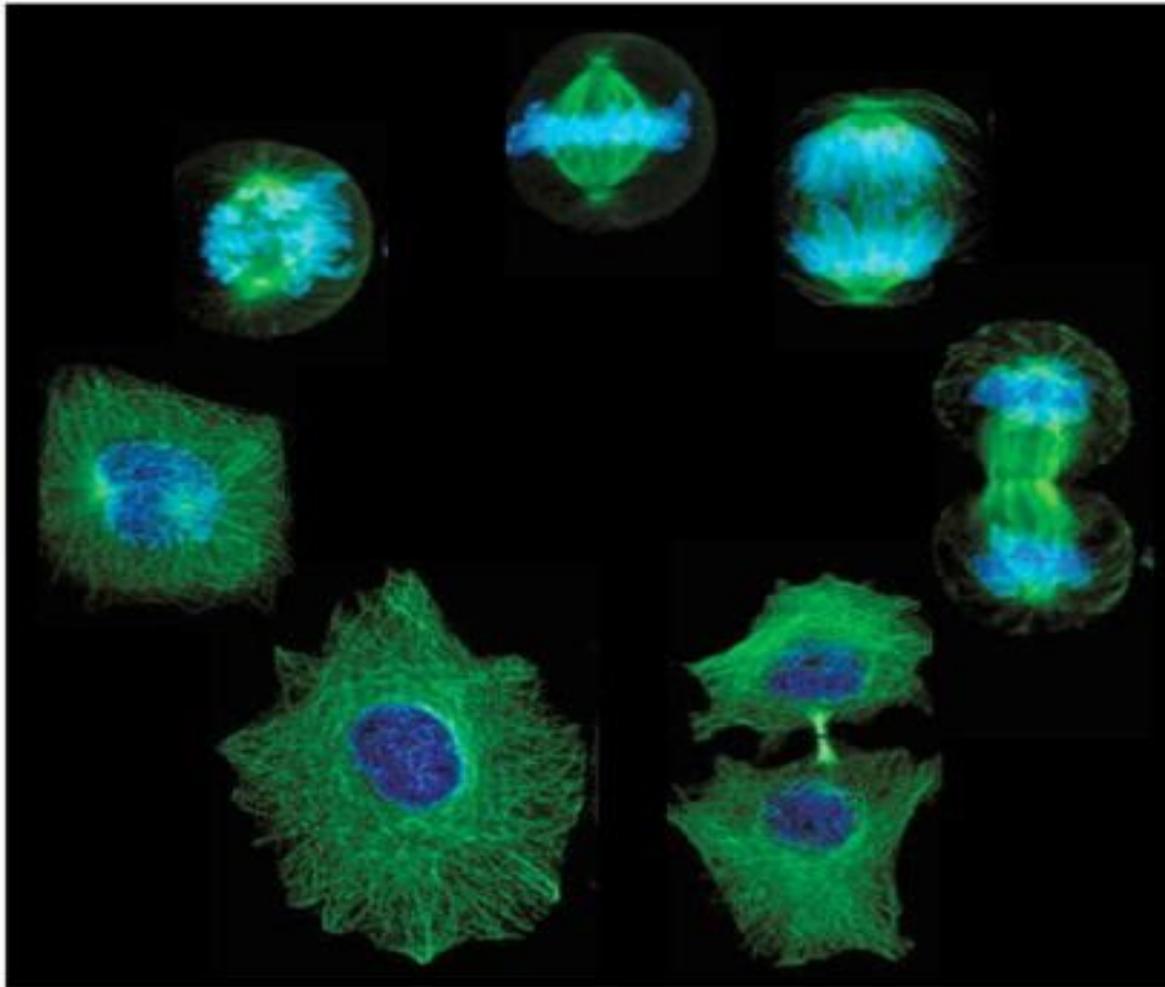


*Зависимость пролиферации от факторов  
среды и синхронизация клеток в культуре*

Выполнил:  
Ломовский А.И.

**Пролиферация** – это размножение клеток, т.е. увеличение числа клеток (в культуре или ткани), происходящее путем митотических делений.

