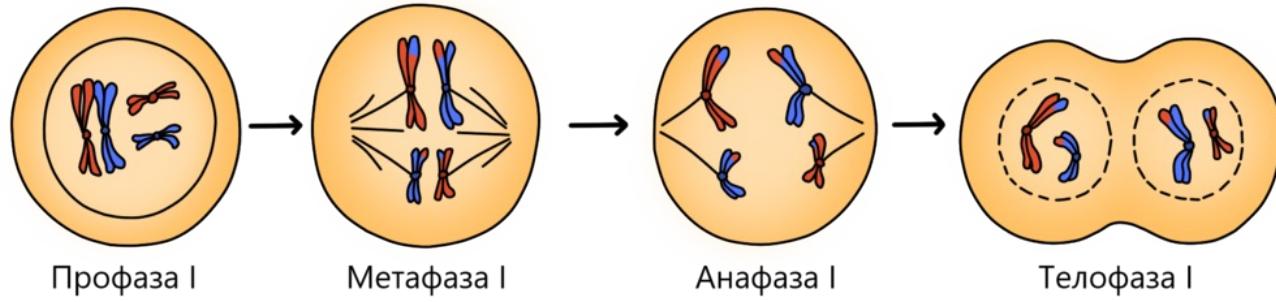
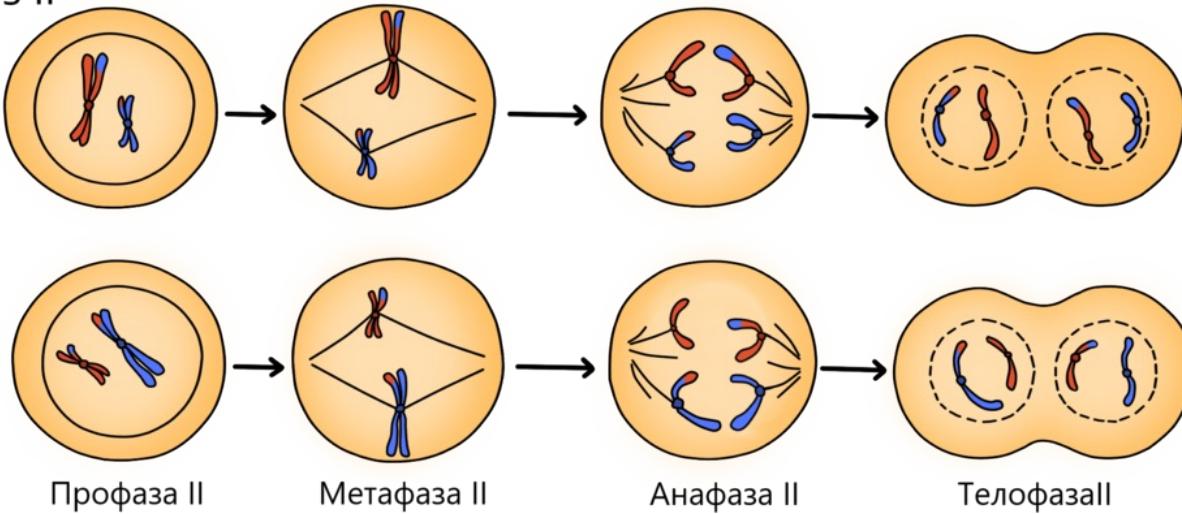


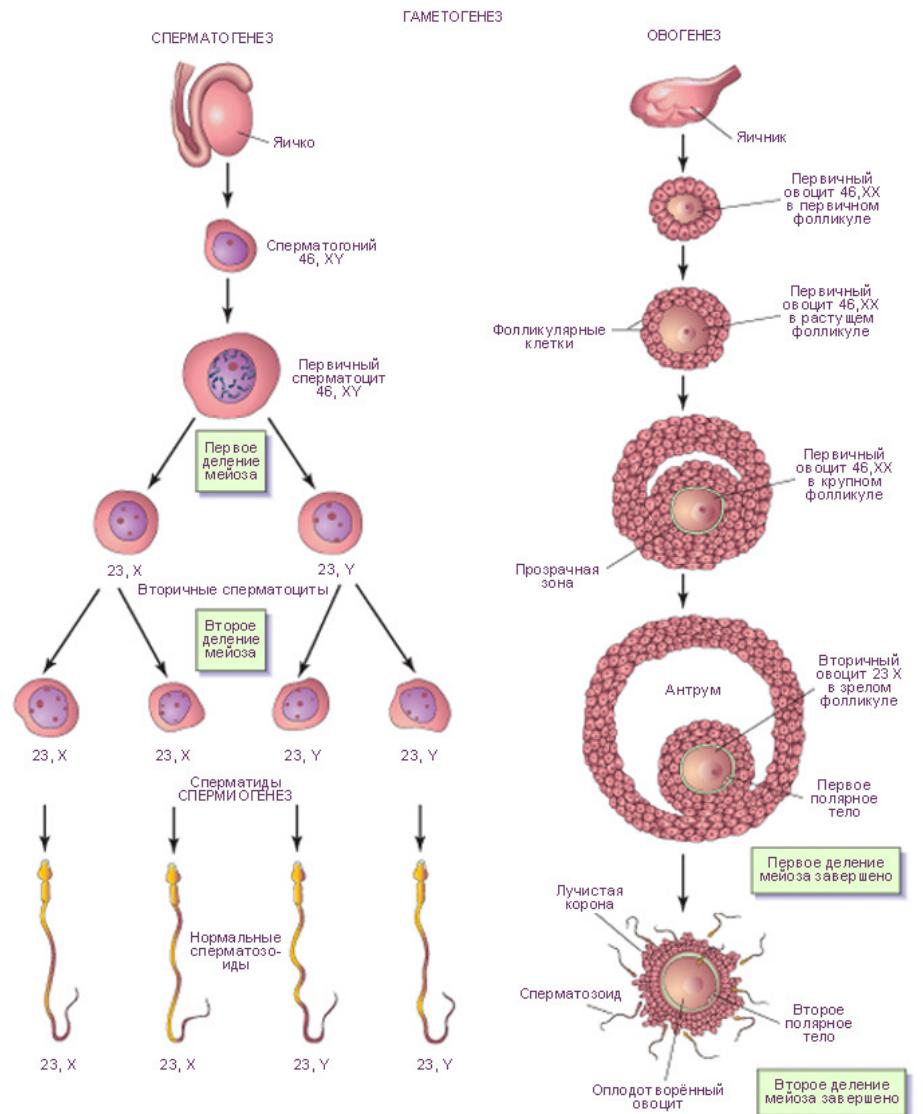
Клеточный цикл, деление клеток и апоптоз

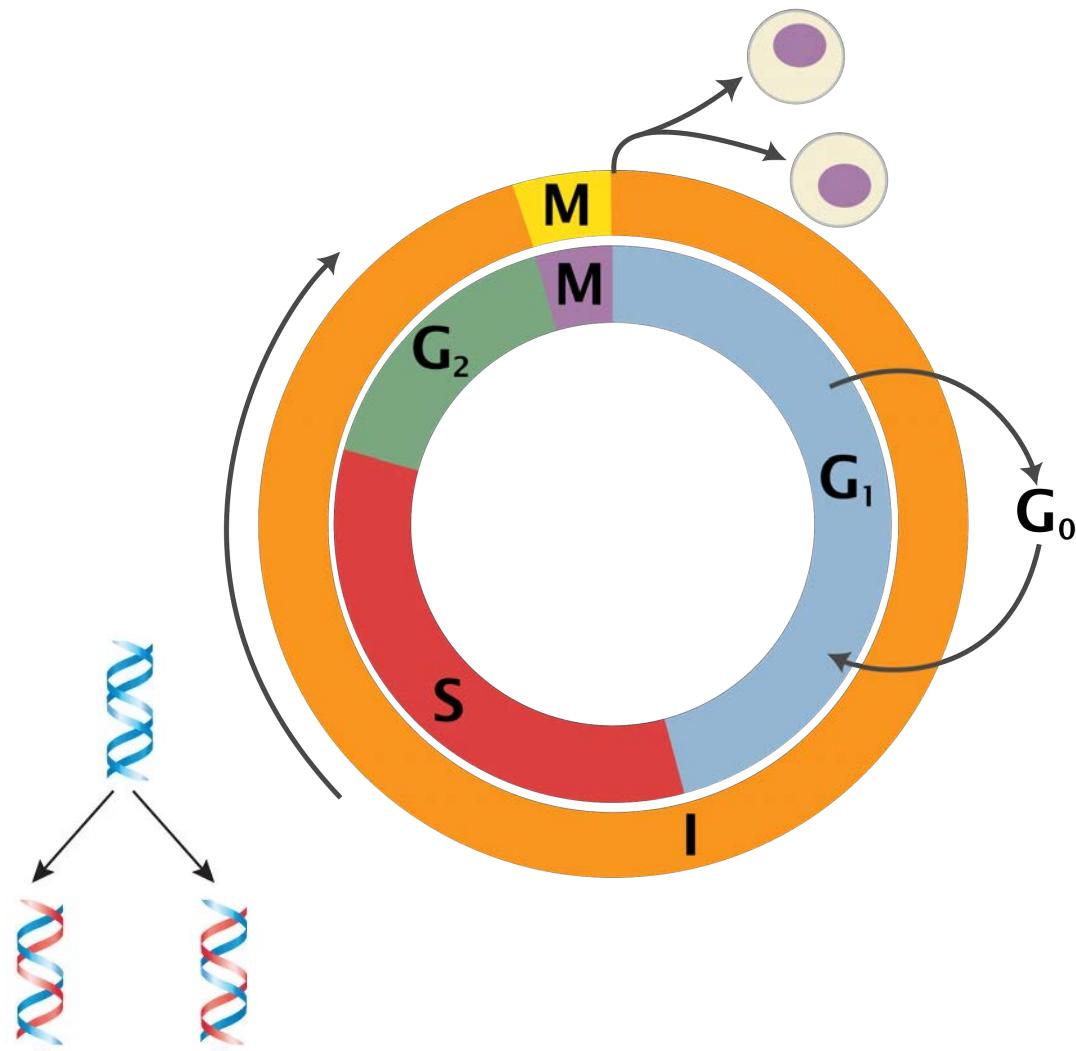
Мейоз I



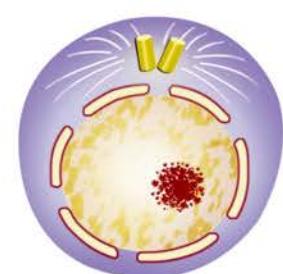
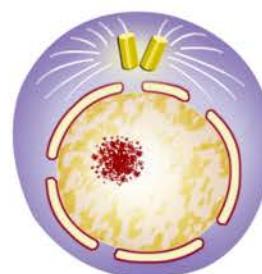
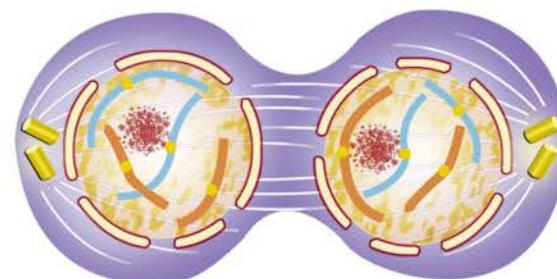
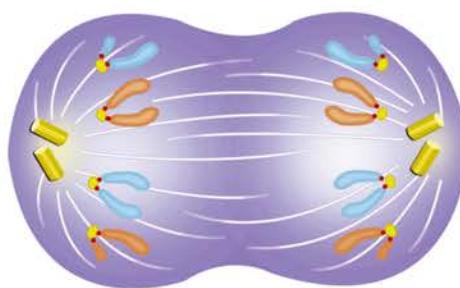
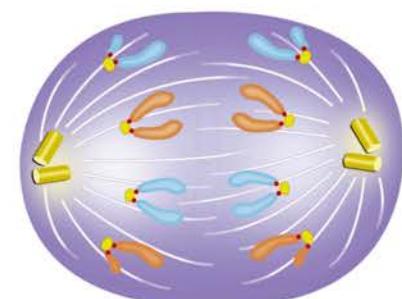
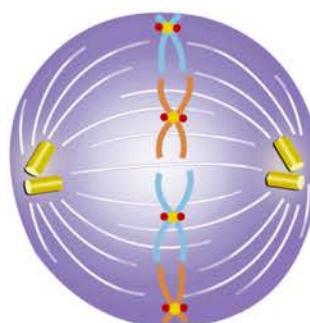
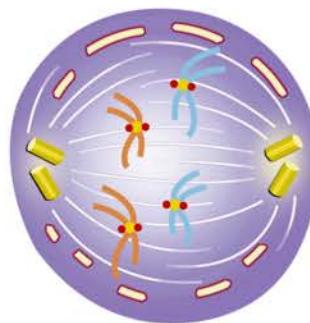
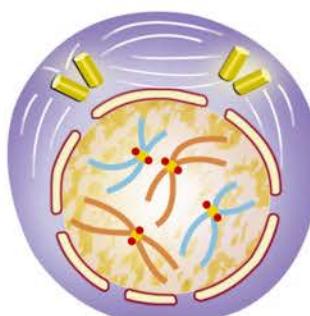
Мейоз II

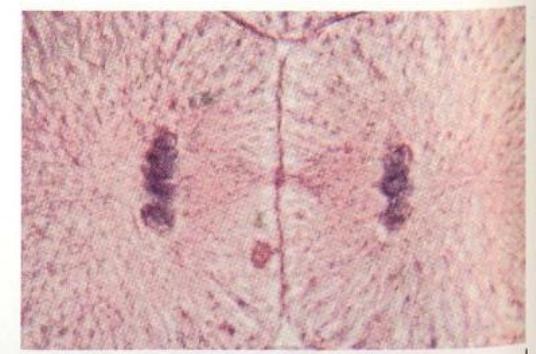
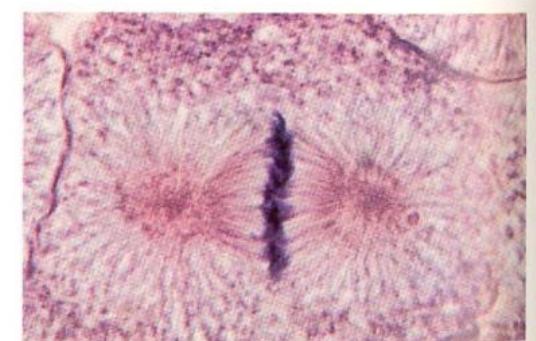
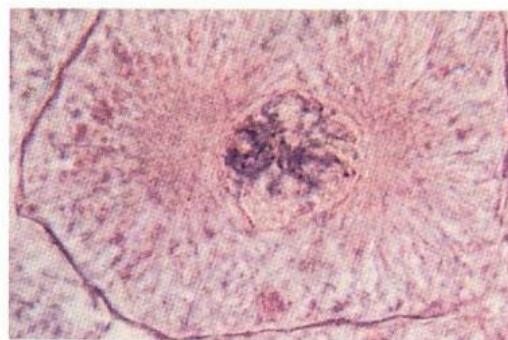
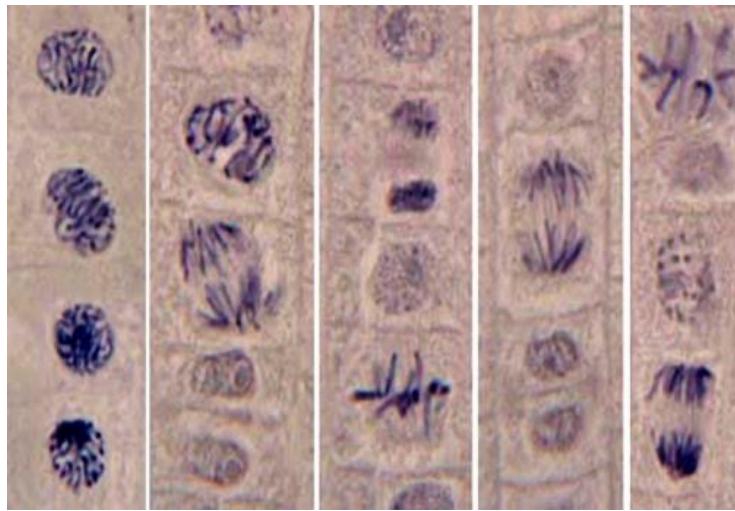


