых объединены либо общностью происхождения (например, клоны клеток в культуре, клетки нейрального гребня, меланоциты - одно из производных клеток нейрального гребня), либо пространственной непрерывностью (например, клетки поджелудочной железы), либо тем и другим вместе (например, клетки крови). Иногда в популяции объединяют клетки по признаку их атипичной морфологии (например, лейкоэмические клетки).

Определение понятия **кинетика клеточных популяций**. ККП это раздел учения о митотическом (клеточном) цикле, изучающий состояние и динамику клеточных популяций во всём многообразии внутрисистемных отношений. Большинство свойств клеточных популяций (изменение числа клеток, рост, способность к обновлению и самоподдержанию, пополнение или утрата и т.д.) характеризуют изменения популяции во времени и пространстве и определяются динамикой составляющих её элементов. Изменение численности популяции во времени (т.е. рост и деградацию) можно рассматривать как наиболее общее проявление специфики ККП. Существует практически бесчисленное разнообразие динамики роста КП. Оно есть результат сложения и взаимодействия многих факторов [скорости прохождения клетками митотического цикла, композиции КП, отношения между пролиферирующей и непролиферирующей группами (*субпопуляциями*), интенсивности обмена клетками между популяциями, скоростью и направленностью миграций клеток и др.].

Клеточные популяции

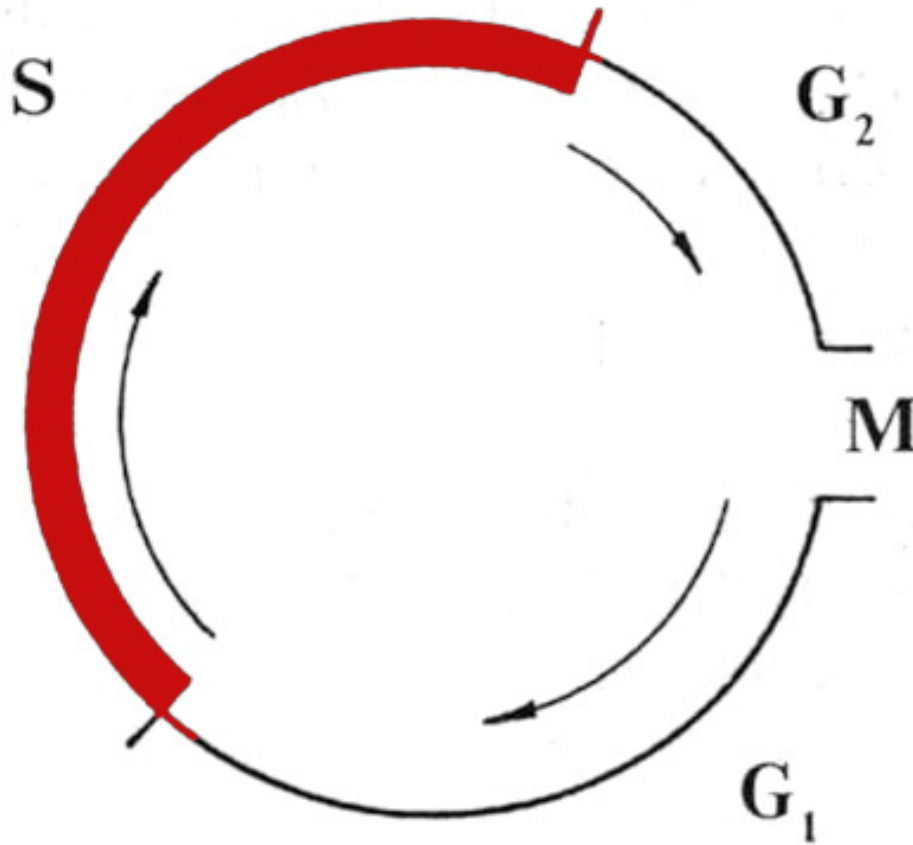
Популяция. Различные зачатки, ткани и органы состоят из клеточных совокупностей, клетки которых объединены либо общностью происхождения, либо пространственной непрерывностью, либо тем и другим одновременно. Такие совокупности клеток принято называть *популяциями*.

Примеры: *. Клетки зачатка поджелудочной железы и клетки одиночной опухоли (хорошо пространственно обособленные), лейкемические клетки, рассеянные с током крови, но объединенные по признакам их атипичной морфологии.*

Кинетика Клеточных Популяций

Кинетика клеточных популяций – это раздел учения о митотическом (клеточном) цикле, рассматривающий состояние и динамику клеточных совокупностей во всём многообразии внутрисистемных отношений (*рост и деградация, самоподдержание и обновление, пополнение и утрата клеток в результате перемещения в другие популяции или гибели и т.п.*)

Митотический (клеточный) цикл



Главным элементом кинетики клеточных популяций является митотический цикл.

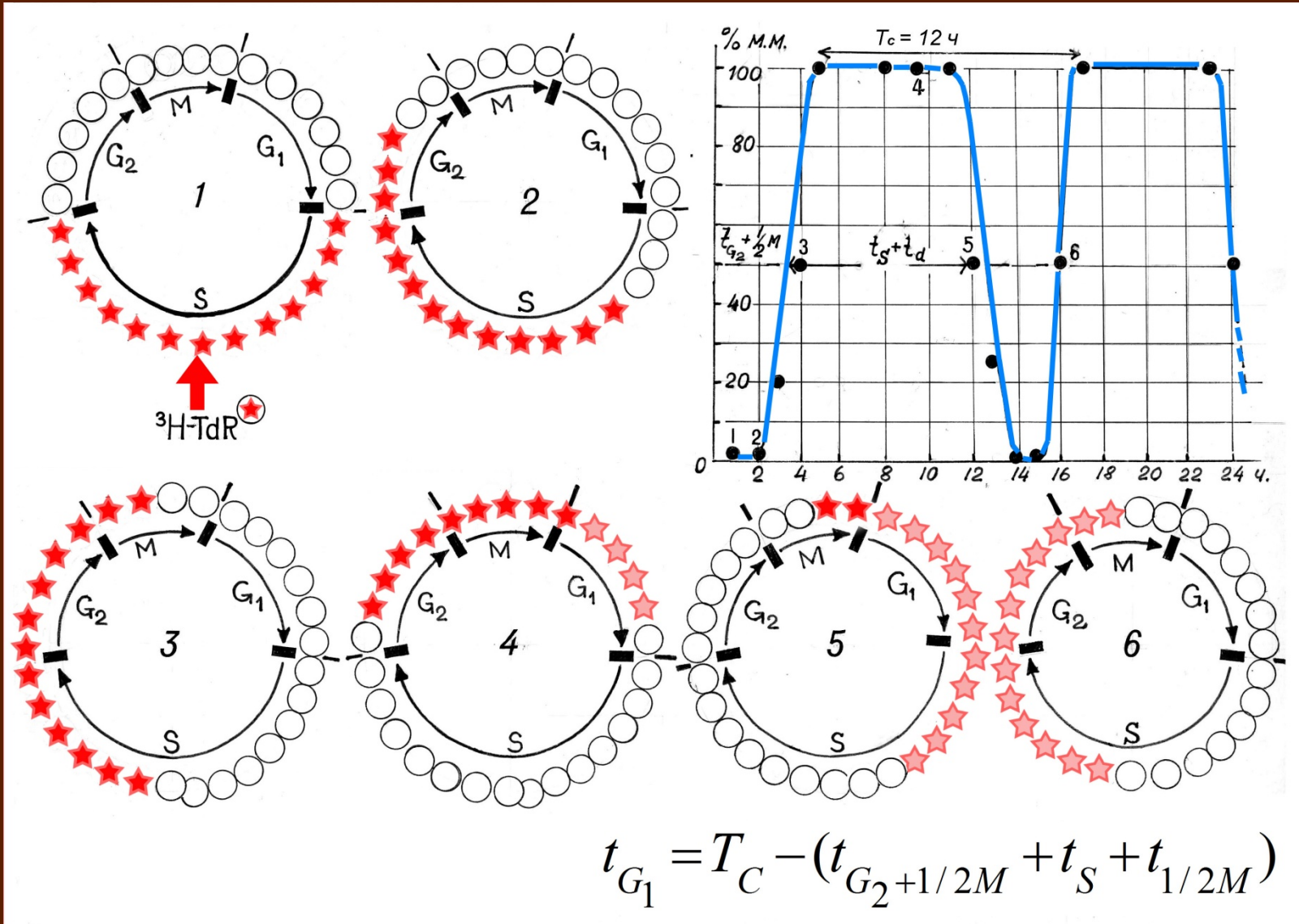
Схема митотического (клеточного) цикла, принятая после открытия Говард и Пелка в 1953 году

Два способа маркирования клеток популяции $^3\text{H-Tdr}$

I-й способ – импульсное мечение – заключается в относительно кратковременной (короче длительности S-фазы) экспозиции популяции в условиях доступа ^3H -тимидина. При этом метятся только клетки, находящиеся в S-фазе, так как тимидин включается в молекулу ДНК только во время её синтеза.

II - й способ непрерывного мечения или насыщения. Этот вариант предполагает длительное (равное или продолжительнее длительности митотического цикла) нахождение популяции в среде с ^3H -тимидином; при этом метятся все клетки популяции, способные к пролиферации, т.е. проходящие митотический цикл.