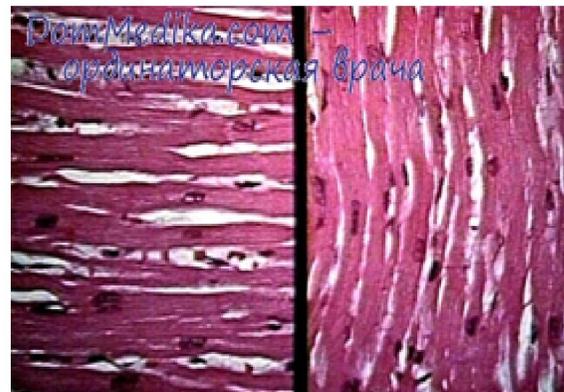


# Клетки органов и тканей имеют не одинаковую способность к делению

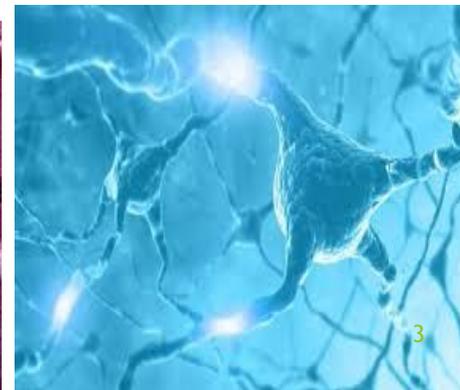
- Встречаются популяции клеток, полностью потерявшие свойство делиться. Это, как правило, клетки, находящиеся на терминальной стадии дифференцировки, например, **зрелые нейроны, кардиомиоциты** (Долгожители, от 10 до 100 лет)
- В организме есть постоянно обновляющиеся ткани - различные типы эпителия, кроветворные ткани. В таких тканях существует популяция клеток, которые постоянно делятся, заменяя погибающие клетки (например, **клетки крипт кишечника (1-2 дня), клетки базального слоя покровного эпителия (время жизни до 2 недель)**).
- Также в организме существуют клетки, которые не размножаются в обычных условиях, но вновь приобретают это свойство при определенных условиях, в частности при необходимости регенерации тканей и органов (**клетки печени и селезенки время жизни таких клеток около года**).



клетки крипт кишечника

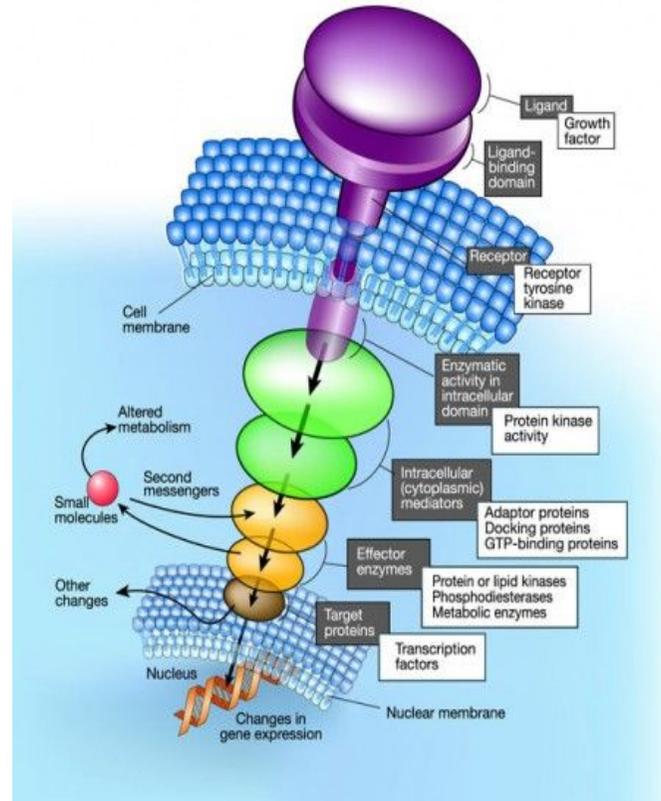


мышечные клетки сердца (кардиомиоциты)



# Активация пролиферации

□ Основную функцию, связанную с инициацией пролиферации, берет на себя плазматическая мембрана клетки. Именно на ее поверхности происходят события, которые связаны с переходом покоящихся клеток в активированное состояние, предшествующее делению. Плазматическая мембрана клеток за счет располагающихся в ней молекул-рецепторов воспринимает различные внеклеточные митогенные сигналы и обеспечивает транспорт в клетку необходимых веществ, принимающих участие в инициации пролиферативного ответа.