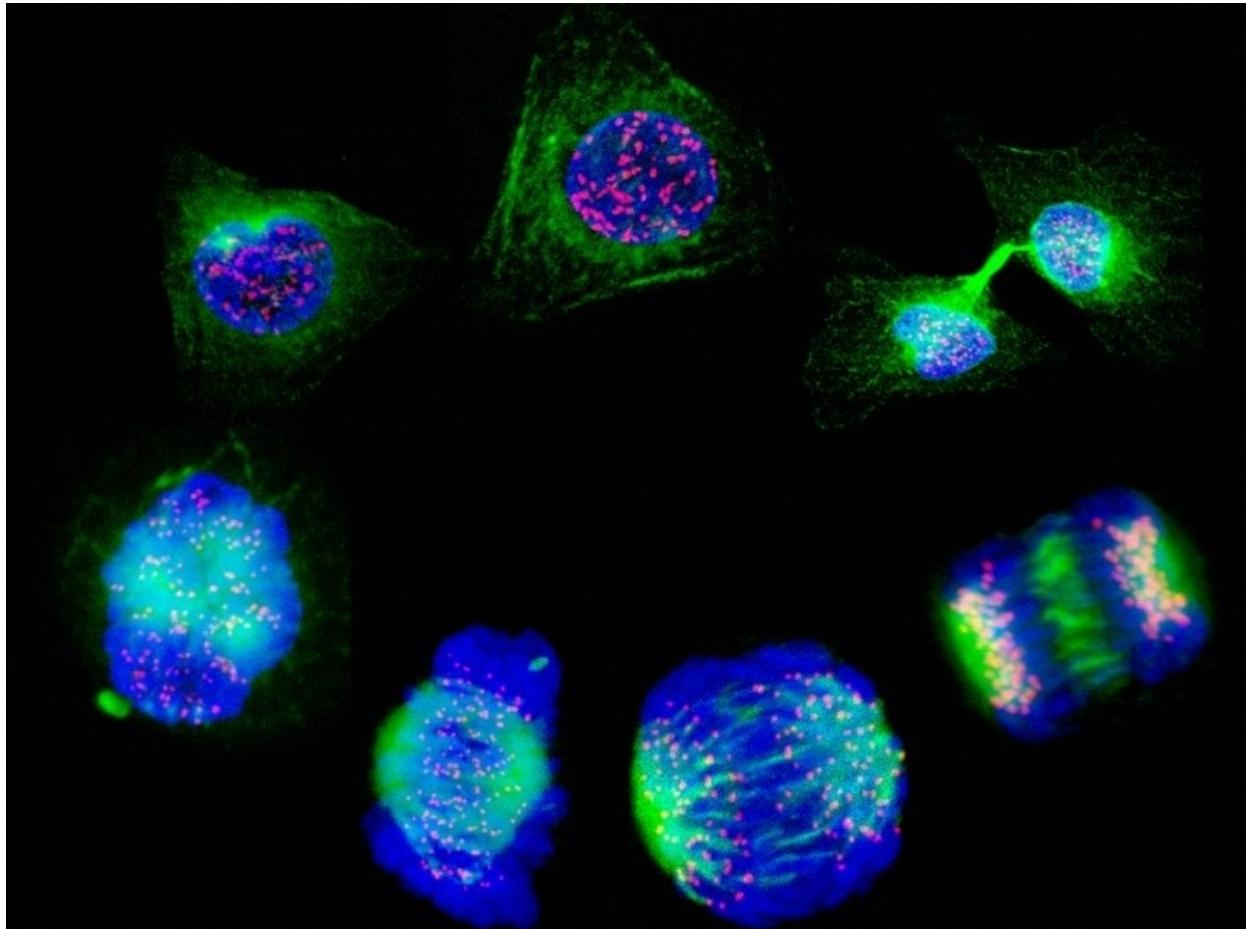


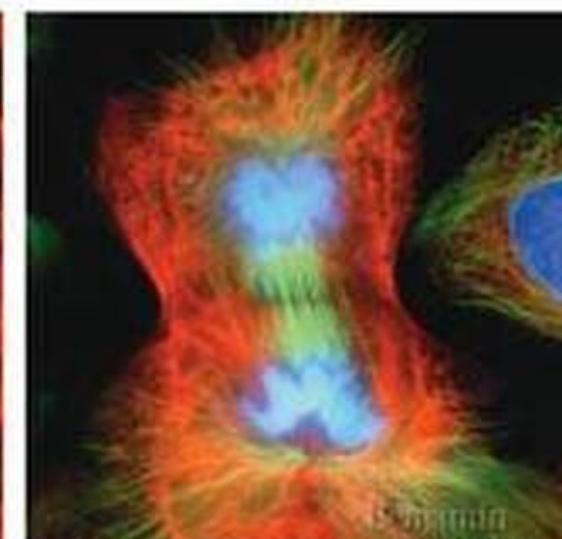
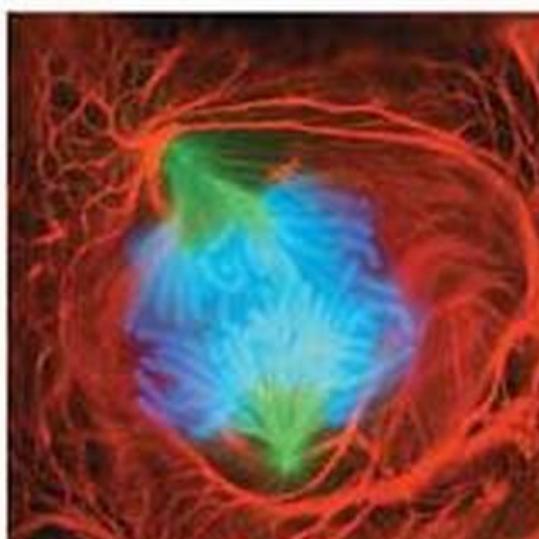
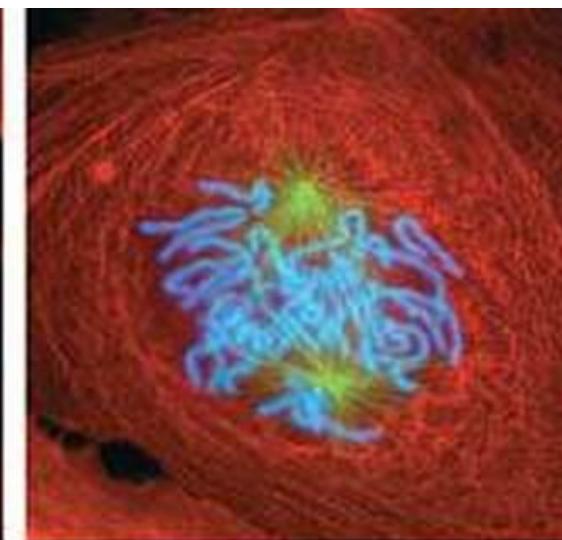
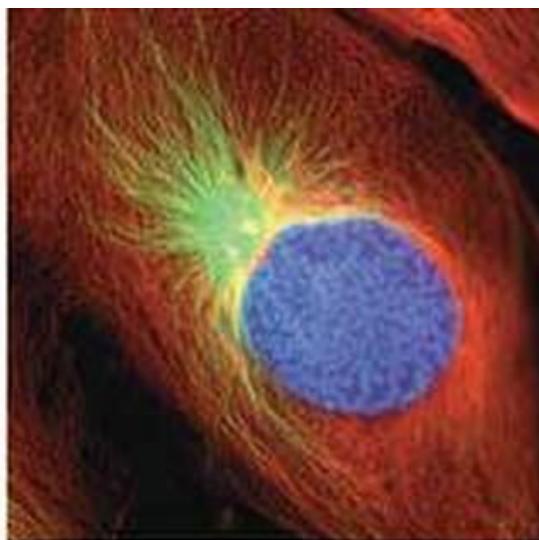
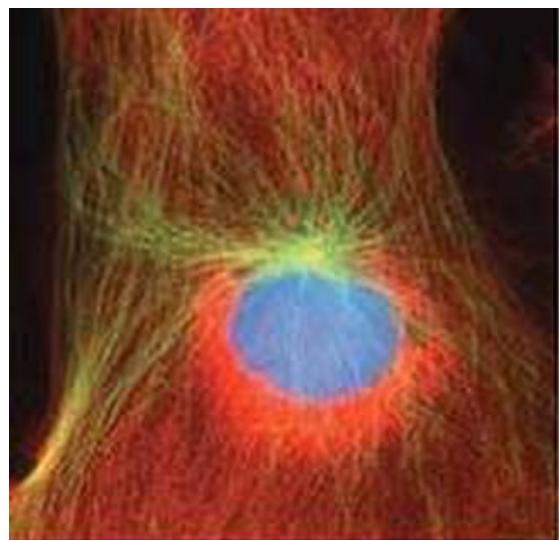