Кривая меченых митозов (кривая Квастлера). (импульсное мечение)

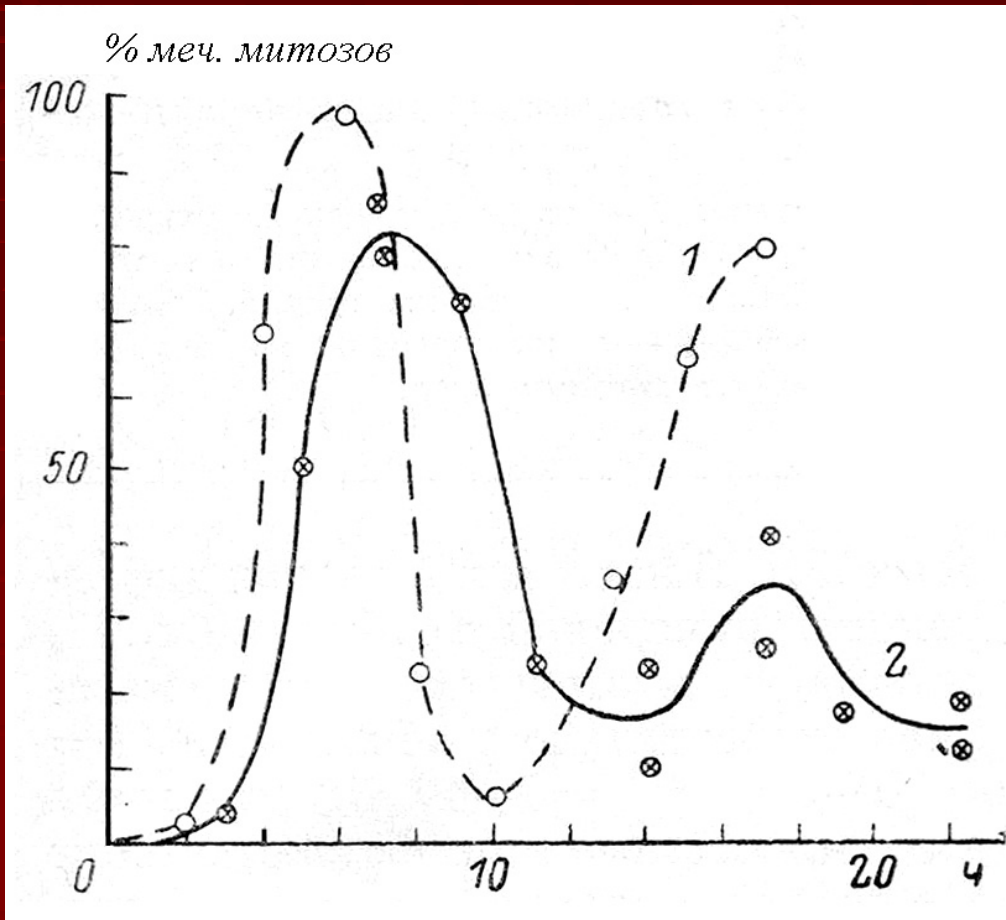


Пояснения к предыдущему слайду (кривая Квастлера)

Представленная трапециевидная кривая отражает изменения количества меченых митозов среди всех митозов (меченых и немеченых) в ходе эксперимента с импульсным мечением. На графике в правом, верхнем углу слайда *ордината* – процент меченых митозов (*мм*); *абсцисса* – время после импульса $^3\text{H-Tdr}$. Голубым цветом представлена динамика, собственно. На основном поле слайда показаны последовательные «перемещения» меченых клеток (красные звездочки) по митотическому циклу. В первой позиции мечены только клетки, находящиеся в S-фазе; во второй позиции часть клеток, содержащих метку, вышла из S в G_2 , но меченые клетки ещё не появились в митозе, поэтому на графике голубая линия на нуле. В позиции 3 некоторые содержащие метку клетки уже добрались до митоза; это показано цифрой 3 на голубой кривой. В 4-й позиции все 100% митозов мечены, это видно по максимальному уровню голубой кривой (вершина трапеции). В последующем, по мере прохождения митоза маркированными клетками, их процент будет снижаться, о чем свидетельствует голубая кривая.

А теперь попытайтесь самостоятельно разобраться, почему на графике показана вторая трапеция, и как эти графические данные используют для определения длительности основных фаз митотического цикла. В качестве подсказок можете воспользоваться стрелками с указателями временных значений некоторых фаз цикла.

Реальные кривые меченых митозов



Динамика доли меченых митозов в развивающейся нейральной трубке куриного эмбриона в условиях *in vitro*. (1) — стадия головного отростка (21 час инкубации); (2) — стадия 25 пар сомитов (55 часов инкубации).

Абсцисса — время после помещения на среду с $^3\text{H-Tdr}$; ордината — процент меченых митозов.

ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ НЕОДНОРОДНОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

Фракция роста

Состояние пролиферативного покоя клетки.

Продолжительность периода G_1 в тканях взрослой мыши

Ткань	Время (часы)
Опухоль Эрлиха	0,0
Эпителий волосяных фолликулов	3,0
Эпителий 12-перстной кишки	4,5
Эпителий подвздошной кишки	9,5
Эпителий роговицы	70,0
Эпидермис уха	528,0

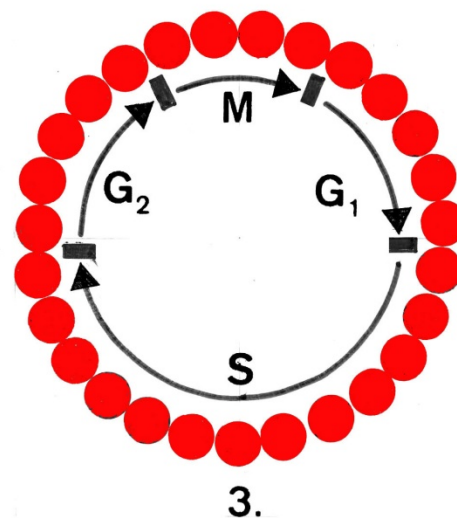
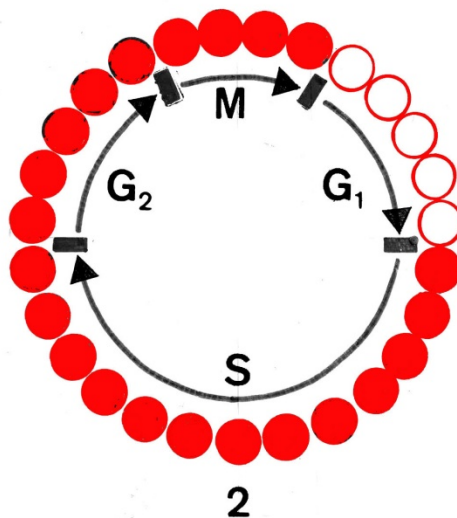
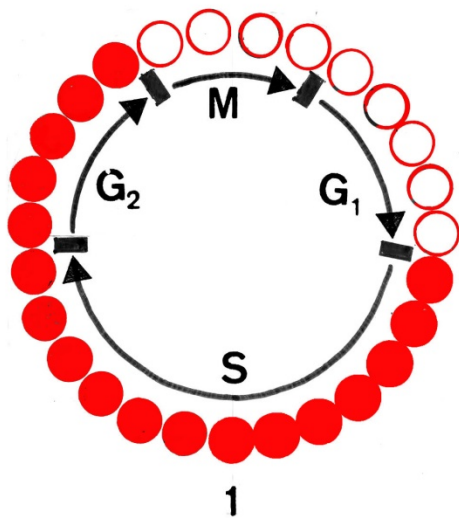
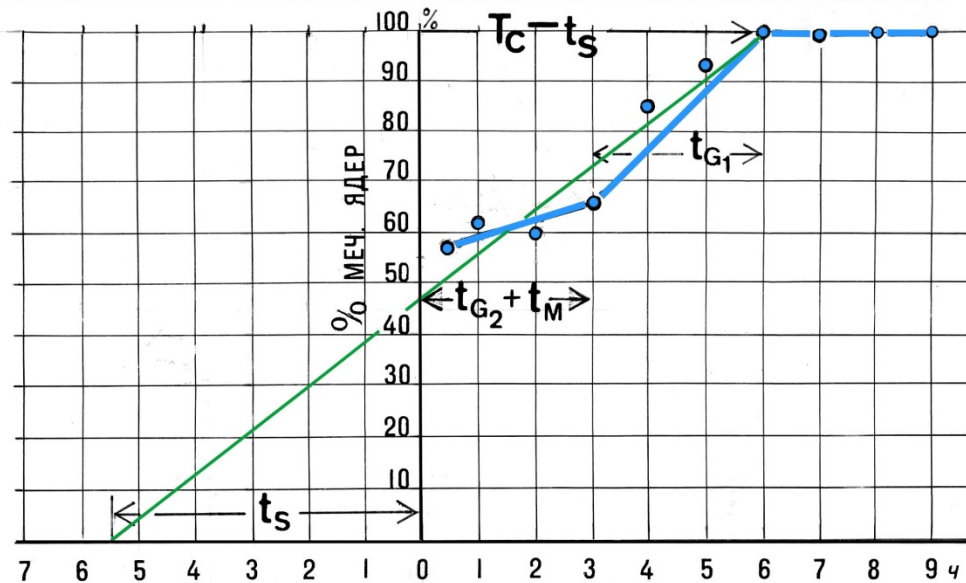
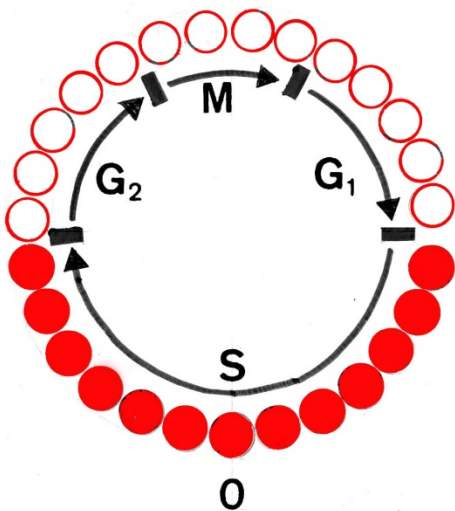
Общие закономерности прохождения клетками митотического цикла и его периодов