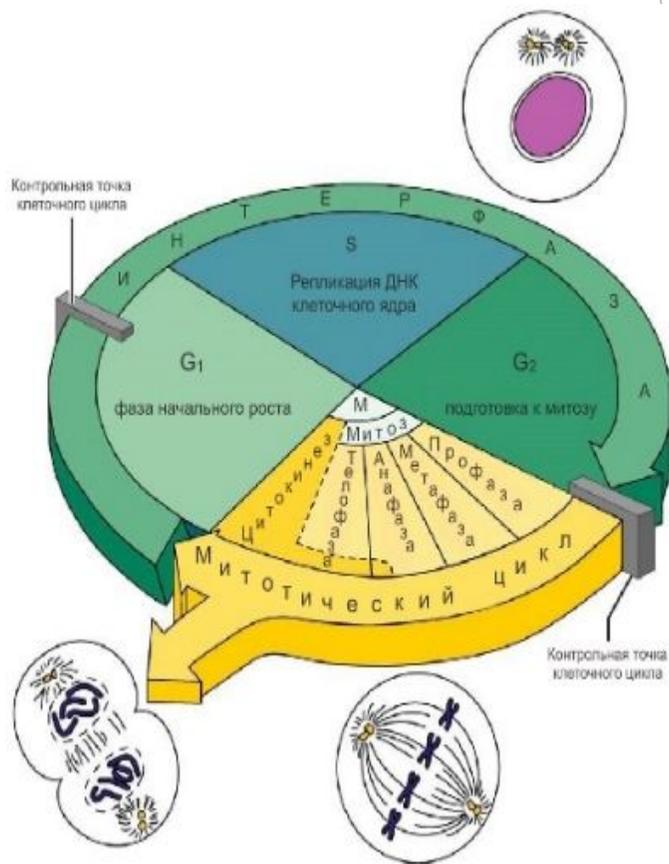


□ Митогенными сигналами могут служить контакты между клетками, между клеткой и матриксом, а также взаимодействие клеток с различными соединениями, стимулирующими их вступление в клеточный цикл, которые получили название факторов роста. Клетка, получившая митогенный сигнал на пролиферацию, запускает процесс деления.

# Клеточный цикл

Весь клеточный цикл состоит из 4 этапов: пресинтетического (G1), синтетического (S), постсинтетического (G2) и собственно митоза (M).