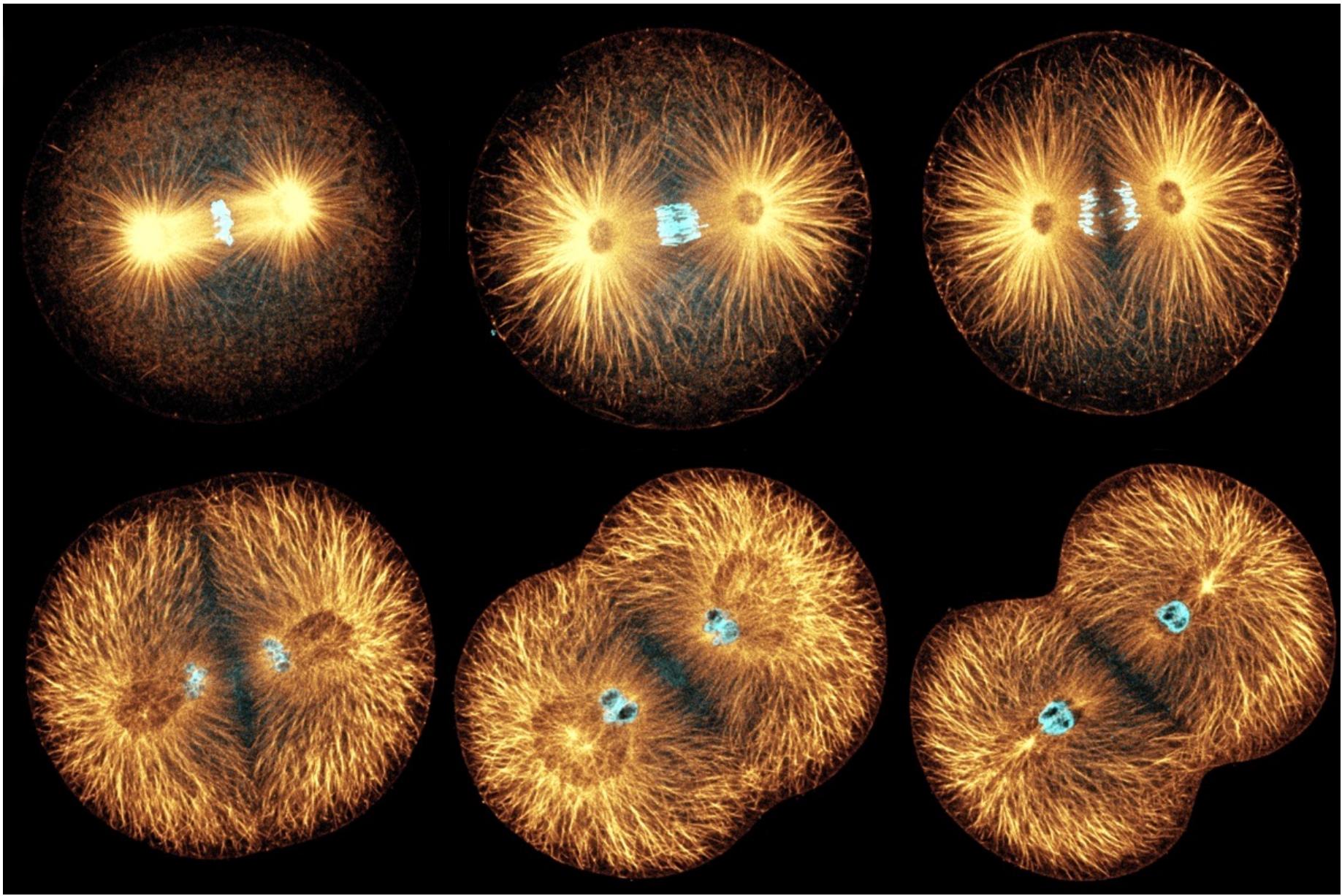
Митоз







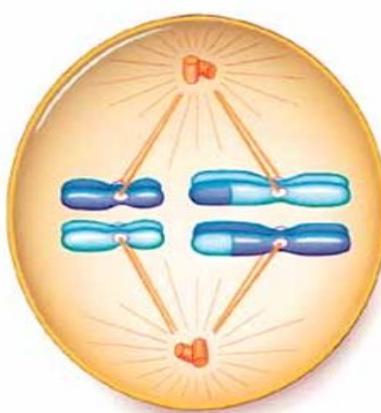




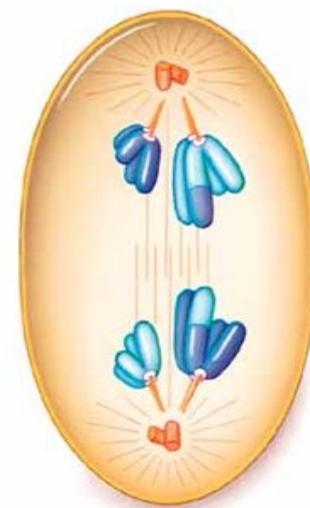
Мейоз I



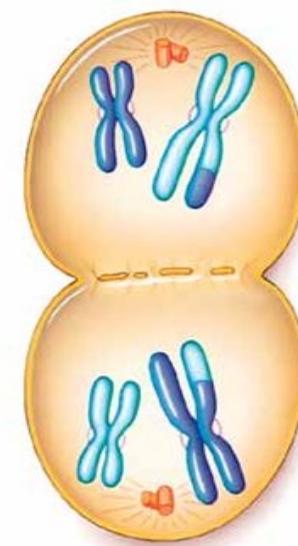
Prophase I



Metaphase I



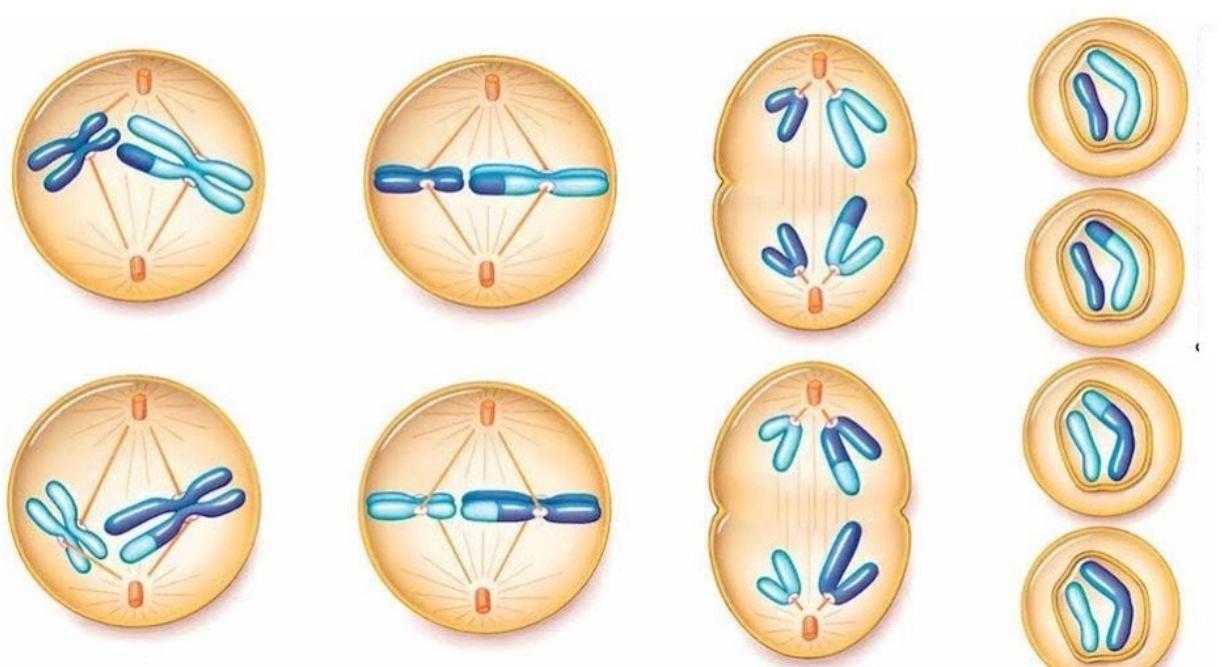
Anaphase I



Telophase I

©2001 Brooks/Cole - Thomson Learning

Мейоз II



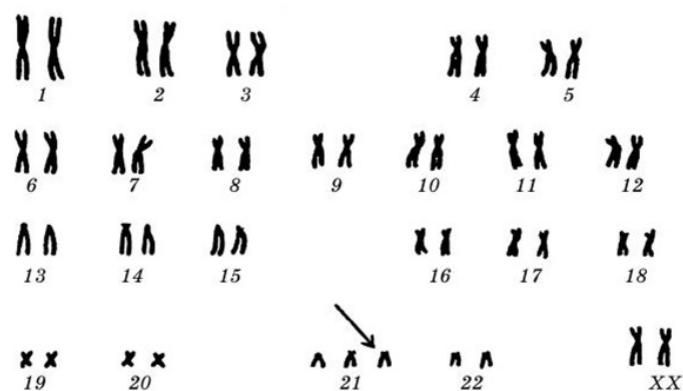
Prophase II

Metaphase II

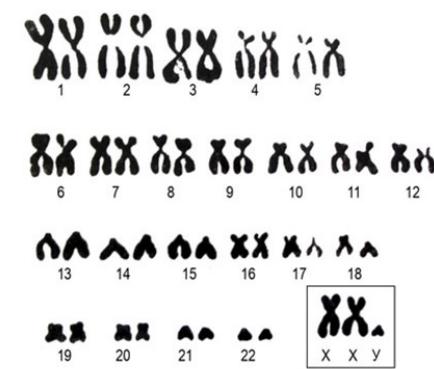
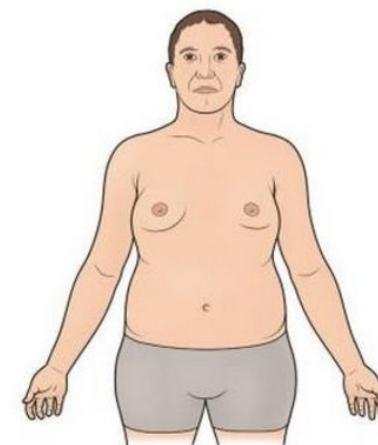
Anaphase II

Telophase II

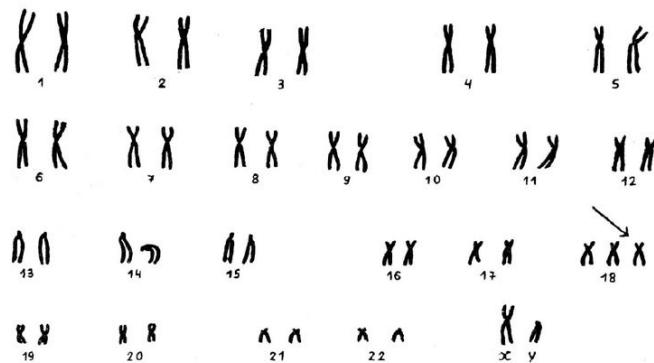
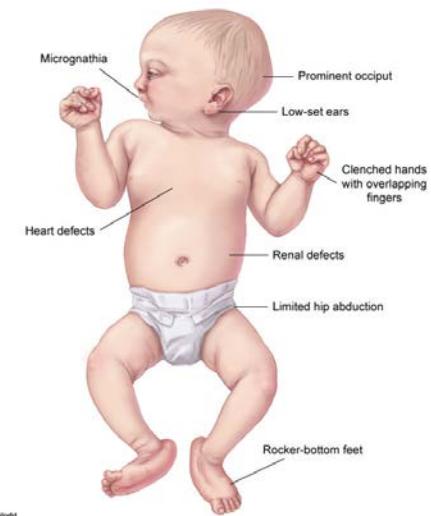
Синдром Дауна



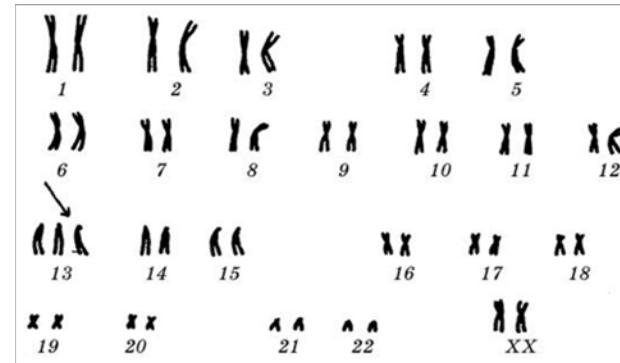
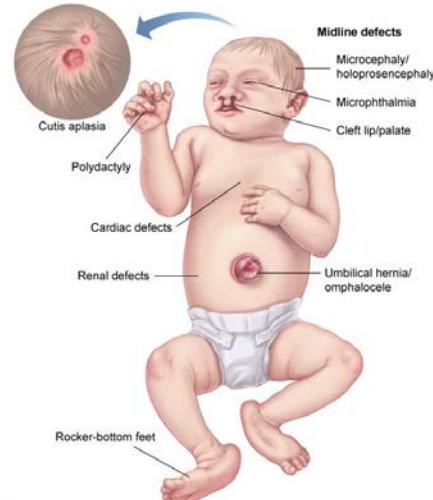
Синдром Клейнфельтера