В настоящее время митотический цикл проще рассматривать как временной интервал между завершением митоза в исходной клетке и окончанием митоза в её дочерней клетке. Время, затрачиваемое на прохождение одного митотического цикла, получило название времени генерации или генерационного времени. *В физиологическом смысле под митотическим (клеточным) циклом подразумевают последовательность хронологически детерминированных событий, происходящих в клетке при подготовке к делению и в самом митозе.* С течением времени было установлено, что суммарная длительность периодов S, G₂ и M в дефинитивных клеточных системах остается фактически неизменной, а вариабельность митотического цикла (MT) определяется, главным образом, продолжительностью пресинтетического периода G₁, которая может колебаться в разных тканях в очень широких пределах (от 0 часов до нескольких месяцев, см. слайд – таблицу). Более того, последнее из приведенных значений уже на заре изучения кинетики пролиферации представлялось явно абсурдным. Со временем встал вопрос, связаны ли подобные результаты с погрешностями техники исследования или отражают особенности пролиферативного процесса в системе.

Открытие периода пролиферативного покоя (G_0)

Дальнейшее усовершенствование метода радиоавтографии позволило не только разрешить научную интригу, но и по новому представить себе сложную композицию пролиферации в популяциях. К началу 60-х годов прошлого столетия был разработан метод, позволяющий выявлять гетерогенность клеточных популяций по их способности к прохождению митотического цикла. Этот метод, представляющий разновидность тимидиновой радиоавтографии, принципиально отличался от широко используемого метода Квастлера. В его основе лежало создание для изучаемой клеточной совокупности условий непрерывного мечения (т.е. условий, при которых тимидин оказывался доступен клеткам в течение продолжительного времени, равного или превышающего длительность клеточного цикла). Поэтому за ним закрепилось название «*метода насыщения*». В таких условиях к клеткам, находящимся в исходный момент времени в S фазе и, следовательно, включившим метку, непрерывно присоединяются новые клетки по мере вхождения их в период репликации ДНК. При этом происходит, именно, насыщение популяции клетками с мечеными ядрами. На автографах подсчитывают последовательно возрастающую со временем долю клеток, содержащих метку. Кривые насыщения имеют вид, показанный на графиках (слайд ы 35, 37).

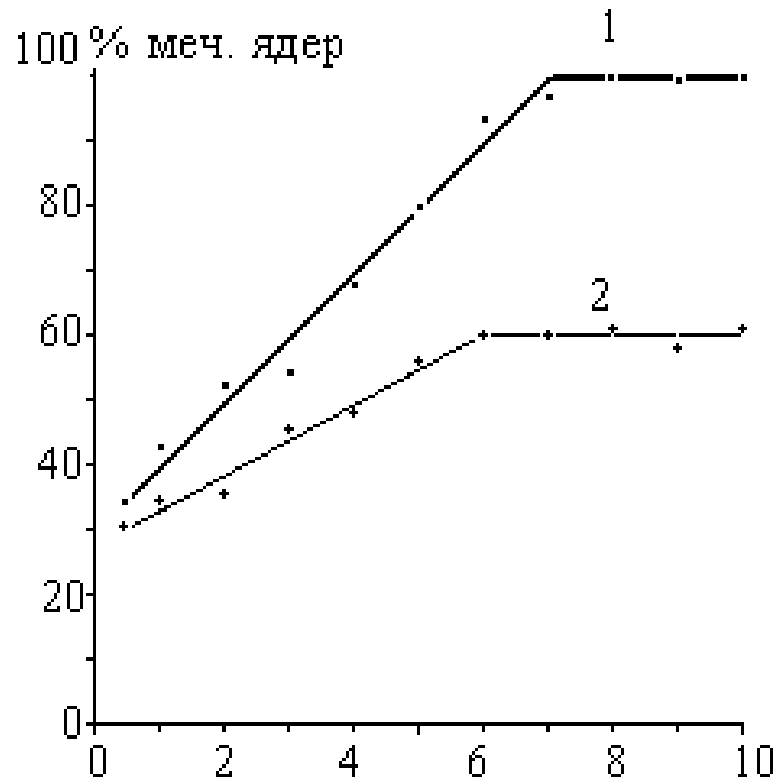
Кривая «насыщения» (теория метода)



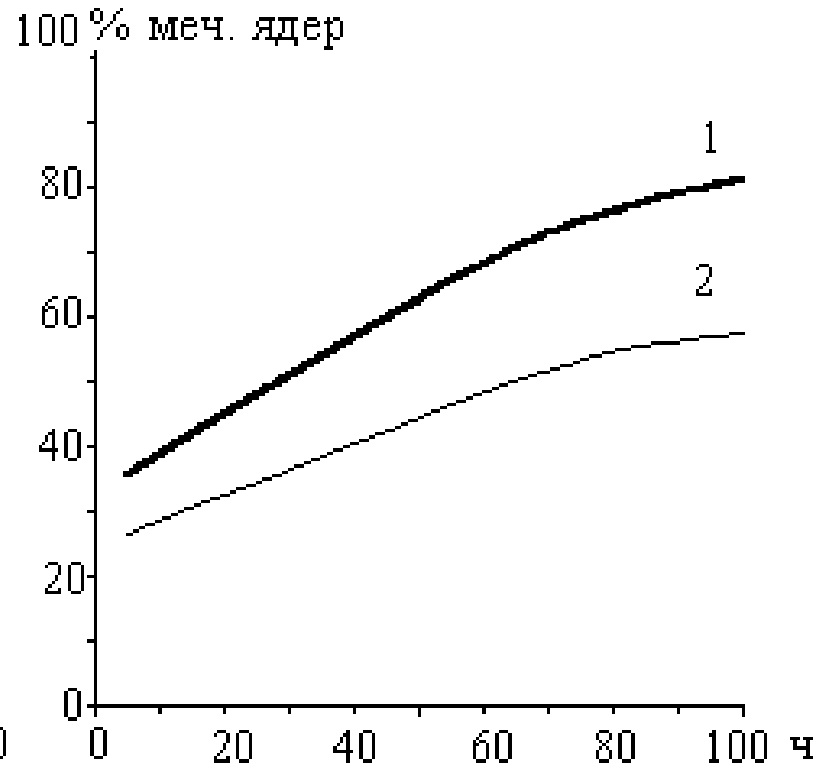
Пояснения к предыдущему слайду «Кривая насыщения»

Создание условий непрерывного длительного (продолжительнее генерационного времени) мечения позволяет выявить в популяции клетки, неспособные к репликации ДНК, и к прохождению митотического цикла. На рисунке схематически показано поведение популяции клеток в условиях «насыщения» и график изменения относительного количества меченых радиоактивным тимидином ядер (красные кружки). При этом не анализируют изменение фракции митозов, а оценивают увеличение относительной доли меченых ядер (митозов и интерфаз) во всей совокупности клеток. Здесь в **нулевой** позиции зафиксирована популяция в самом начале эксперимента; меченые клетки в ней сосредоточены исключительно в фазе синтеза ДНК. В позиции **1** к уже маркированным клеткам прибавились, клетки, перешедшие из G_1 в S , тогда как наиболее «быстрые» из числа бывших в S вступили в состояние G_2 . Естественно, что общее количество меченых клеток увеличилось, и это показано на графике. Прибавление относительного количества меченых клеток будет продолжаться до тех пор, пока либо через S не пройдут все клетки популяции, или до момента, когда в популяции иссякнут клетки, ещё способные входить в S и метиться. И в том и в другом случае кривые на графиках будут выходить на плато. Интерпретацию хода кривой на графике провести самостоятельно.

Кривые «насыщения»



А



В

Кривые насыщения в эпибласте (1) и эндобласте (2) куриных эмбрионов ранних стадий (А); клеток печени (1) и эпидермиса уха (2) у взрослых мышей (В).

В экспериментах с «насыщением» выявились три варианта результатов. Очень часто, особенно при изучении клеточных популяций ранних эмбрионов, кривая насыщения через время меньше, чем длительность митотического цикла, достигает плато на 100-процентном уровне. Очевидно, что такая ситуация возможна только, если все клетки данной совокупности пролиферируют, т.е. проходя митотический цикл, синтезируют ДНК и затем делятся митозом. В таких случаях говорят, что **пролиферативный пул** (отношение пролиферирующих клеток ко всей популяции) **равен 1** или 100 % (кривая на слайде 37А-1). Но иногда кривые выходят на плато на более низком уровне, что означает, что в данном случае имеется некая фракция, клетки которой не в состоянии войти в S-фазу и пометиться (Слайд 37А-2). Это свидетельствует о гетерогенности изучаемой популяции, пролиферативный пул которой оказывается меньше 1. На слайде 37В показаны кривые насыщения которые в течение очень длительного времени демонстрируют едва заметную поступательную динамику, но на плато не выходят даже в очень продолжительных экспериментах с непрерывным мечением. Интерпретация результатов подобных экспериментов оказалась неоднозначной и вызвала яростные споры.