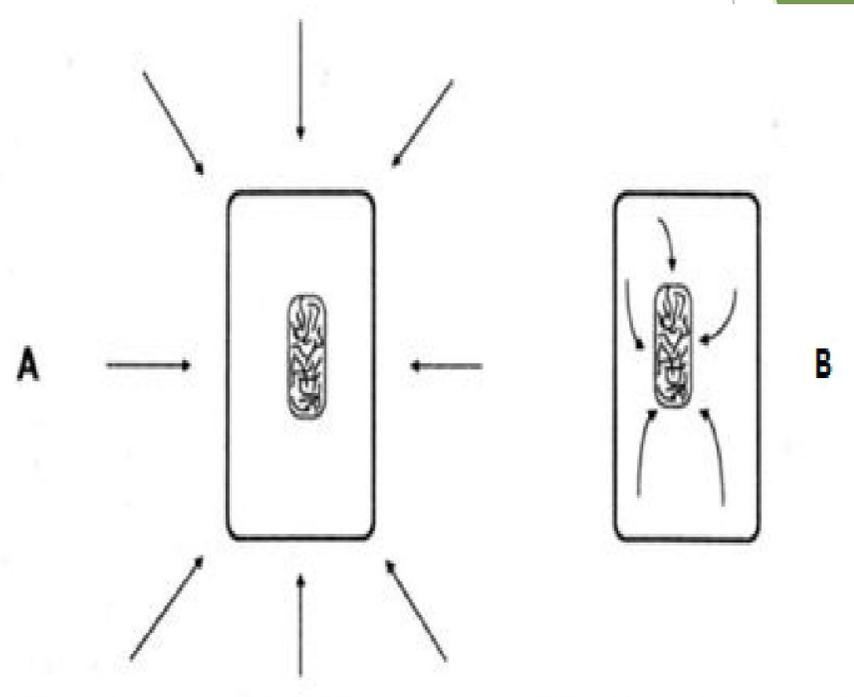
Кроме того, существует так называемый G0-период, характеризующий состояние покоя клетки. В G1-периоде клетки имеют диплоидное содержание ДНК на одно ядро. В этот период начинается рост клеток, главным образом, за счет накопления клеточных белков, что обусловлено увеличением количества РНК на клетку. Кроме того, начинается подготовка к синтезу ДНК. В следующем S-периоде происходит удвоение количества ДНК и соответственно удваивается число хромосом. Постсинтетическая G2 фаза называется также премитотической. В этой фазе происходит активный синтез мРНК (матричная РНК). Вслед за этой стадией следует собственно деление клетки надвое или митоз.



# Регуляция клеточного цикла

В основе регуляции размножения клеток лежит смена состояний активной пролиферации и пролиферативного покоя. Регуляторные факторы, контролирующие размножение клеток можно условно разделить на две группы:

- А. Внеклеточные(экзогенные) -** факторы находятся в микроокружении клетки и взаимодействуют с поверхностью клетки
- В. Внутриклеточные(эндогенные) -** факторы, которые синтезируются самой клеткой и действуют внутри нее.



# Факторы роста и экзогенные регуляторы

- ▶ Быстро нарастает количество работ посвященных очистке, структуре и характеру действия чистых ростовых факторов.
- ▶ К ростовым факторам или митогенам относят вещества пептидной природы, способные стимулировать синтез ДНК непосредственно или в совокупности с другими факторами.
- ▶ Известные ростовые факторы действуют в очень низких концентрациях, обладают высокой специфичностью, обеспечиваемой за счет связывания со специализированными рецепторами.

- ▶ У многоклеточных организмов регуляция пролиферации различных типов клеток происходит вследствие действия не одного какого-либо ростового фактора, а их совокупности. Кроме того, некоторые ростовые факторы, будучи стимуляторами для одних типов клеток, ведут себя как ингибиторы по отношению к другим. Классические ростовые факторы представляют собой полипептиды с молекулярной массой 7-70 кДа.



▶ Большое количество литературы посвящено фактору роста из тромбоцитов (PDGF). Освобождаясь при разрушении сосудистой стенки, PDGF участвует в процессах тромбообразования и заживления ран. PDGF является мощным ростовым фактором для покоящихся фибробластов. Наряду с PDGF, не менее обстоятельно изучен эпидермальный фактор роста (EGF), который также способен стимулировать пролиферацию фибробластов. Но, кроме этого также стимулирующе влияет и на другие типы клеток, в частности на хондроциты.

▶ Большую группу ростовых факторов составляют цитокины (интерлейкины, факторы некроза опухоли, колоние-стимулирующие факторы и т.д.). Все цитокины полифункциональны. Они могут, как усиливать, так и угнетать пролиферативные ответы. Они регулируют межклеточные и межсистемные взаимодействия, определяют выживаемость клеток, стимуляцию или подавление их роста, дифференциацию и т.д.