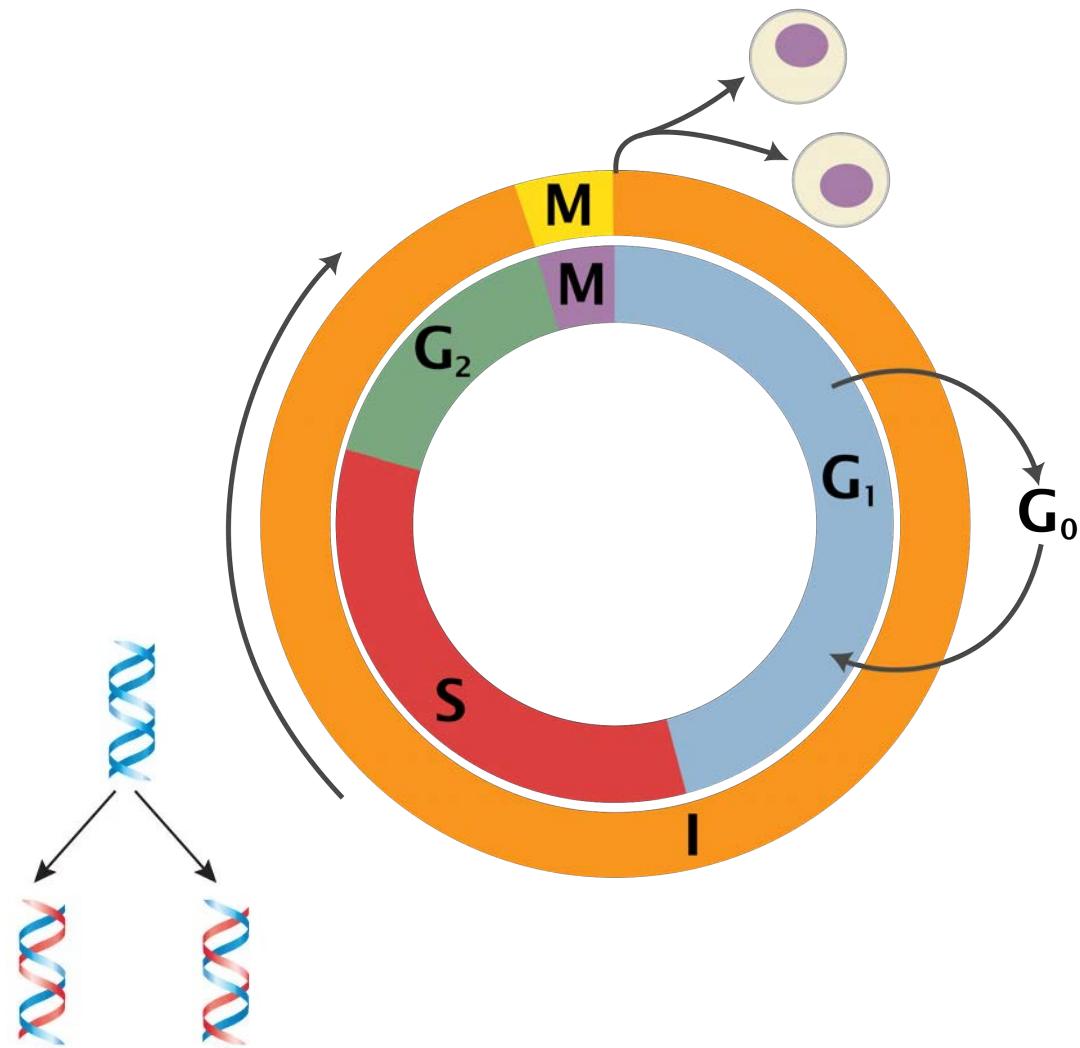


Синдром Эдвардса

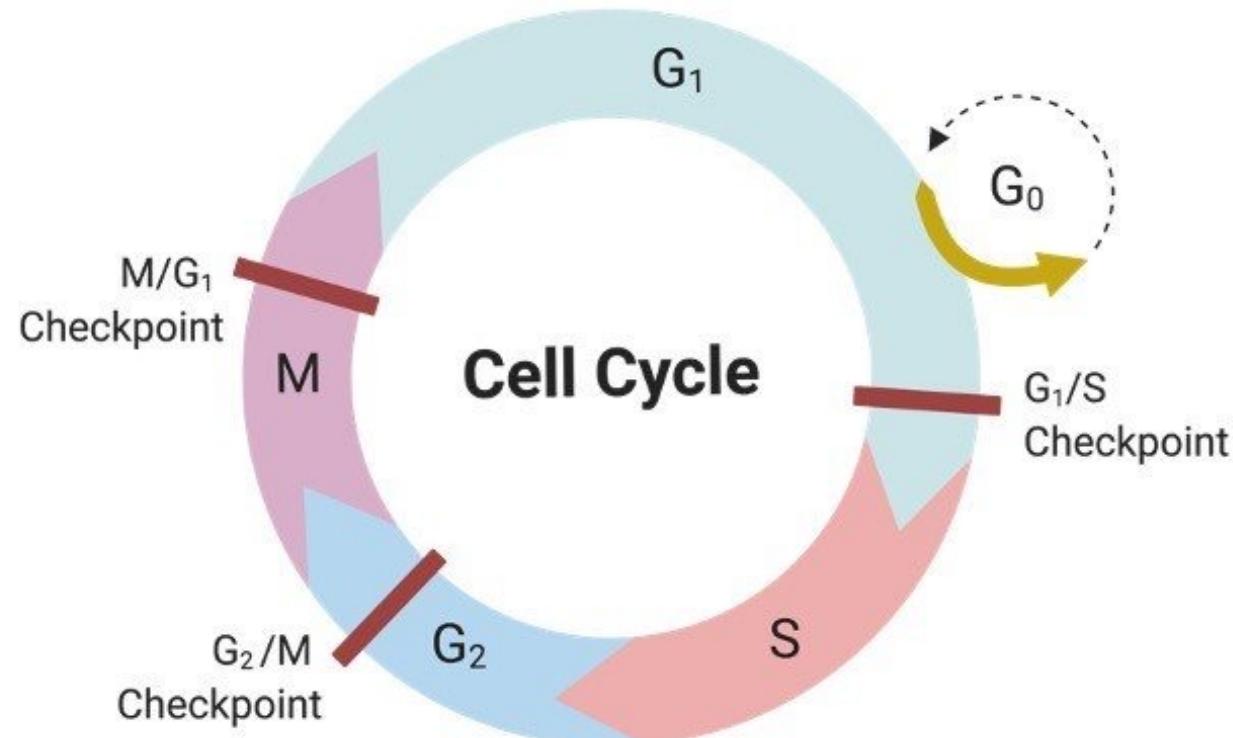


Синдром Патау

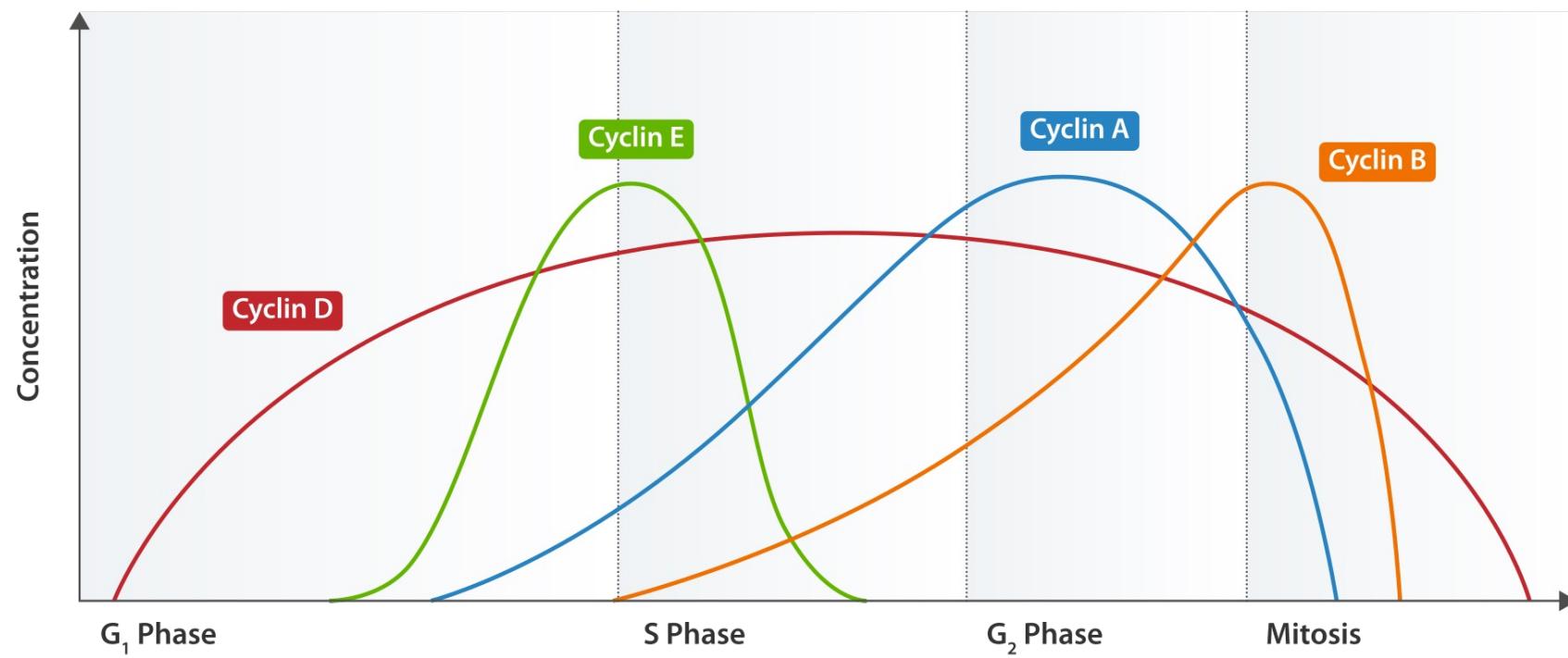




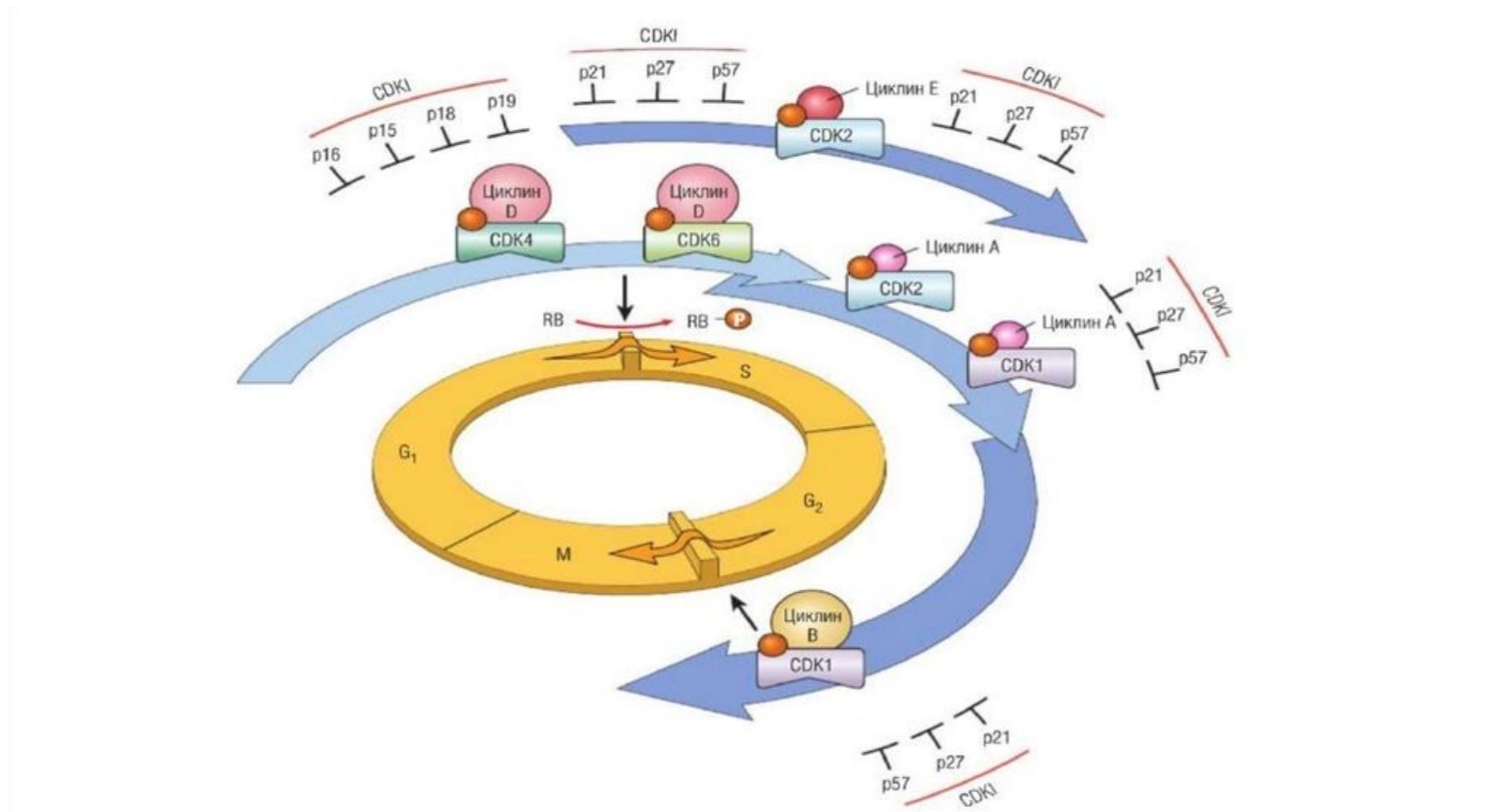
Контрольные точки клеточного цикла

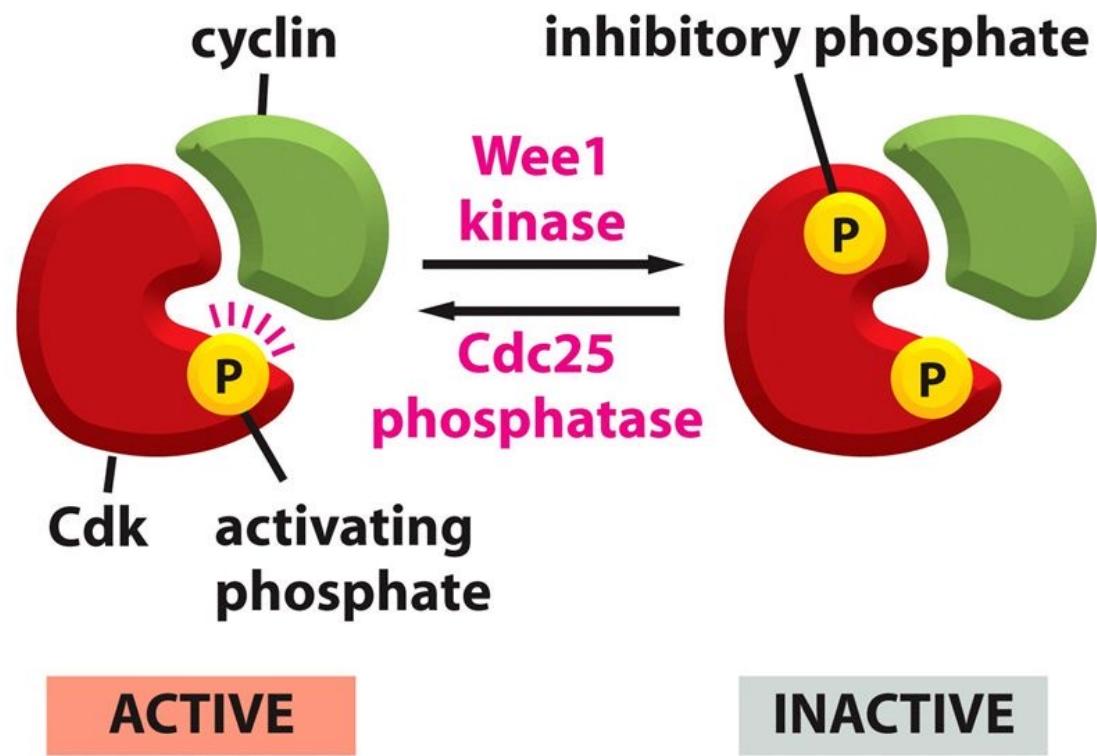


Роль циклинов и циклин-зависимых киназ в регуляции клеточного цикла

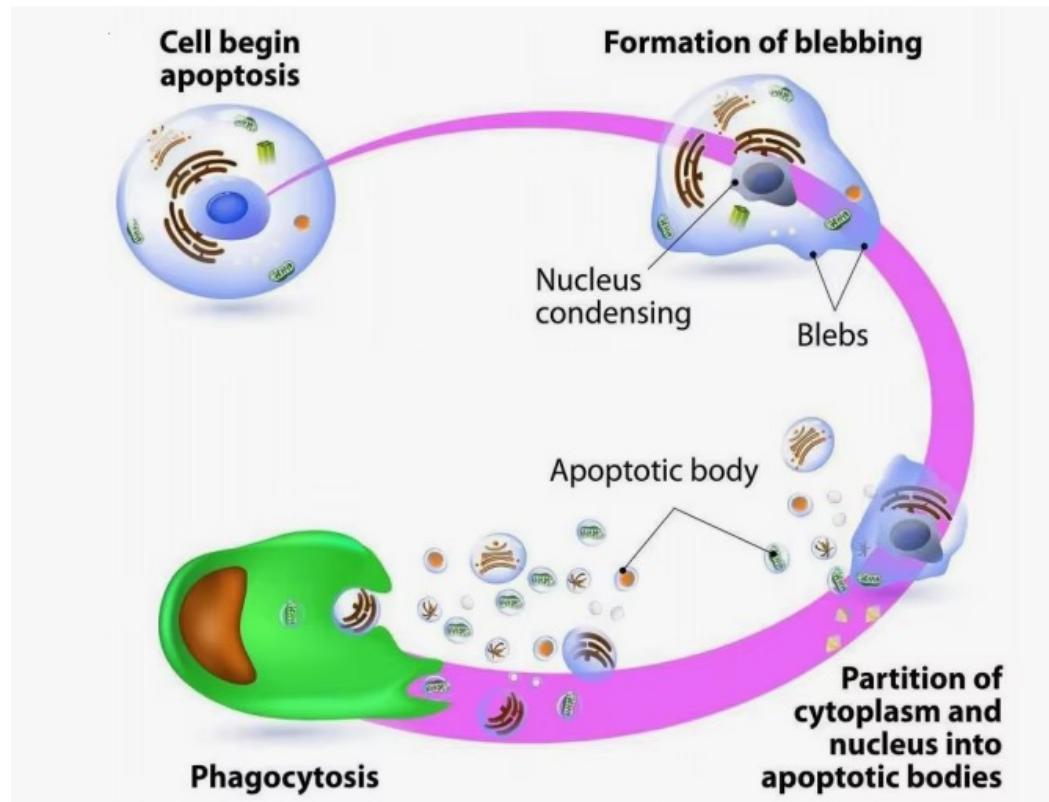


Роль циклинов и циклин-зависимых киназ в регуляции клеточного цикла



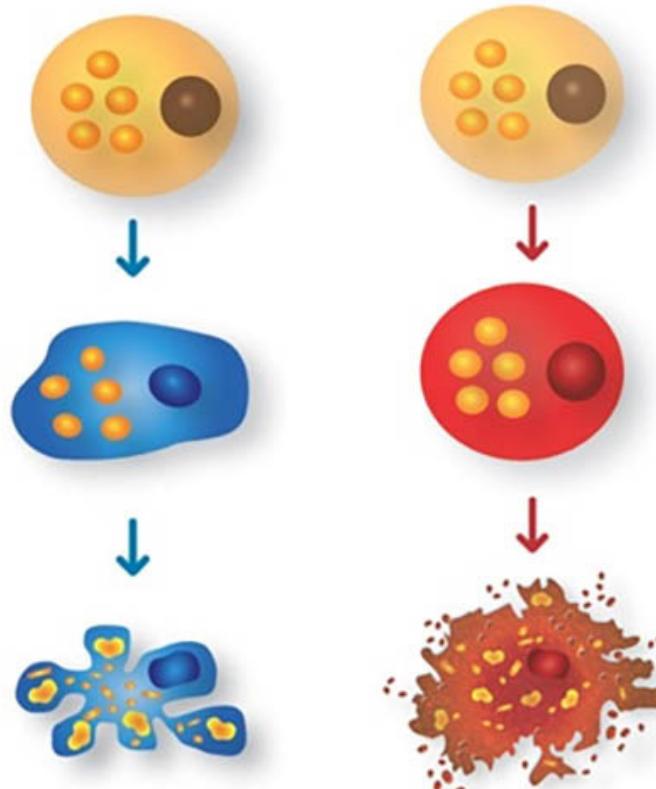


Апоптоз – программируемая гибель клетки



Апоптоз

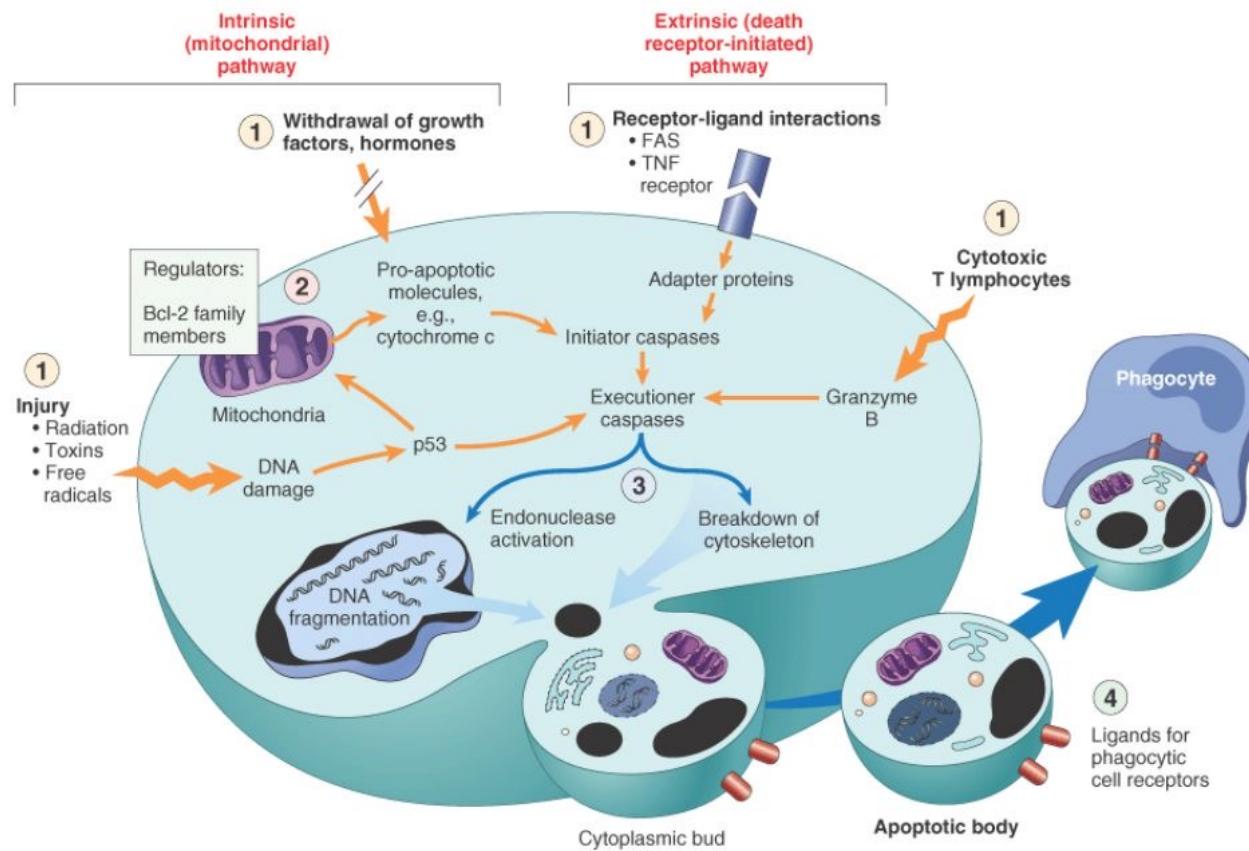
- Запускается физиологическими факторами
- Образование мембранных пузырей без нарушения целостности мембраны
- После апоптоза восстанавливаются клетки, аналогичные погибшим