В 1963 году было впервые высказано предположение, которое оказалось в состоянии объяснить подобный характер кривых насыщения. Лайта (Lajtha, 1963) и Квастлер (Quastler, 1963) независимо друг от друга пришли к заключению, что по окончании митоза клетка не обязательно должна вступать в G_1 следующего митотичес-

кого цикла, но может выйти в особое состояние «вне цикла» или фазу G_0 . Оба исследователя считали, что клетки могут находиться в этом состоянии «пролиферативного покоя» длительное время, сохраняя при этом способность вернуться в митотический цикл и пройти митоз.

Идея о возможном временном выходе клеток из МЦ у Квастлера была, по-видимому, плодом гениальной догадки или следствием из ранее высказанного им же предположения, согласно которому по окончании митоза клетка оказывается перед выбором, продолжить ли ей путь к очередному делению или приступить к дифференциации. Последующая судьба клетки зависит, таким образом, от того, какое решение будет ею принято. Квастлер не успел развить эту идею, поскольку в том же 1963 году его не стало. Убедительные доводы в пользу перехода клеток в фазу G_0 были представлены Лайта, который по праву считается автором этого открытия. Наличие лаг-периода и кумулятивный характер кривых нарастания индексов меченых клеток и митотического типичны для стимуляции (а иногда и для индукции) пролиферативных процессов. Лайта по характеру поведения клеток, стимулированных к пролиферации, сумел угадать их

Анализ покоящихся клеток (клеток вне цикла) непосредственно в тканях целого организма затруднён, поскольку, как правило, все они рассеяны среди пролиферирующих клеток и практически не отличаются от них по морфологическим признакам. *Стволовые клетки*, которые пребывают в состоянии пролиферативного покоя значительную часть своей жизни, составляют лишь небольшую долю клеточных популяций. Основная же масса покоящихся клеток во взрослом состоянии выполняет многочисленные специфические функции. Не следует забывать также, что в системе целого организма клетка испытывает *разнообразные влияния* со стороны окружения, учесть все из них просто не возможно. Последнее обстоятельство является едва ли не главным препятствием для применения ряда экспериментальных воздействий (в частности *митогенной стимуляции*) при изучении клеток в R-периодах.

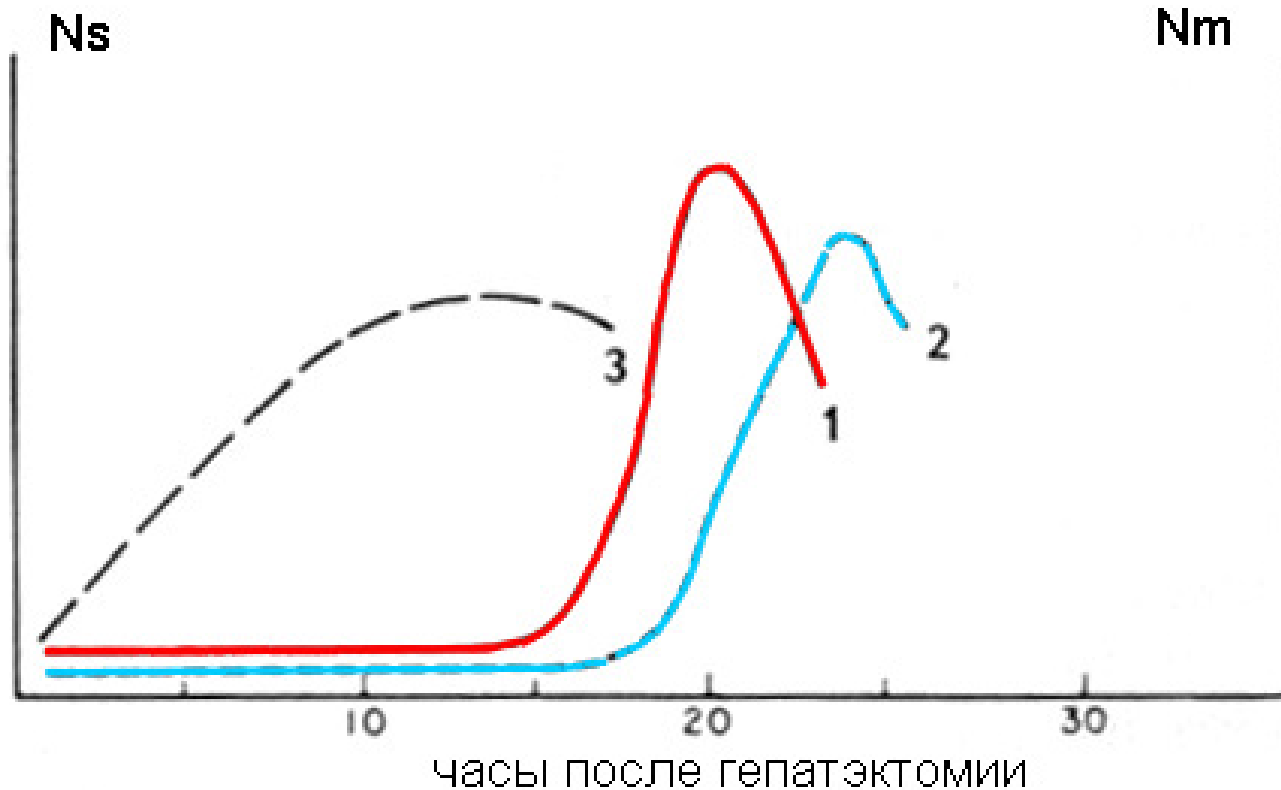
В значительной степени благодаря названным обстоятельствам, в 60-е начались активные поиски клеточных систем, несущих признаки покоящихся популяций. Среди тканей *in vivo* наиболее удобными в этом отношении оказались уже упоминавшиеся *гепатоциты* регенерирующей печени, *клетки кроветворной системы* млекопитающих, обработанные митогенами, а также культивируемые *in vitro* клетки разнообразных гистодифференцировок.

Так. основные положения своей гипотезы Лайта получил в работе по изучению особенностей пролиферации клеток печени в ходе её репарации после удаления значительной части этого органа. Хорошо известно, что печень в обычных условиях –

– орган с крайне низким уровнем пролиферации – отличается своей необыкновенной способностью к быстрой регенерации после частичной гепатэктомии. Лайта показал, что приблизительно через 15 часов после операции в оперированной печени обнаруживается резкий подъём индекса меченых ^3H -тимидином ядер гепатоцитов, что свидетельствовало о начале в них репликации ДНК (слайд). Этот период длился 7-8 часов. После короткой (2-3 часа) фазы G_2 эти клетки вступали в митоз, что отражено на графике в виде пика митотического индекса. Если бы в МЦ гепатоцитов был очень длинный G_1 (порядка нескольких месяцев), как считали ранее, и, если бы он просто сокращался до 15 часов при репарации, то должно было бы иметь место немедленное и постепенное увеличение числа ядер, синтезирующих ДНК. Поскольку в реальной ситуации так не происходит, а всегда отмечается отчетливый лаг-период, то предположение о том, что клетки к моменту гепатэктомии вообще не были в цикле, кажется вполне правдоподобным.

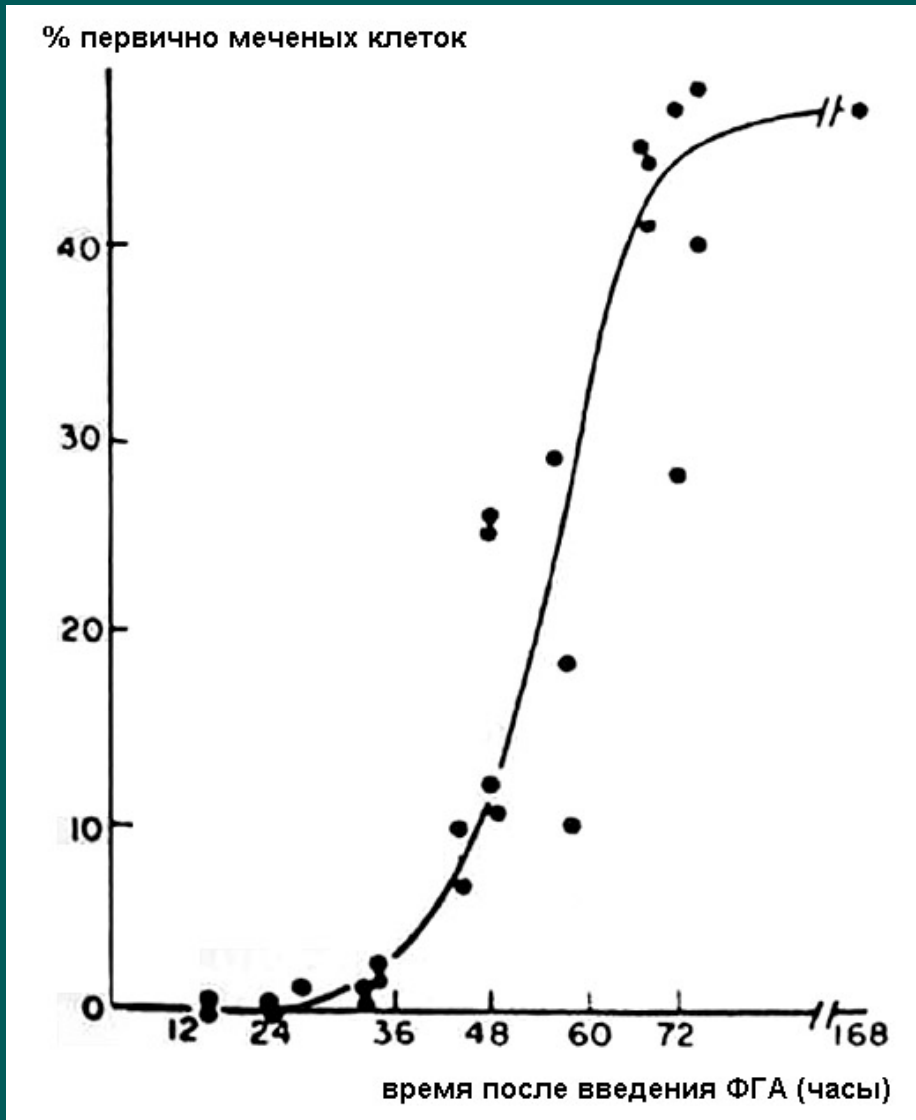
Итак, наличие лаг-периода и кумулятивный характер кривых нарастания индекса меченых клеток и митотического индекса типичны для стимуляции (а иногда и для индукции) пролиферативных процессов. Лайта по характеру поведения клеток, стимулированных к пролиферации, сумел угадать их предшествующее состояние. Поэтому его заключение о способности клеток выходить по окончании митоза из цикла в состояние покоя, получило широкое признание, а символ (G_0) вошел в азбуку учения о клеточном цикле.