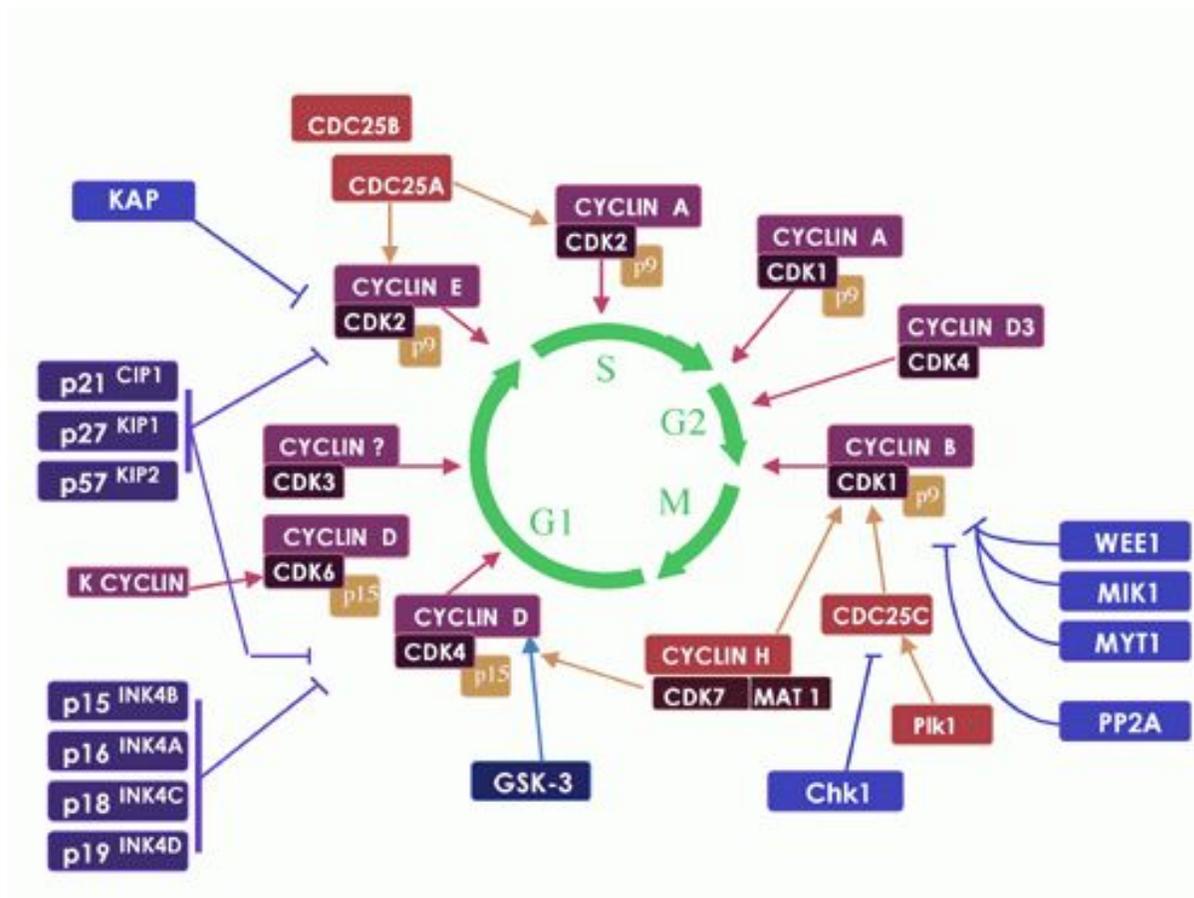
## Зависимость пролиферации от разных факторов:

1. Набор питательных низкомолекулярных компонентов среды подбирается оптимальным для роста культуры. Некоторые метаболиты вносятся в избыточных концентрациях в расчете на длительное потребление, например *глюкозу*.
2. Замедление пролиферации и полная ее остановка наблюдаются при уменьшении концентрации или удалении из среды незаменимых аминокислот. Среда без *изолейцина и глутамина*.
3. Существует неодинаковая зависимость синтеза ДНК и деления клеток от *наличия в среде биотина, витамина B12, трансферрина и т.д.*
4. Для оптимального роста культур *требуется выдерживать определенные соотношения аминокислот*, особенно при клонировании клеток.