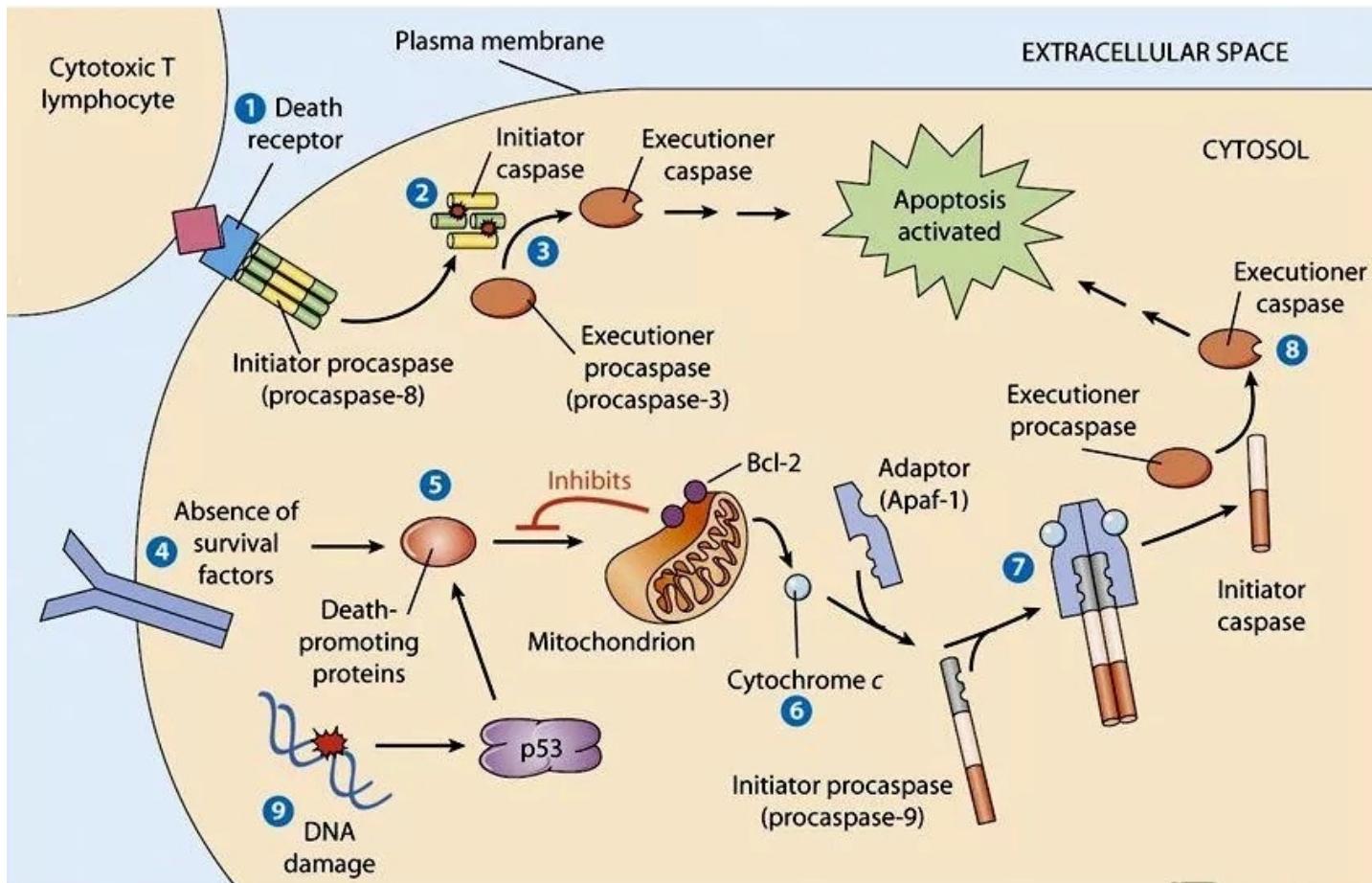


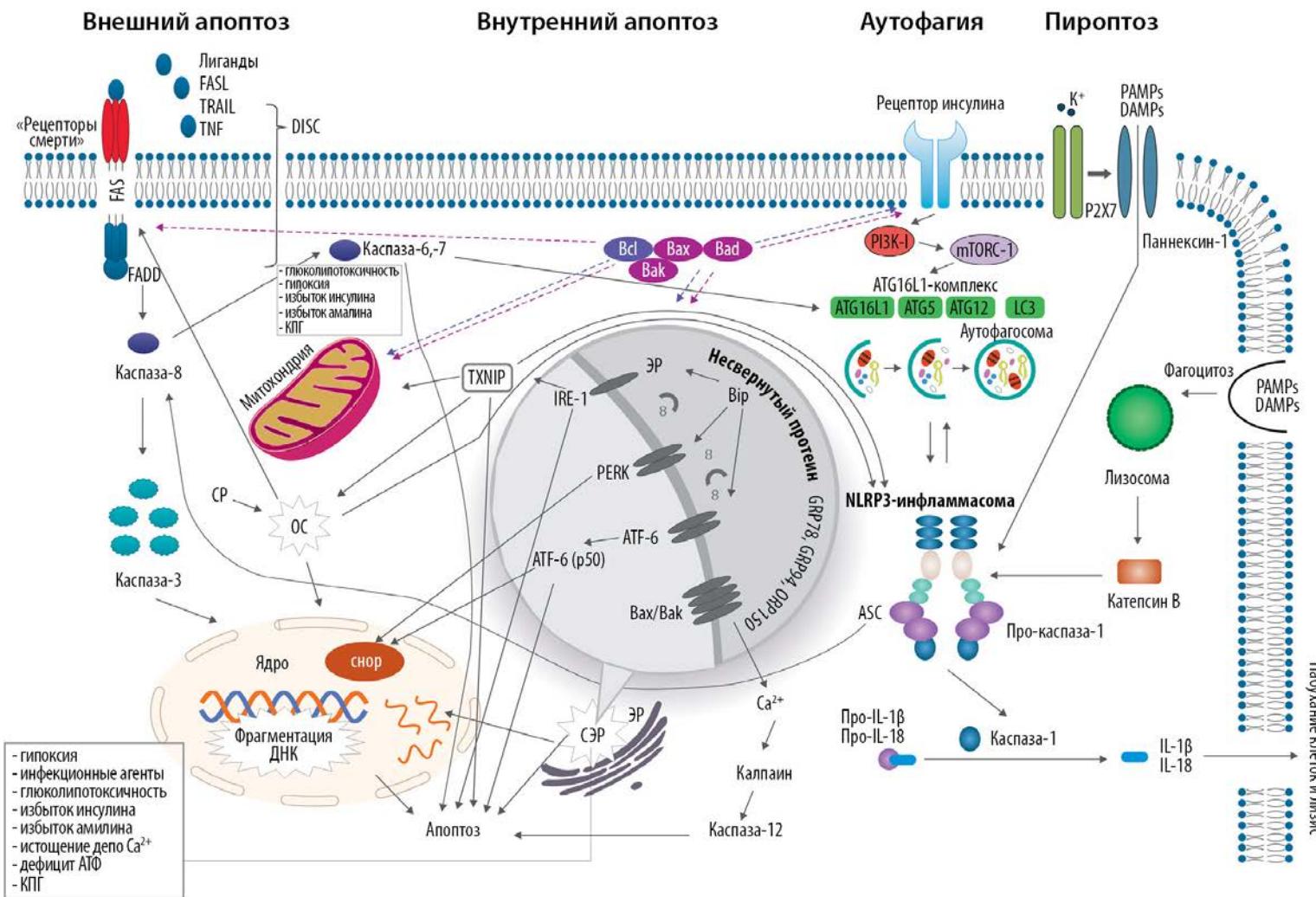
Некроз

- Запускается механическим повреждением
- Утрата целостности плазматической мембрany
- После некроза разрастается рубцовая соединительная ткань

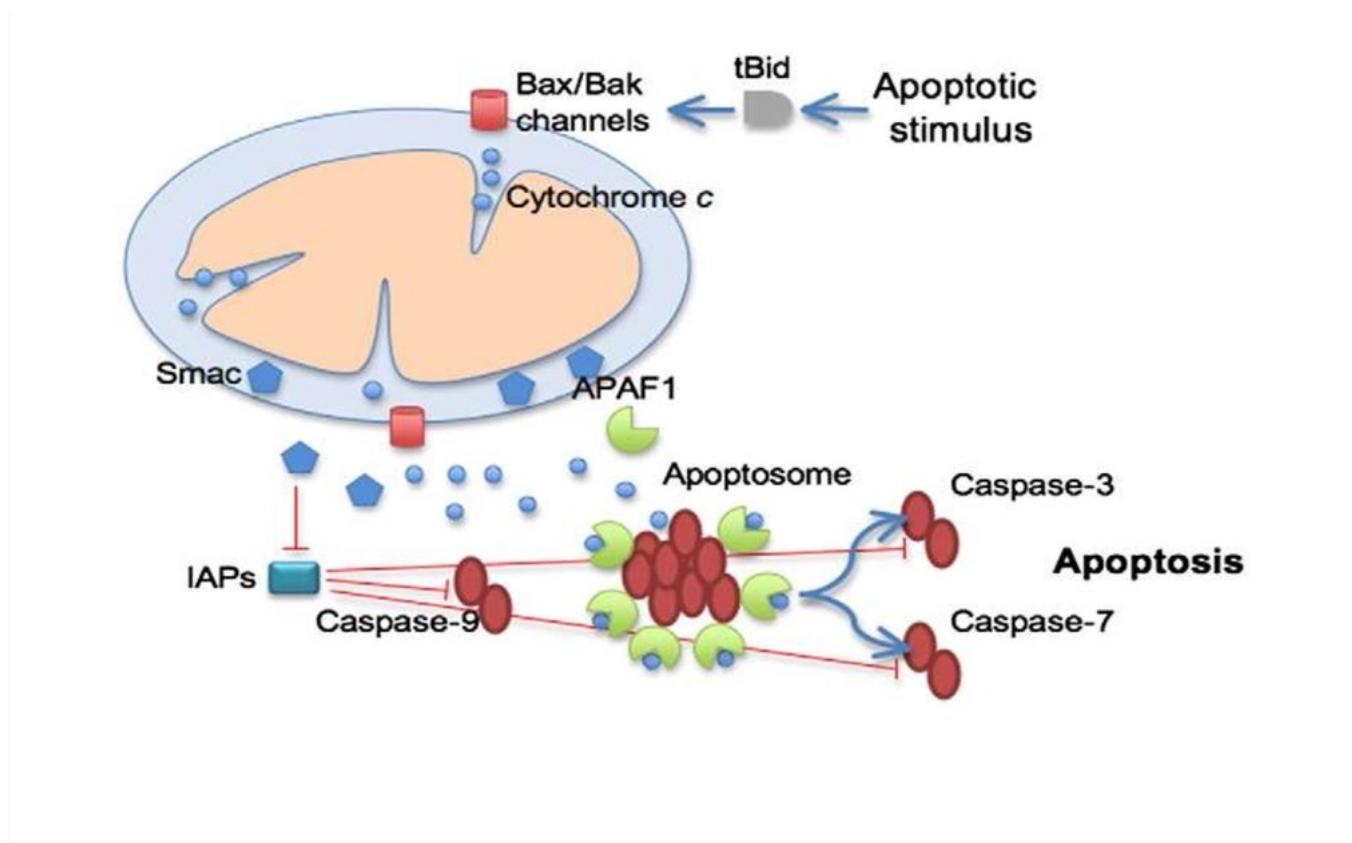
Пути запуска апоптоза







Митохондриальный путь запуска апоптоза



Прокаспаза

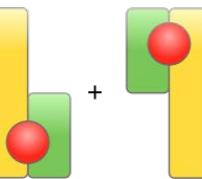
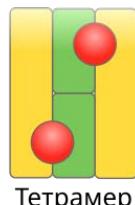