Пролиферация в печени мыши после частичной гепатэктомии (по данным Lajtha, 1963)



N_s – индекс первично меченых ядер (красная кривая 1), N_m – митотический индекс (голубая кривая 2) при выходе клеток в цикл из состояния пролиферативного покоя; пунктирная кривая 3 – результат нарастания N_s при предположительном сокращении длительности клеточного цикла.
(Из Епифанова, 1997)

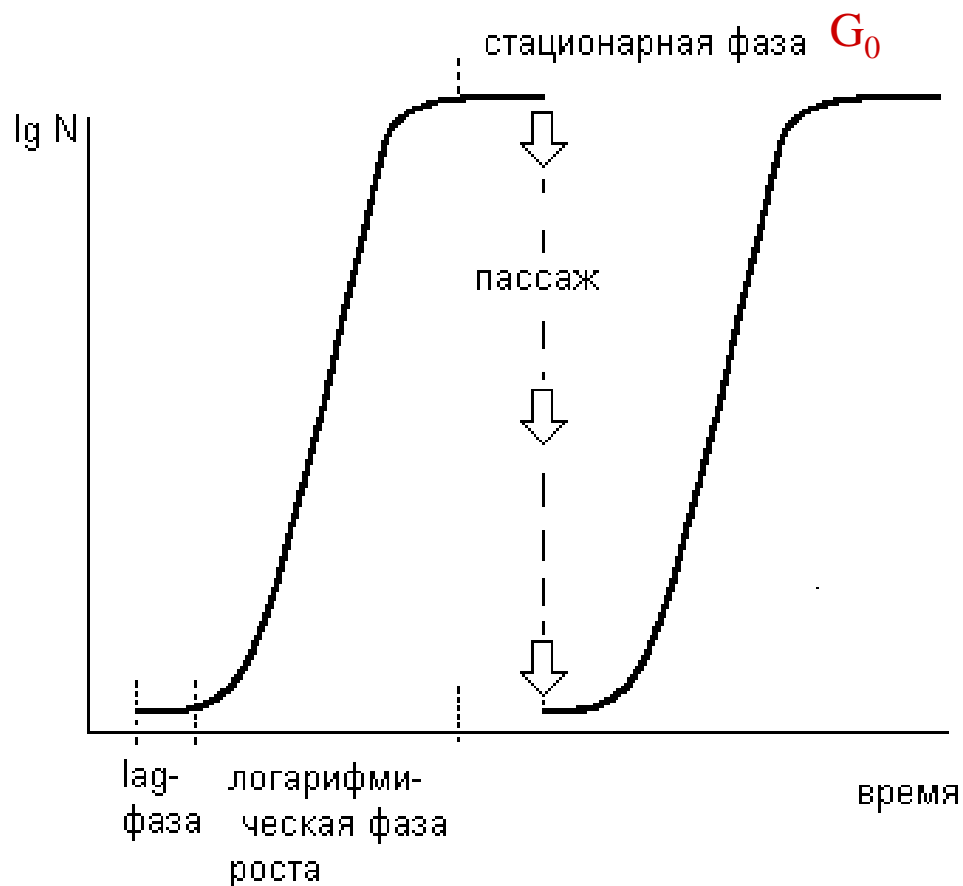
Индукция пролиферативных процессов



Кумулятивный (накопительный) характер кривой, отражающей вступление в фазу репликации ДНК лейкоцитов периферической крови человека после стимуляции пролиферации с помощью введения *фитогемагглютинина (ФГА)*.

^3H -тимидин добавлялся в среду за 2 часа до фиксации клеток

Увеличение числа клеток в условиях культивирования *in vitro*



Митотический цикл и состояние пролиферативного покоя

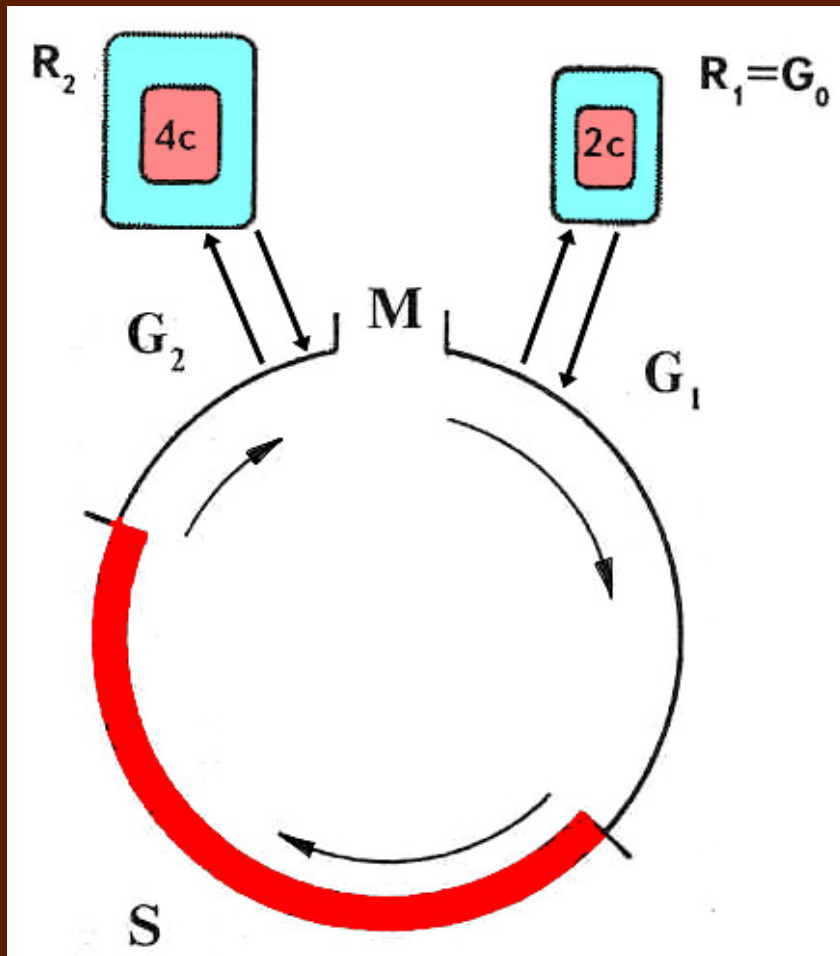
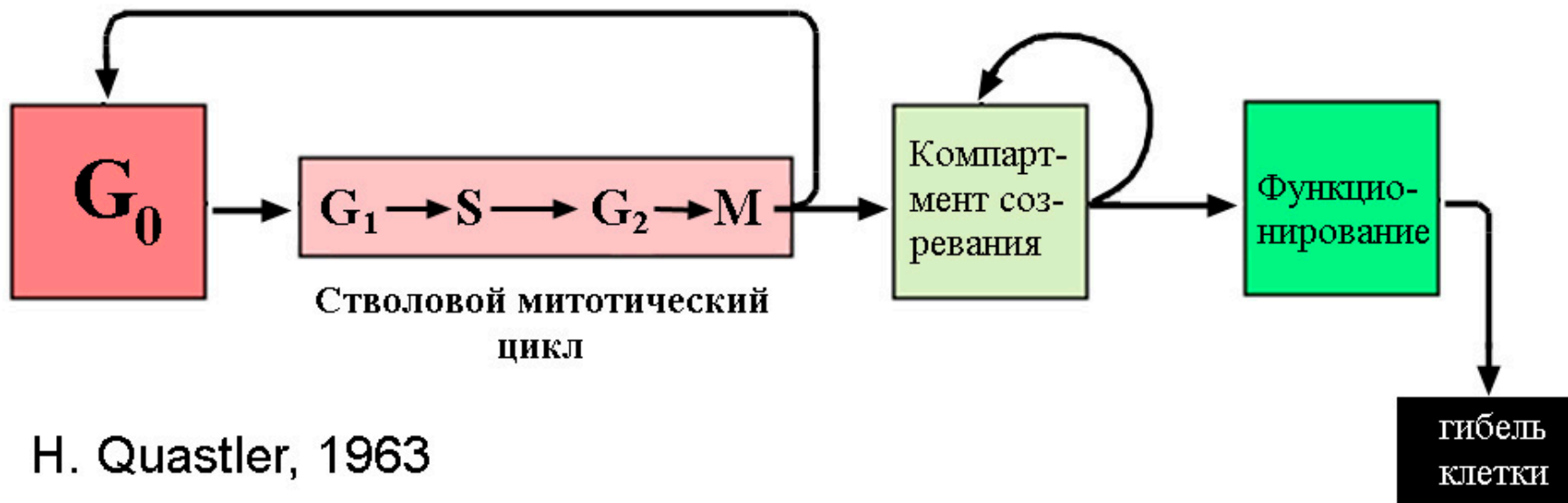
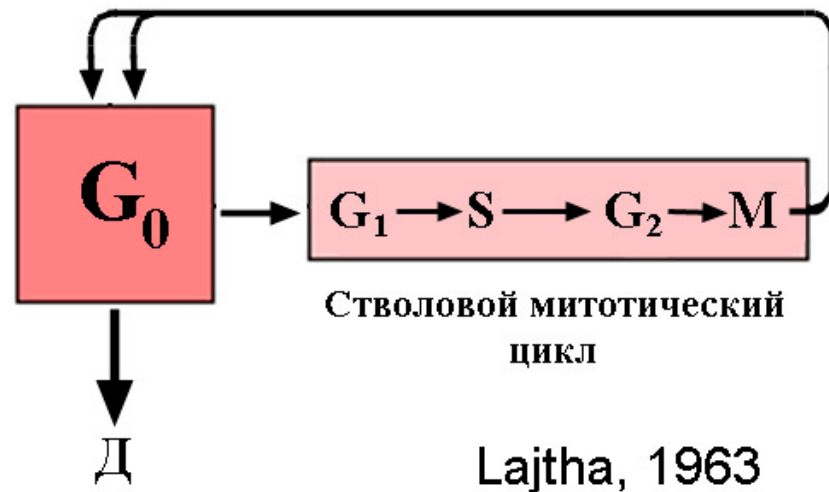