5. Так же *большая роль у неорганических ионов* в поддержании пролиферации клеток. Снижение концентрации ионов натрия, калия, кальция, магния приводят к изменению темпа пролиферации и гибели клеток.
6. Скорость пролиферации так же зависит *от изменений рН среды*.
7. *Увеличение давления кислорода* может вызывать торможение пролиферации.
8. *Температура*. Температурным сдвигом можно ускорить или замедлить, или полностью остановить пролиферацию.

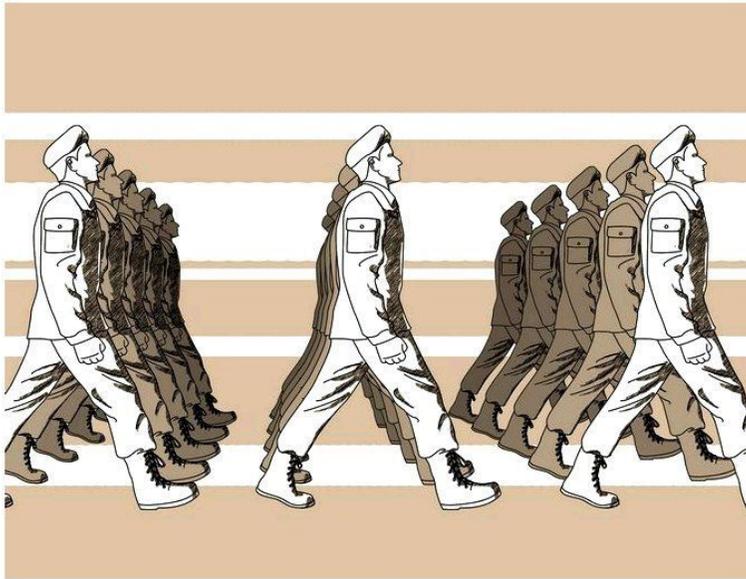
# Эндогенные регуляторы

- Циклин-зависимые киназы (CDK) и их регуляторные субъединицы (**циклины**) являются основными регуляторами клеточного цикла. Прохождение клеточного цикла достигается путем последовательной активации и дезактивации разных комплексов циклин-CDK. Действие комплексов циклин-CDK заключается в фосфорилировании ряда белков-мишеней в соответствии с фазой клеточного цикла, в которой активен тот или иной комплекс циклин-CDK.



# Синхронизация клеток

Для изучения биохимических процессов на протяжении цикла деления необходимо чтобы клетки делились одновременно. Чтобы достичь совпадения фаз цикла применяют синхронизацию клеточной культуры. Синхронизировать деление популяции клеток можно с помощью физических методов или добавления химических веществ - ингибиторов.



# Синхронизация клеток в культуре

## Физические методы синхронизации клеток:

- ▶ Охлаждение клеток – замедляет все клеточные процессы и приводит к увеличению доли клеток в G1-фазе и их выходу в G0-фазу. Однако при возвращении клеток в нормальные условия культивирования они идут по циклу не синхронно.
- ▶ Разделение центрифугированием – применяется для разделения суспензионных культур или клеток, снятых с подложки. Принцип метода состоит в том, что клетки разделяются по размеру за счет различной плавучей плотности при центрифугировании. Для этого используется специальный ротор центрифуги, оборудованный трубками для протока жидкости. Этот метод позволяет получать клеточные фракции, обогащенные клетками G1, S или G2, но не чистые фракции клеток различных фаз клеточного цикла.
- ▶ Разделение клеток в проточном цитофлуориметре – принцип заключается в автоматизированном разделении клеток, предварительно окрашенных флуоресцентными красителями, стехиометрически связывающимися с ДНК. Недостатки метода аналогичны недостаткам разделения клеток центрифугированием: метод не позволяет отделять клетки в G2-фазе от митотических и тетраплоидных клеток в G1-фазе.

# Химические методы синхронизации

Для синхронизации клеток в культуре используют различные химические вещества ингибиторы, способные синхронизировать клетки на границе фаз G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>/S и G<sub>2</sub>/M.