Продомен
Протеолиз

Большая и малая
субъединицы

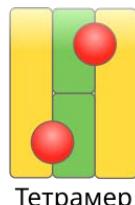


Каспаза

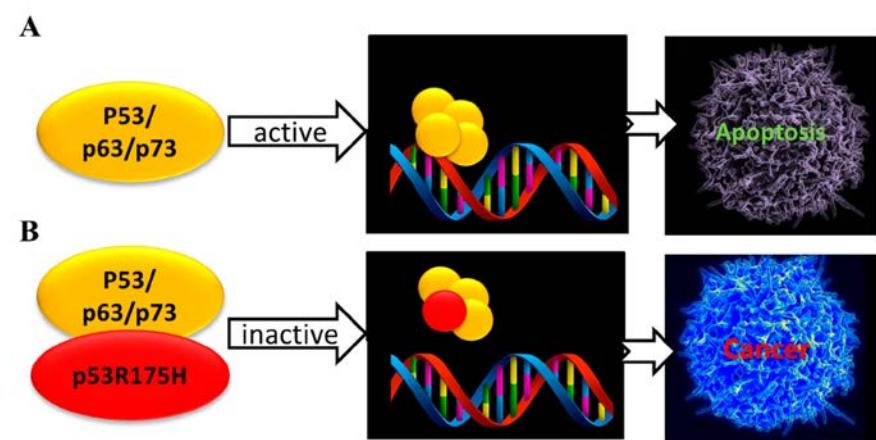
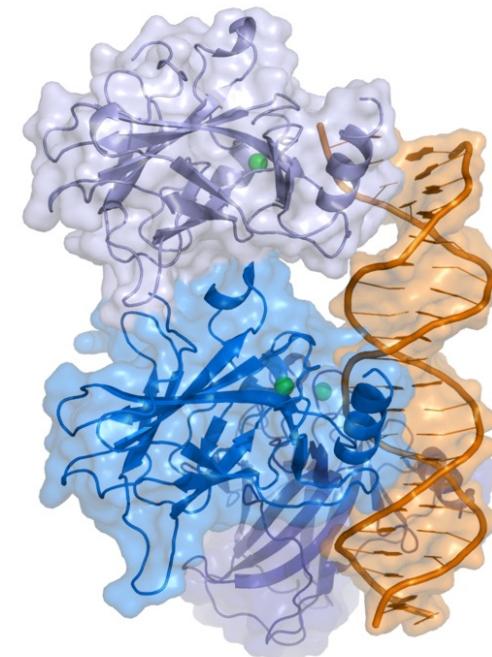
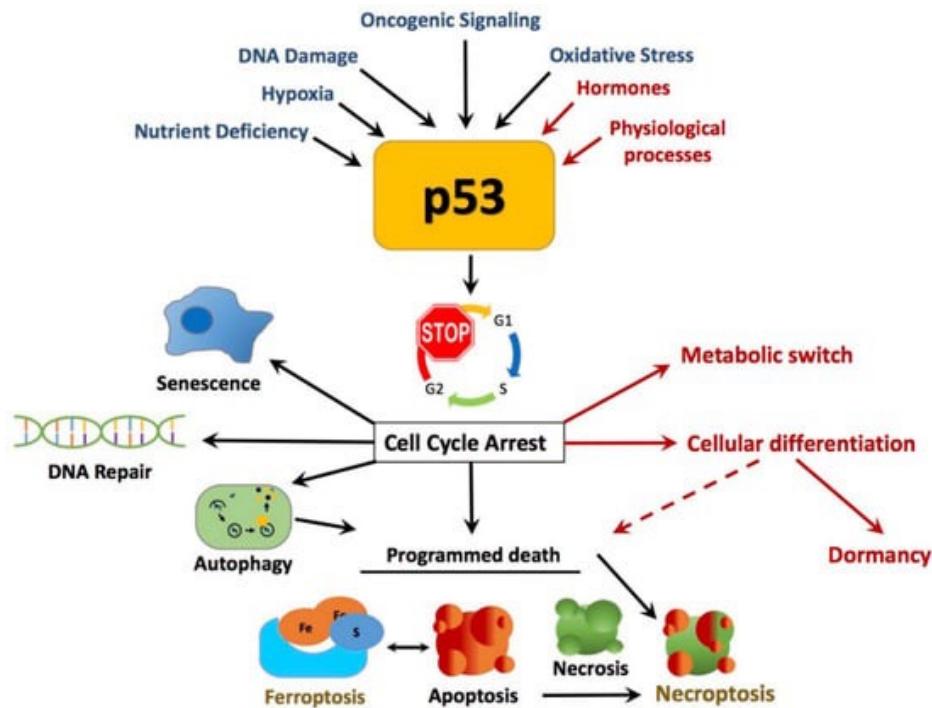


Ассоциация

←

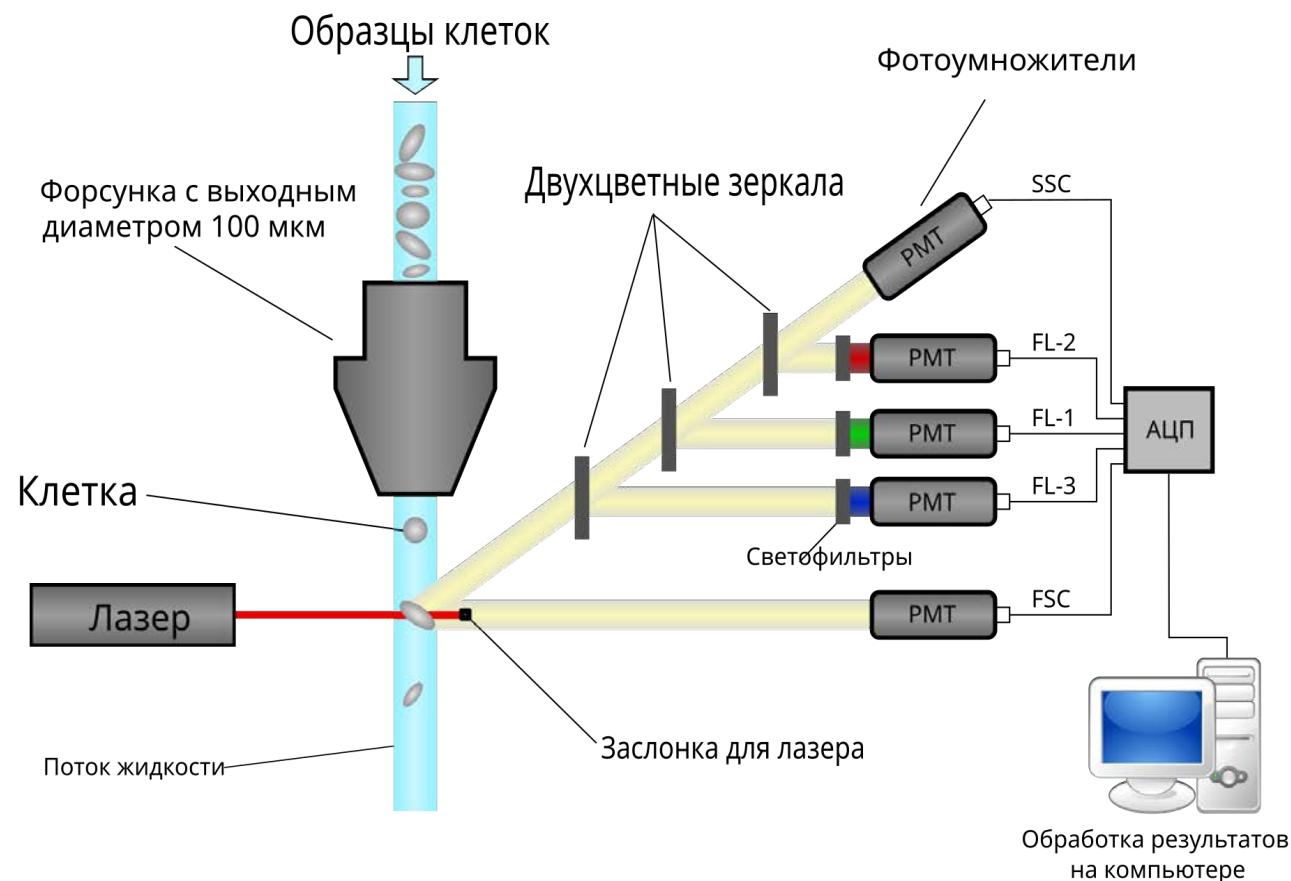


Тетрамер

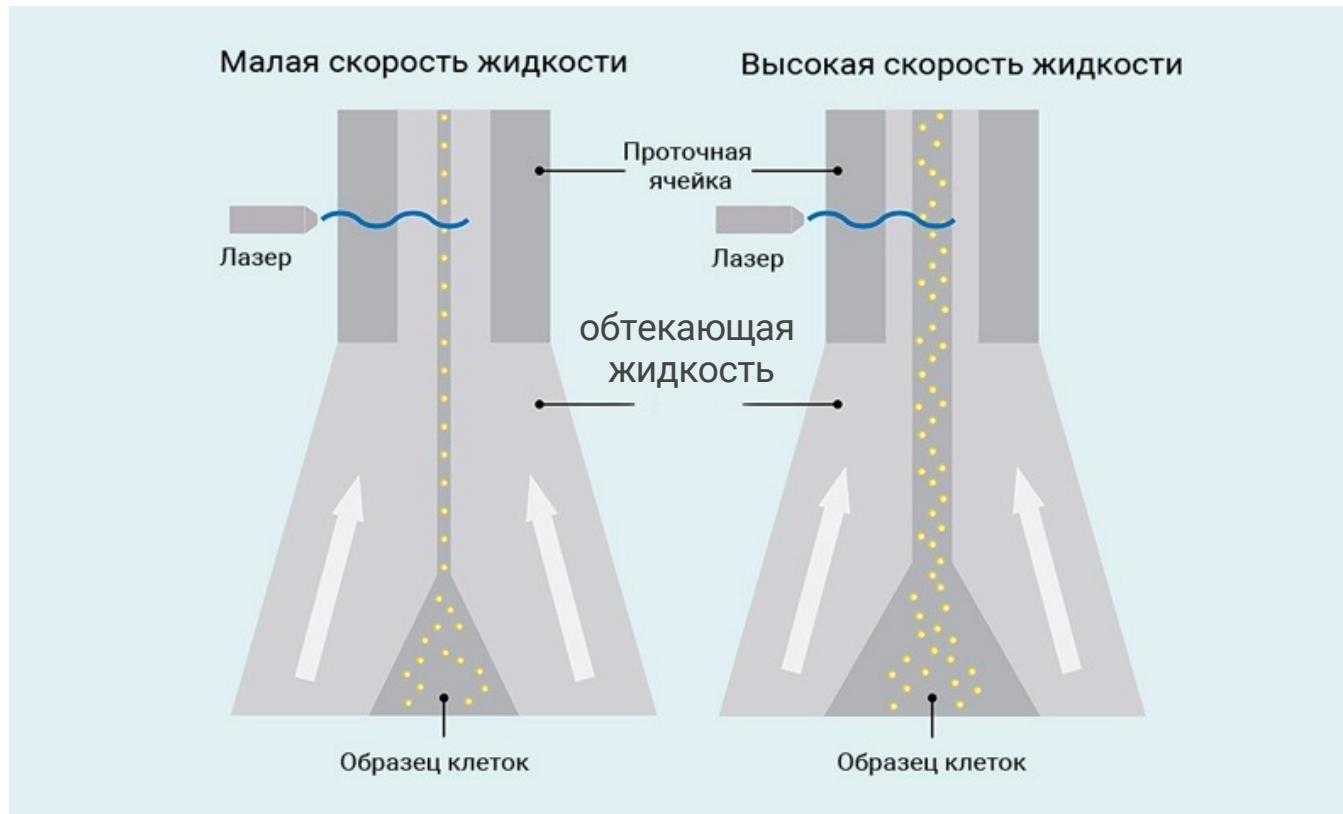


Методы изучения клеточного цикла

Проточная цитометрия



Проточная цитометрия



Важно, чтобы настройка скорости событий прибора не превышала 10000 событий в секунду для любой из скоростей потока.

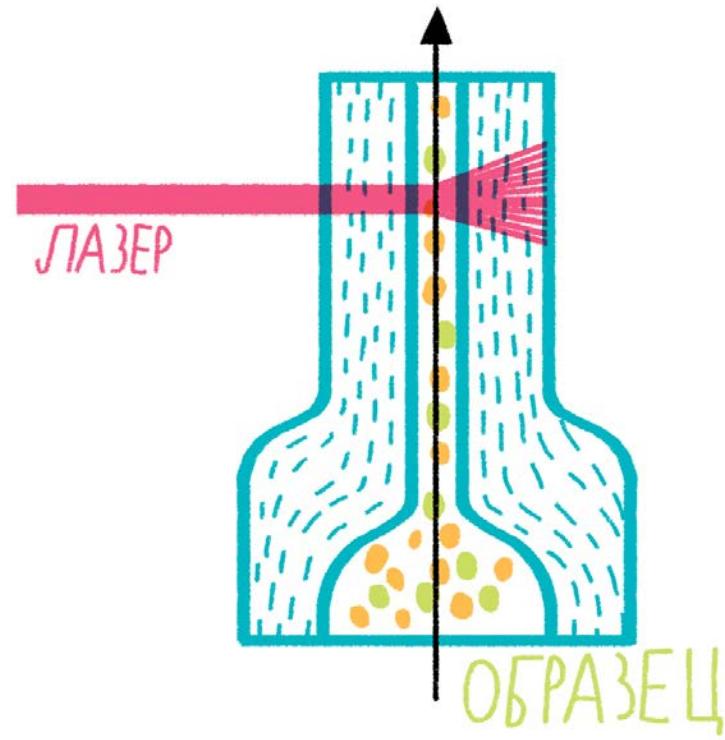
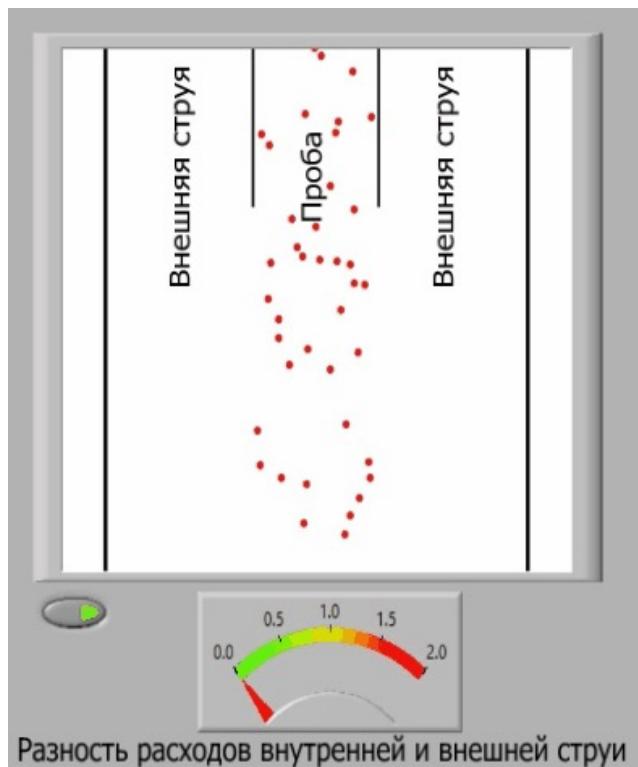
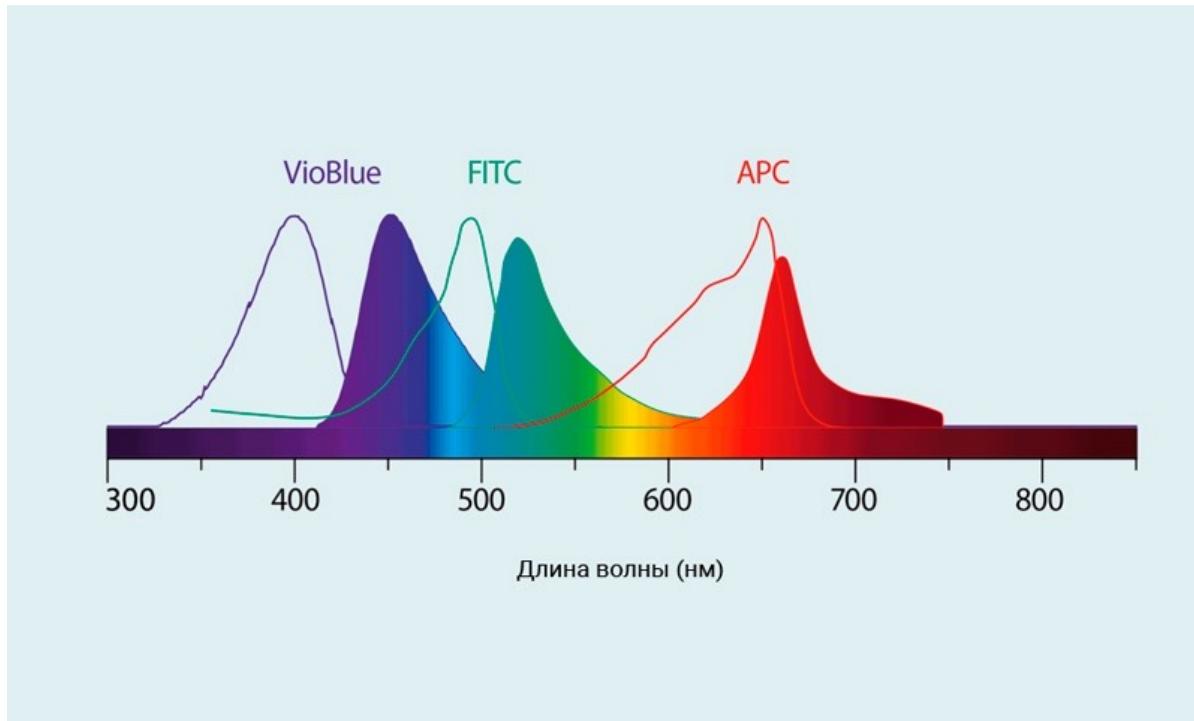