Схема чередования периодов активной пролиферации (G₁, S, G₂ и M) и состояний пролиферативного покоя (R₁ и R₂) после опубликования работ Гелфанта (Gelfant, 1963, 1967)

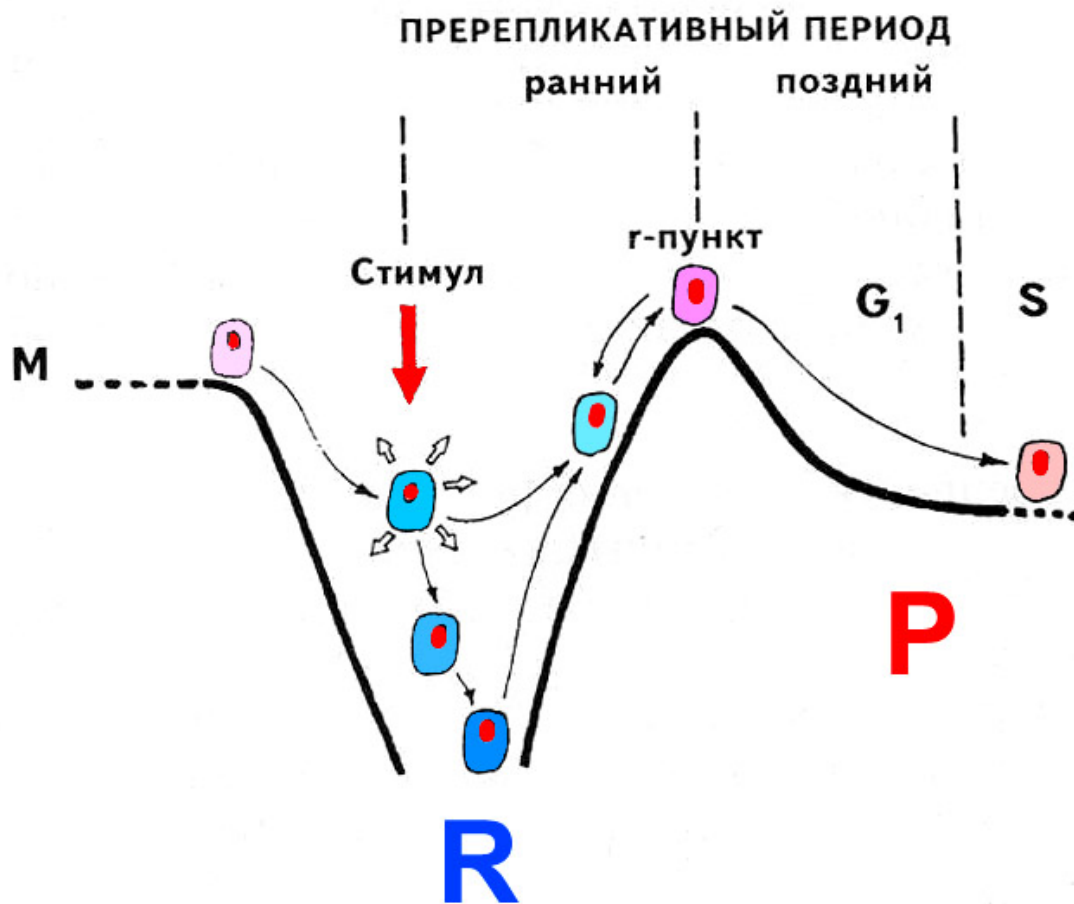
2с – количество ДНК, соответствующее диплоидному набору хромосом; 4с – удвоенное количество ДНК в фазе G₂.



Стволовой отдел
 и
 обновление популяций



Пролиферация, покой и пререпликативный период



События при переходе клетки из состояния покоя (R) к пролиферации (P).
r-пункт (*restriction point*) – рубеж необратимости, контурные стрелки – *плейотипический ответ* на стимул.

Изменения клетки в пререпликативном периоде

Пролиферативные стимулы вызывают в покоящихся клетках (G_0) серию быстрых множественных структурных и функциональных изменений (*плейотипический ответ*).

Ранний пререпликативный период:

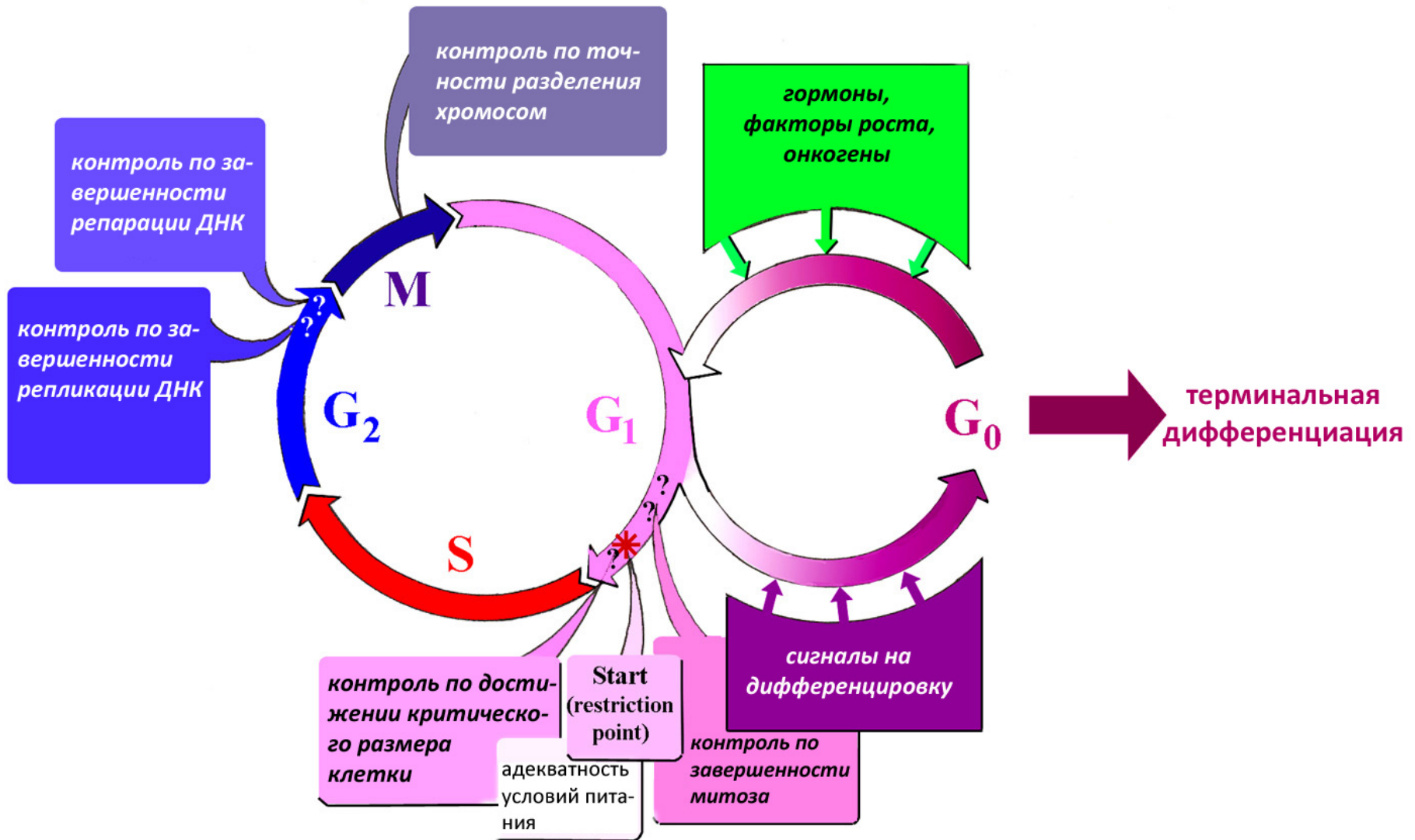
1. усиление транспорта низкомолекулярных соединений через плазматическую мембрану клетки (характерно для раннего ПП);
2. транзиторную активацию синтеза отдельных видов мРНК и белков.