Для синхронизации клеток в G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> используют например:

- Метотрексат – приводит к остановке клеточного цикла и накоплению клеток в G<sub>1</sub>;
- Сывороточное голодание – в отсутствие факторов роста, находящихся в сыворотке, клетка задерживается в G<sub>1</sub>-фазе или выходит в G<sub>0</sub>.

Для синхронизации клеток в G<sub>1</sub>/S используют например:

- Мимозин – нарушает дезоксирибонуклеотидный метаболизм и воздействует, таким образом, на фазу элонгации ДНК.
- Циклопироксоамин – ингибитор инициации репликации ДНК.

Для синхронизации клеток в G<sub>2</sub>/M используют например:

- Колхицин – существенно повышает критическую концентрацию полимеризации тубулина в клетке, что приводит к деполимеризации микротрубочек и блоку митоза;

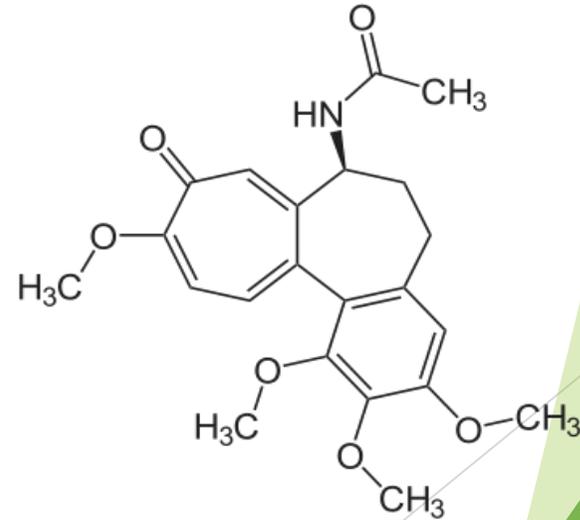
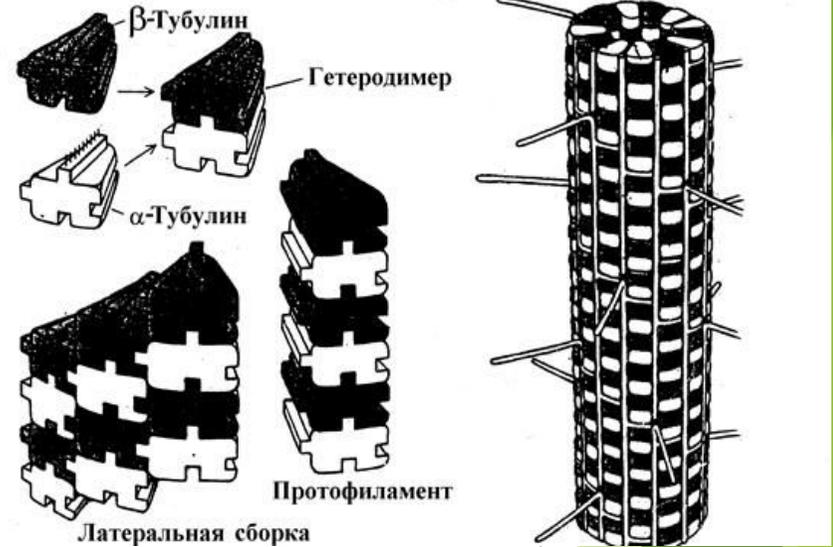
# ВЕЩЕСТВА ДЕЙСТВУЮЩИЕ НА ЦИТОСКЕЛЕТ

Первыми соединениями, для которых показано их действие на цитоскелет, были антимитотические препараты, и прежде всего

## КОЛХИЦИН

Колхицин, нокодазол (или онкодазол) и колцемид связываются с одним и тем же участком тубулинового димера.

Колхицин, обладающий антимитотической активностью, специфически связывается с тубулином, причем комплекс тубулин-колхицин прикрепляется к микротрубочкам, предотвращая присоединение новых молекул тубулина к плюсовому концу. Микротрубочки митотического веретена распадаются, так как деполимеризация продолжается преимущественно у минусового конца, а разрушенные единицы тубулина не восполняются.



Колхицин

Спасибо за внимание!