Иллюстрация гидродинамической фокусировки

Спектры возбуждения и испускания для различных флуорохромов



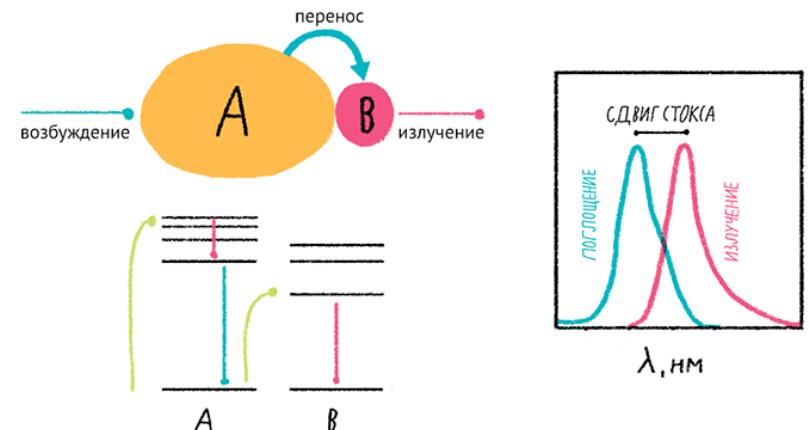
*FITC (Ex):495 нм, (Em):519 нм
APC (Ex):650 нм, (Em):660 нм
VioBlue (Ex):400 нм, (Em):452 нм*

Сплошные линии - спектр возбуждения; *Ex* – максимум возбуждения
Площадь залитая цветом - спектр испускания; *Em* – максимум эмиссии

Флуорофор	Цвет флуоресценции	Длина волны возбуждения, нм	Длина волны испускания, нм	Относительная яркость свечения
DyLight 405		400	420	3
Alexa Fluor 405		401	421	3
Pacific Blue		410	455	1
Alexa Fluor 488		495	519	3
FITC		490	525	3
DyLight 550		562	576	4
PE		490; 565	578	5
APC		650	661	4
Alexa Fluor 647		650	665	4
DyLight 650		654	673	4
PerCP		490	675	2
Alexa Fluor 700	Infrared	702	723	2

Наиболее популярные красители, используемые в проточной цитометрии, и их характеристики.

Упрощенная схема тандемного красителя, состоящего из двух молекул — донора (A) и акцептора (B).



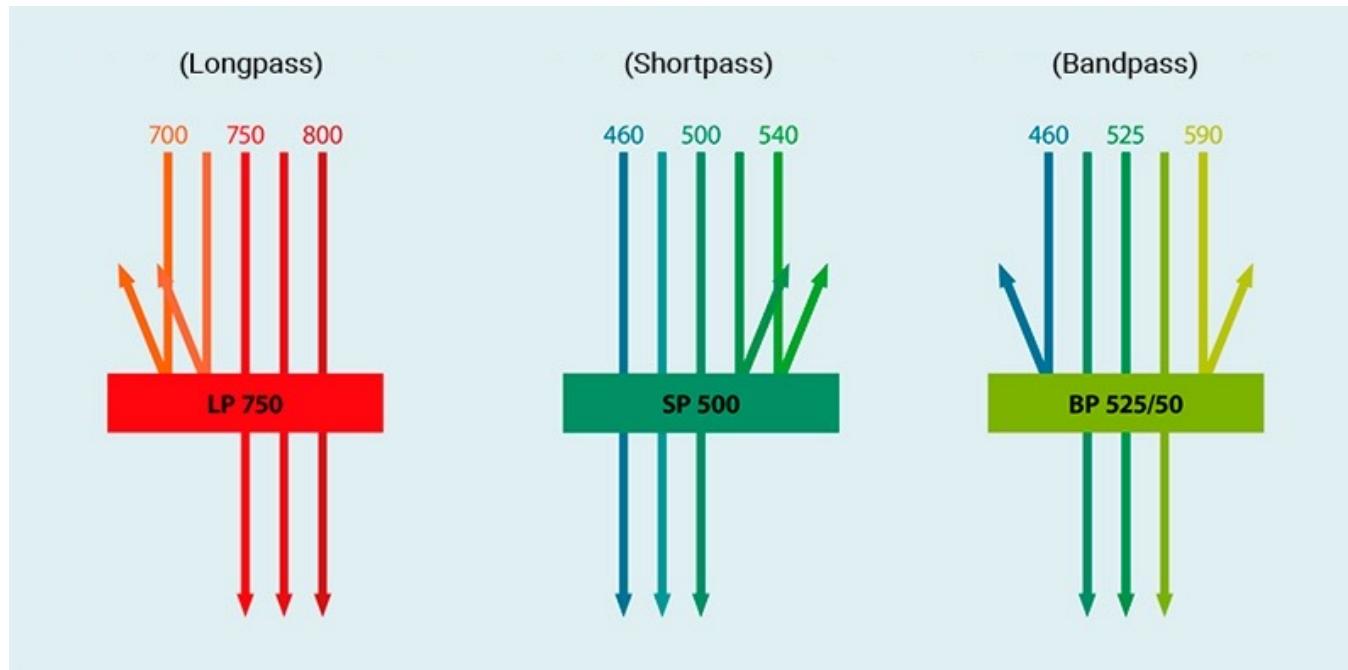
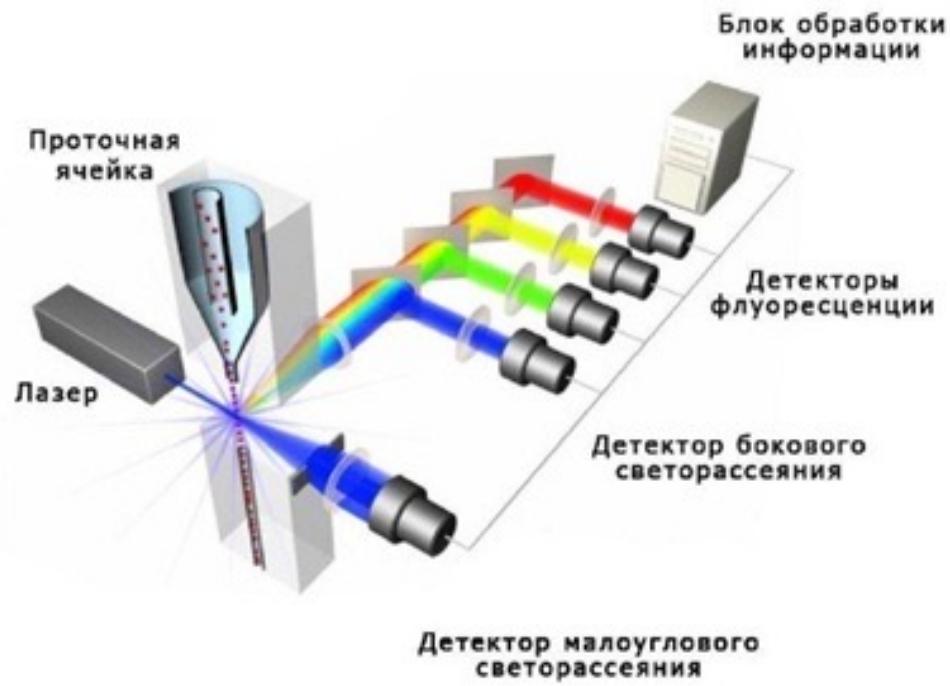
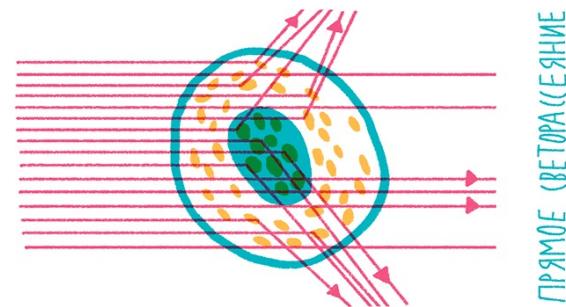


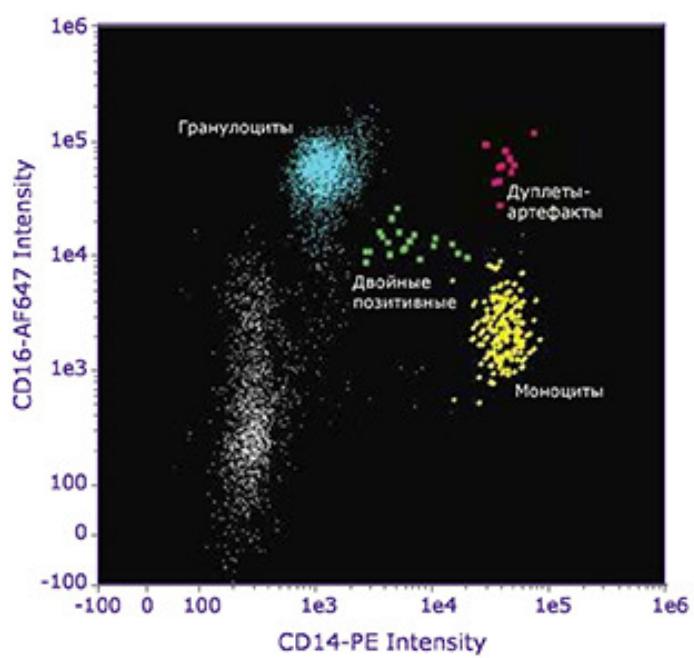
Иллюстрация функции длинноволновых пропускающих (Longpass; LP), коротковолновых пропускающих (Shortpass; SP) и полосовых (Bandpass; BP) фильтров.

Длинноволновые пропускающие фильтры **блокируют** свет до определенной длины волны. Коротковолновые пропускающие фильтры **пропускают** свет до определенной длины волны. Полосовые фильтры пропускают свет в **определенном** диапазоне длин волн.



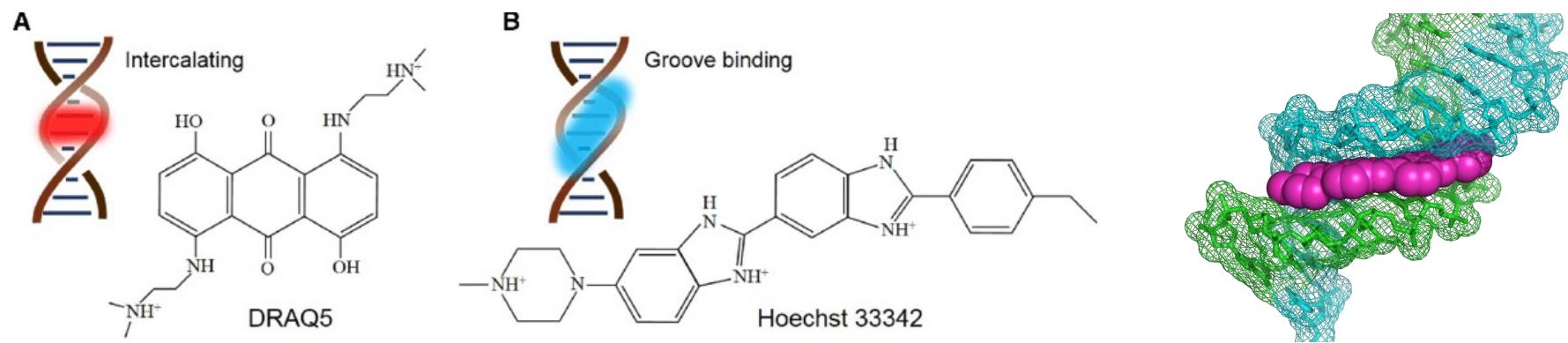
БОКОВОЕ СВЕТОРАССЕЯНИЕ





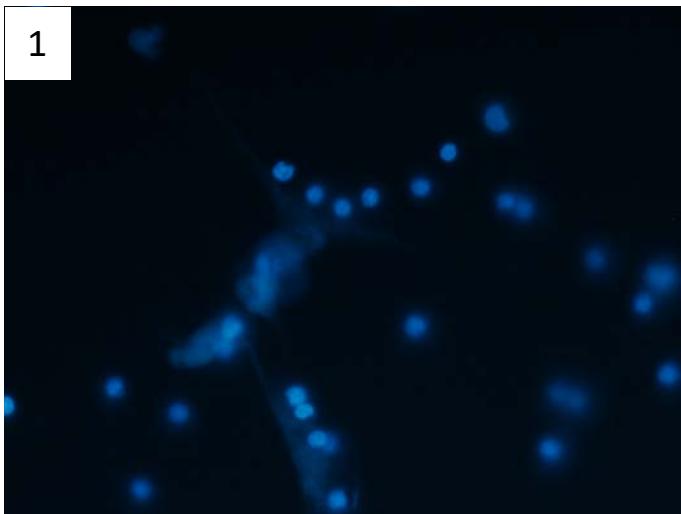
Использование красителей для оценки содержания ДНК

Пропидий йодид (PI) и 7-аминоактиномицин D (7-AAD) - способны интеркалировать в ДНК
ZombieRed – способен связываться с аминогруппами белков

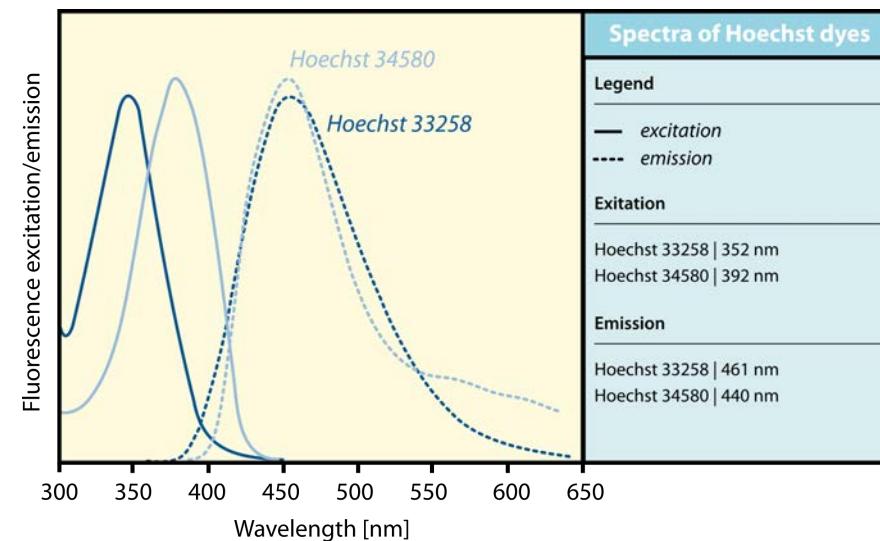
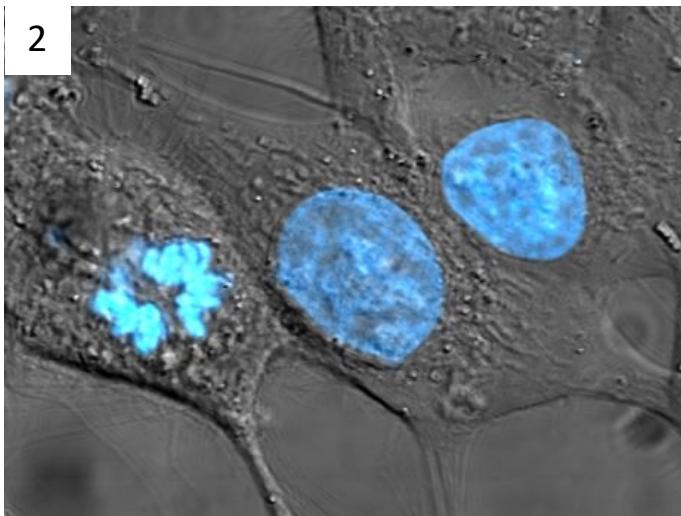