Эти изменения в стимулированной клетке происходят до определенного момента - **пункта необратимости** (restriction point), пройдя который клетка становится необратимо коммитированной к репликации ДНК.

Поздний пререпликативный период:

3. Вторичное усиление общего синтеза РНК и белков, в том числе инициаторов репликации ДНК

Эндогенный и экзогенный контроль пролиферации

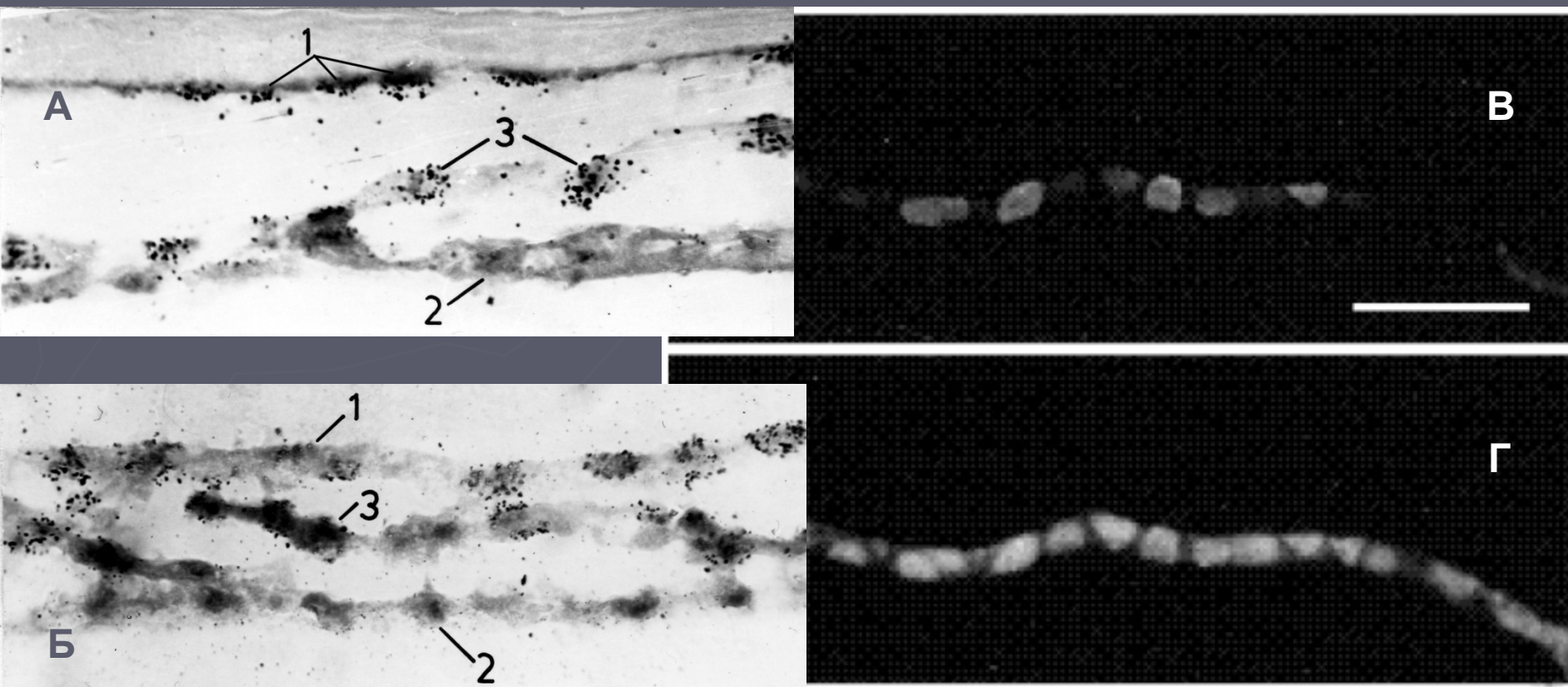


Современные методы оценки митотических циклов и пролиферативного статуса клеточных популяций

(продолжение)

В настоящее время метод тимидиновой автордиографии, так много давший в прошлом веке для формирования представлений о митотическом цикле и кинетики клеточной репродукции, в силу присущей ему технической сложности, вызванной необходимостью применения радиоактивных изотопов, уступил свои ведущие позиции другим методикам. При этом разработанные в эпоху тимидиновой автордиографии принципы кинетического анализа в основе своей сохранились неизменными. Среди методов, обретших ныне популярность следует назвать прежде всего технику ядерного включения специфического (как и тимидин) предшественника ДНК – бромдезоксимуридина (BrdU), выявляемого иммуноцитохимически на срезах тканей.

В 80-х годах прошлого века был описан ядерный антиген пролиферирующих клеток [proliferating cell nuclear antigen, (PCNA)], высоко консервативный белок, синтезирующийся только в клетках, коммитированных к синтезу ДНК. Цитохимически PCNA выявляется только в позднем G₁ и S фазе и поэтому может быть использован как естественный маркер клеток, проходящих митотический цикл, и следовательно рассматриваться как средство визуализации клеток, способных к пролиферации (пролиферативного пула). См. следующий слайд 42.



Методы, основанные на маркировании клеток в фазе синтеза ДНК (S).

(А и Б) $^3\text{H-TDR}$ -радиоавтографы срезов маргинальной зоны бластодермы куриного эмбриона на стадии 5 (А – через 0,5 часа, Б – через 6 часов после инъекции тимидина).

1, 2, 3 – эктодерма, энтодерма и мезодерма, соответственно.

(В) Срез через боковую область бластодермы куриного эмбриона на стадии 5, который 2 часа экспонировался с BrdU, окрашено с помощью иммунофлуоресцентного метода.

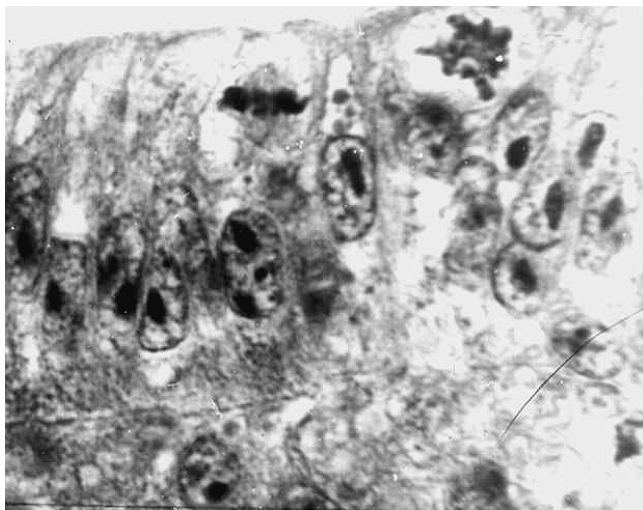
(Г) Срез, окрашенный антигеном пролиферирующих клеток (PCNA) с помощью антител, меченых родамином.

Аналитические возможности статмокинетического метода определения пролиферативной активности

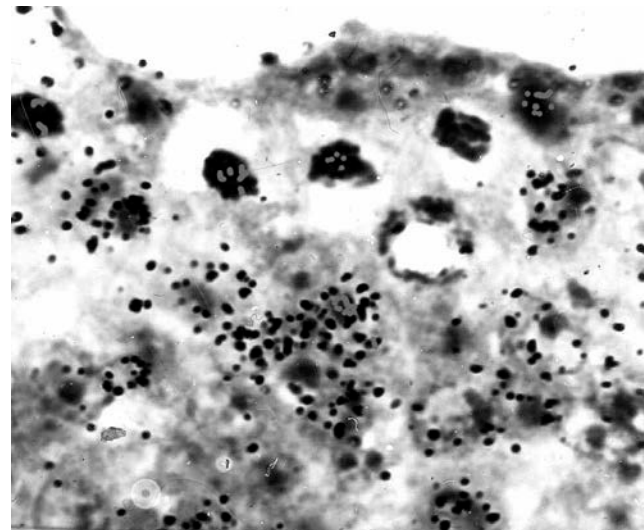
- ▶ Метод основан на блокировании физическим или химическим способом клеток в митозе.
- ▶ Проходя все другие фазы МЦ, клетки утрачивают способность завершать митоз из-за отсутствия митотического веретена и накапливаются в особом состоянии так называемом *k-митозе*.
- ▶ Скорость накопления клеток в заблокированном состоянии отражает интенсивность вступления клеток в митоз (пролиферативную активность) и пролиферативный статус популяции
- ▶ Кроме того, измеряя время исчезновения в системе фаз нормального митоза (начиная с поздней телофазы), можно получить информацию о продолжительности митоза, собственно.

Химический способ блокирования клеток в митозе

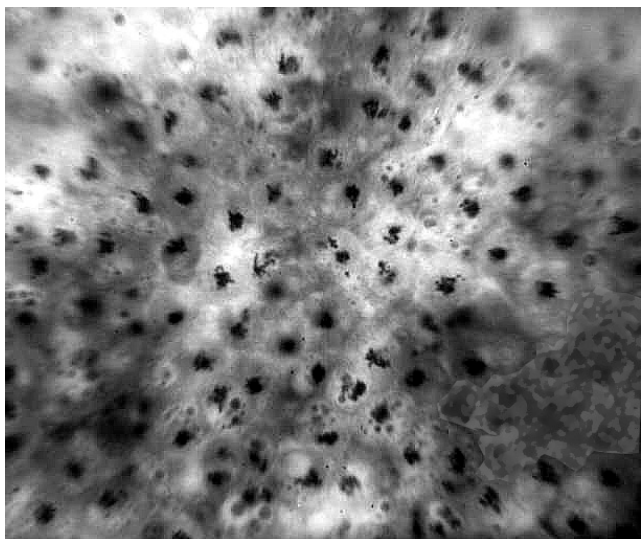
А



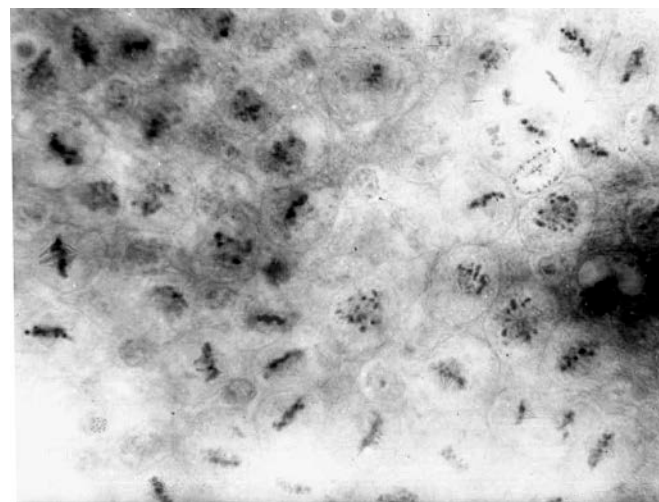
Б



В



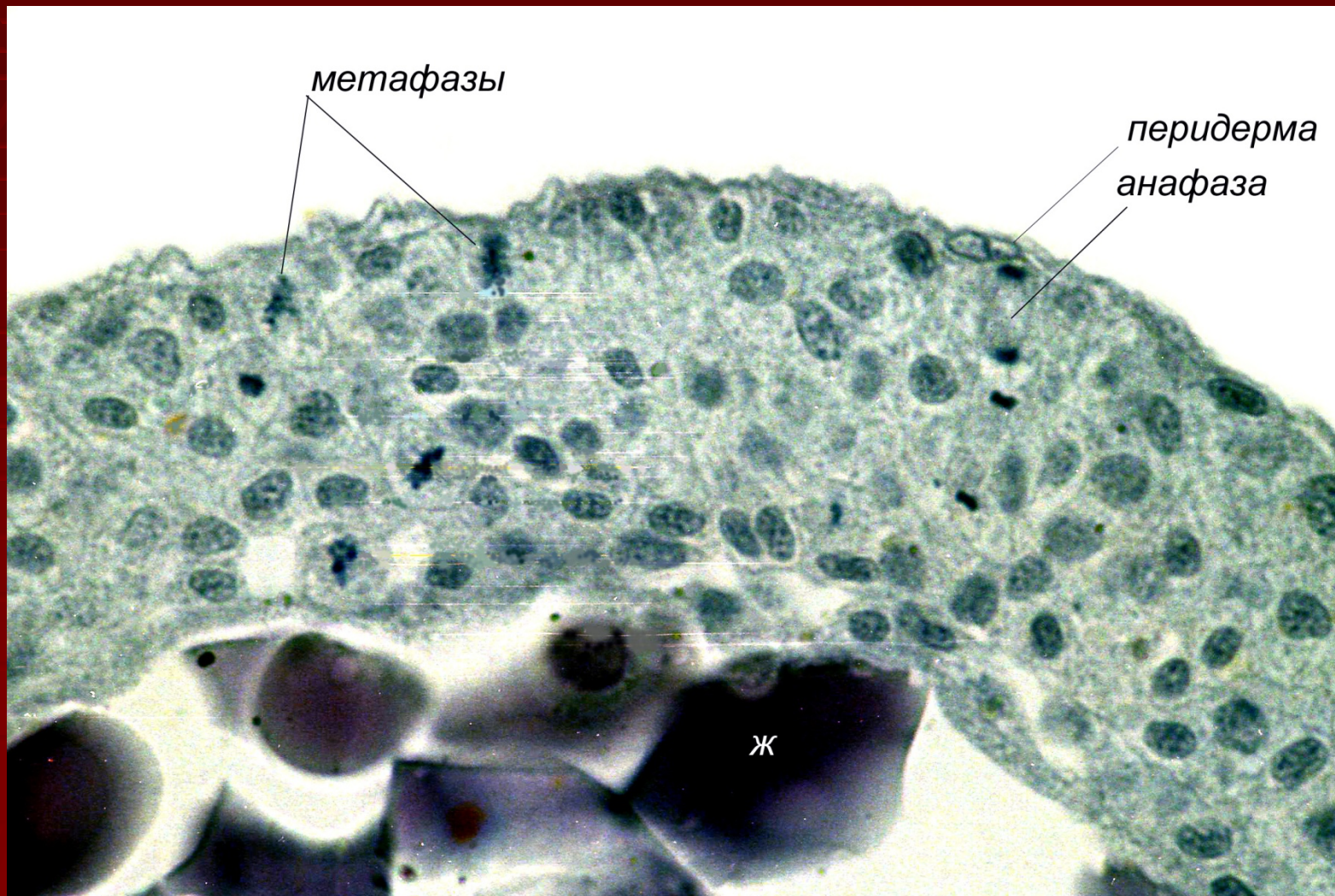
Г



Пояснения к предыдущему слайду «Химический способ блокирования клеток в митозе»

А. Нативные популяции эпибласта и мезобласта в первичной полоске куриного эмбриона 20 часов инкубации. В эпибласте хорошо видны нормальные метафазные пластинки с митотическим веретеном и интерфазные ядра. **Б.** Радиоавтограф среза через область первичной полоски куриного эмбриона после введения под бластодерму смеси ^3H -тимидина и колцемида (синтетический аналог колхицина). В апикальных участках эпибласта хорошо видны к-митозы (в виде компактных скоплений гиперконденсированных хромосом) и интерфазные ядра, содержащие метку. **В.** Тотальный препарат 20-часовой бластодермы куриного эмбриона после 8-часовой экспозиции с колцемидом. Все 100% клеток находятся в состоянии к-митоза. **Г.** Тотальный препарат блокированной бластодермы, но через 1 час после отмывки от колцемида. Хорошо видны 100 % восстановленные (с нормальным митотическим веретеном) метафазы. Некоторые метафазы развернуты экваториальной пластинкой параллельно плоскости среза, поэтому смотрятся как россыпи мелких гранул (хромосомы).

Нормальные митозы в бластодерме *Danio rerio*

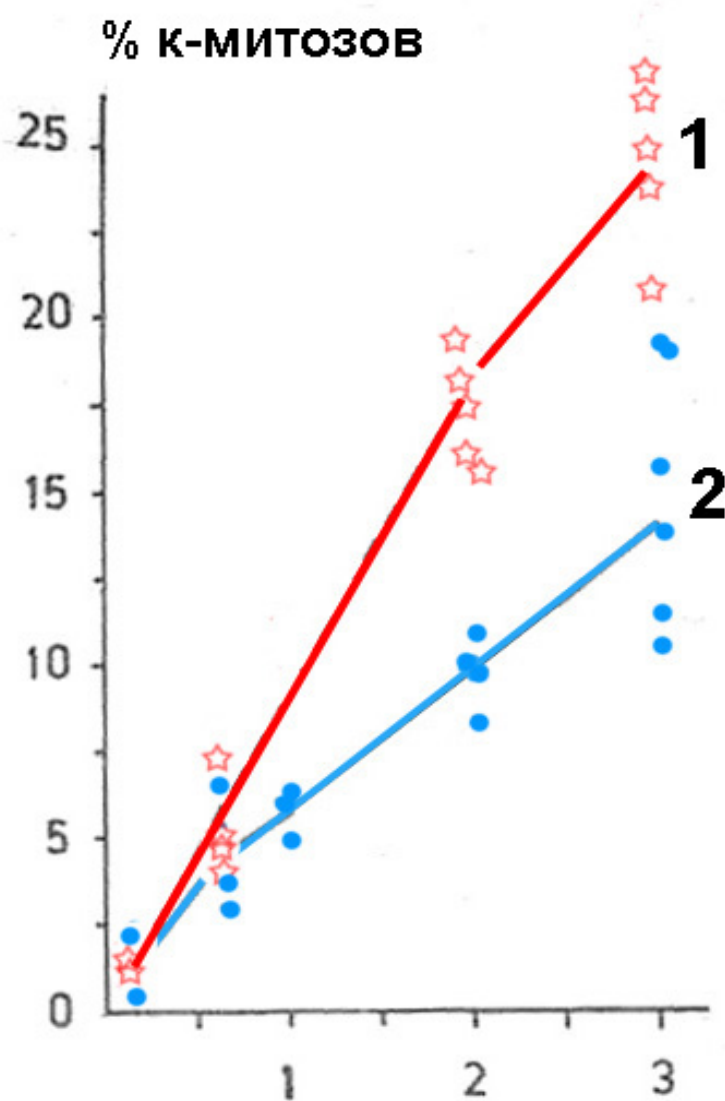


Типичные к-митозы через 30 мин после помещения зародышей *D. rerio* в раствор **нокодазола**



Из Е. Мухачев (2004)

Кумулятивные кривые к-митозов



При химическом блокировании митозов в качестве митостатиков обычно используют разные антитубулиновые агенты (*колхицин*, *колцемид*, *винбластин*, *нокодазол* и т.п.), препятствующие сборке митотического веретена. В статмокинетических исследованиях регистрируют изменение во времени % к-митозов. На графике представлены две кривые накопления к-митозов в мезодерме первичной полоски на стадии 21 ч инкубации (1) и сомитов на стадии 30 ч инкубации (2) после инъекции под бластодерму куриного эмбриона *колцемид*а.

конец презентации