Hoechst 33258 (пурпурный) связан с малой бороздкой ДНК
Усиленная флуоресценция при связывании с АТ-богатыми участками

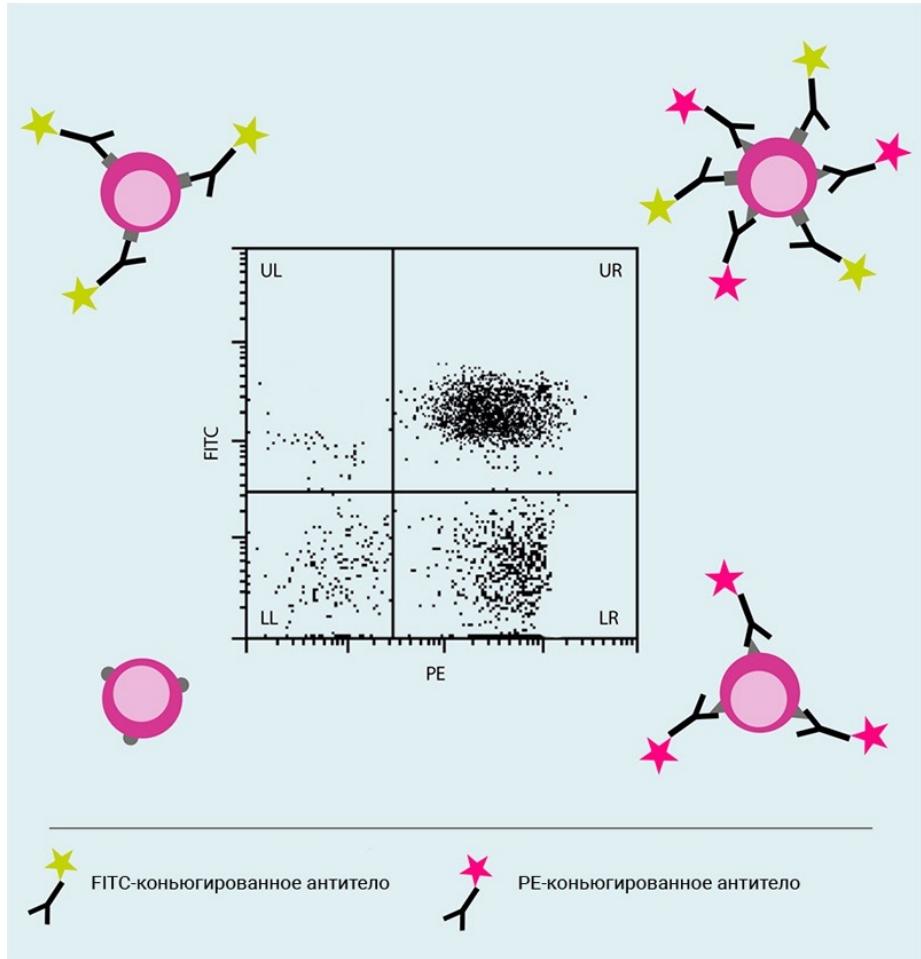
1



2



1. Флуоресцентное изображение культивируемых нейтрофилов из крови человека с болезнью Альцгеймера. Образец был обработан красителем Hoechst 33342. Видно высвобождение ДНК нейтрофилом в виде туманной области в центре поля зрения.
2. Трансмиссионное изображение клеток HeLa с наложением окрашивания Hoechst 33258 (синий). Крайняя левая клетка находится в стадии митоза - хромосомы ярко флуоресцируют, потому что они содержат сильно уплотненную ДНК.

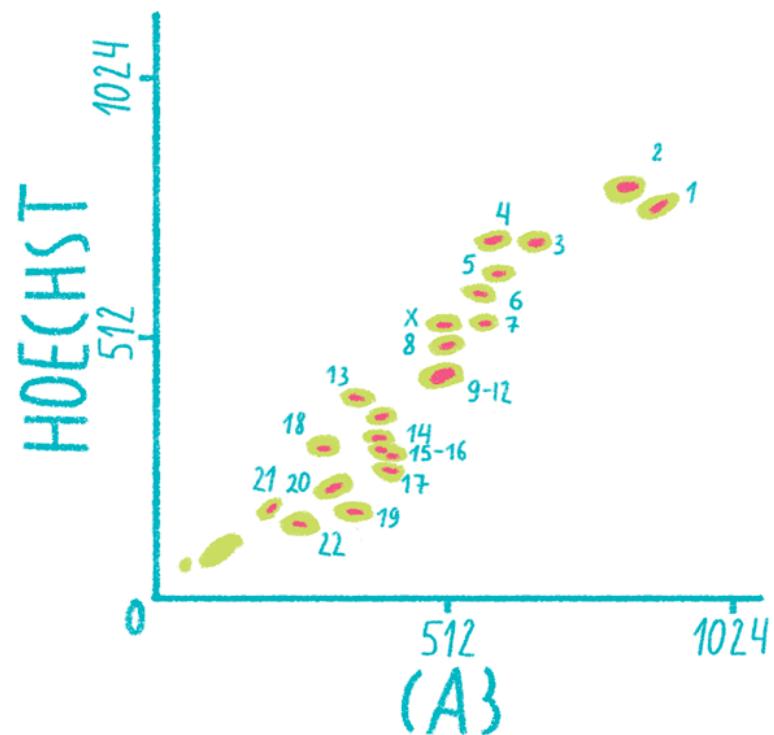


Точечная диаграмма, отображающая
интенсивность двух параметров
флуоресцентных сигналов

Двумерные точечные диаграммы
позволяют одновременно визуализировать
два оптических параметра.

С использованием антител,
конъюгированных с флуорохромами FITC и
PE выявлены 4 клеточные популяции.

Исследование кариотипа с помощью проточной цитометрии



Кариотип здорового человека (женщины)

Хромосомы окрашены красителями Hoechst 33258 и хромомицином А3 (CA3).

Двойное окрашивание для лучшего разрешения:

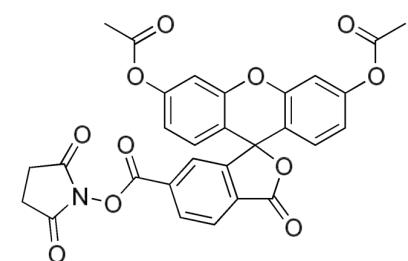
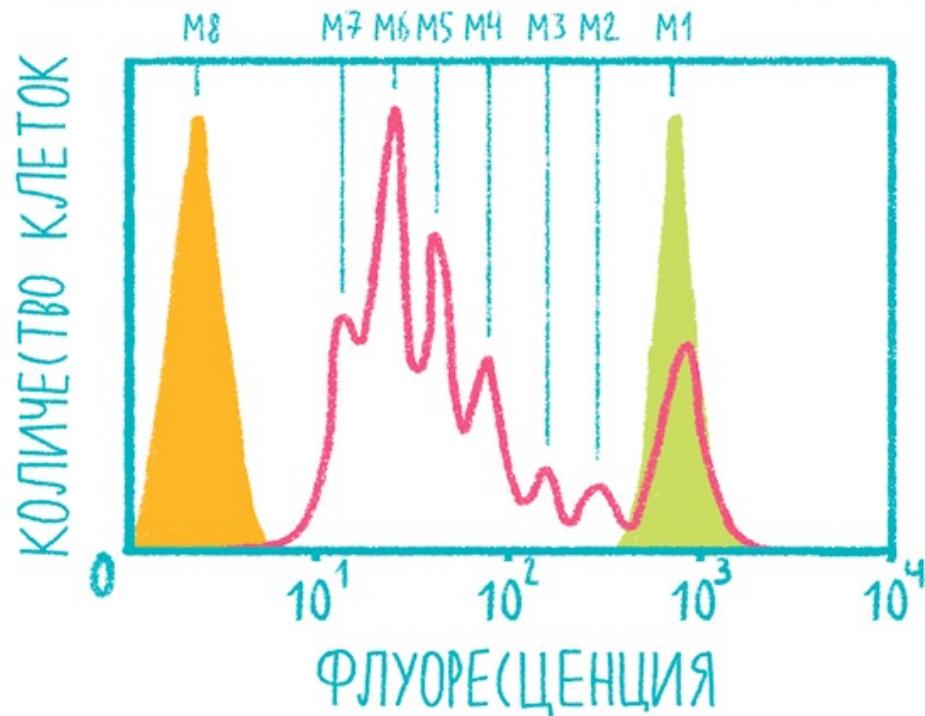
Hoechst 33258 связывается с AT-, а хромомицин А3 с GC- богатыми областями.

Проточная цитометрия для анализа клеточного цикла

- **Выявление клеток в различных фазах клеточного цикла (G1/G0, S и G2/M)** по изменению количества ДНК с помощью ДНК-связывающих флуоресцентных красителей (PI, 7-AAD и т.д.).
- **Определение числа пролиферирующих клеток.** Например, по включению меченого урацила (BrdU) в ДНК в S-фазе.
- **Определение содержания циклинов** (повышается при активной пролиферации) с помощью конъюгированных с флуорохромами моно克лональных антител к циклинам D, E, A или B. (Рекомендуется параллельно провести окраску красителем типа PI).
- **Изучение динамики пролиферации клетки.** Предварительная обработка флуоресцентным красителем, который связывается с белками цитоплазмы. После каждого последующего митоза его содержание в дочерней клетке становится вдвое меньше, чем в родительской.

Анализ циклов пролиферации клеток

НЕОКРАШЕННЫЕ КЛЕТКИ, ПРОЛИФЕРИРУЮЩИЕ КЛЕТКИ НЕДЕЛЯЩИЕСЯ КЛЕТКИ

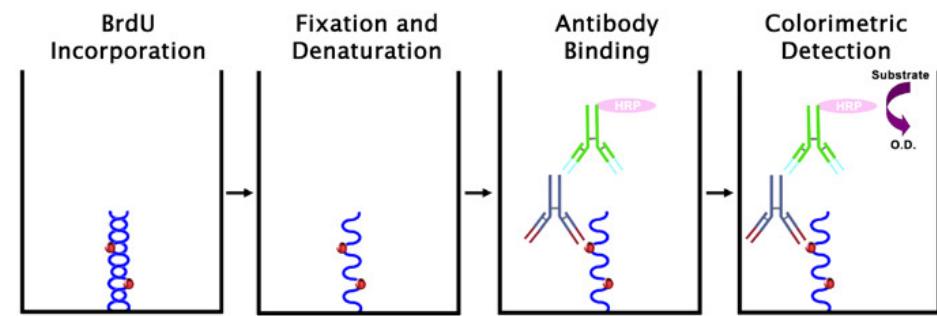
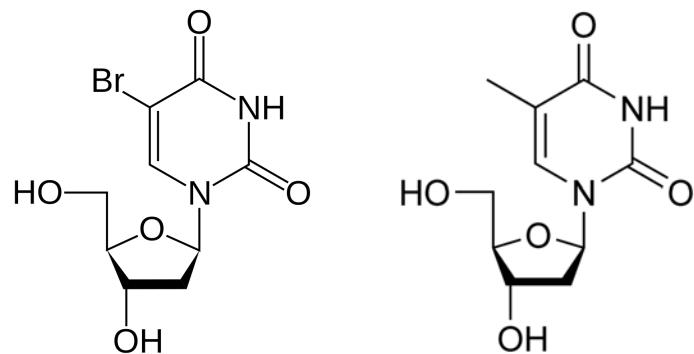


К культуре клеток добавлен краситель на основе карбоксифлуоресцина (CFSE), способный ковалентно связывается с белками цитоплазмы делящихся клеток.

М1, М2 и тд. – пики митозов.

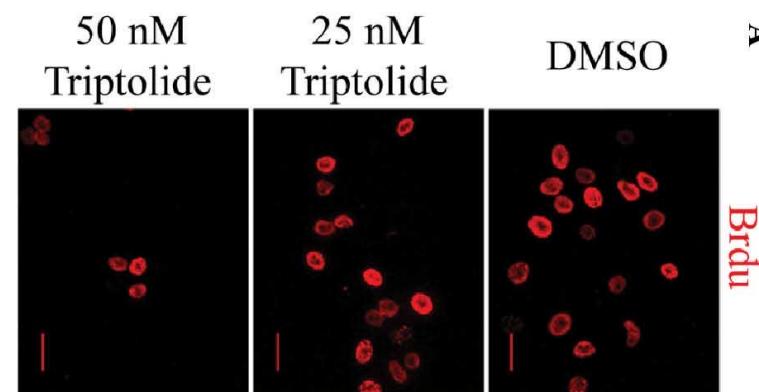
Каждый следующий пик находится левее предыдущего, поскольку соответствует вдвое снижающейся интенсивности флуоресценции при каждом митозе.

Бромдезоксиуридин (5-бромо-2'-дезоксиуридин) (Bromodeoxyuridine), БДУ (BrdU)



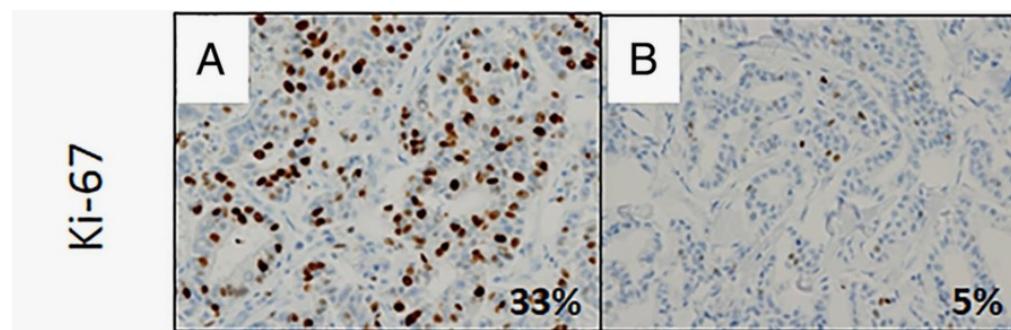
Во время S-фазы BrdU способен заменять тимидин в процессе репликации ДНК.

Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к бромдезоксиуридину позволяют обнаружить пролиферирующие клетки.



Оценка деления клеток с помощью белка Ki-67

- Выявление маркера Ki-67 наиболее показательно при раке молочной железы.
- Целесообразно проведение анализа при раке любой локализации и при наличии доброкачественных новообразований с оценкой риска их злокачествления.
- Индекс Ki-67 – индекс пролиферативной активности, выраженный в процентах. При низких значениях индекса опухоль считается менее агрессивной, при высоких – высокоаггресивной.
- По индексу пролиферативной активности можно судить о возможном ответе опухолевого процесса на терапию, оценить эффективность уже проведенного лечения.

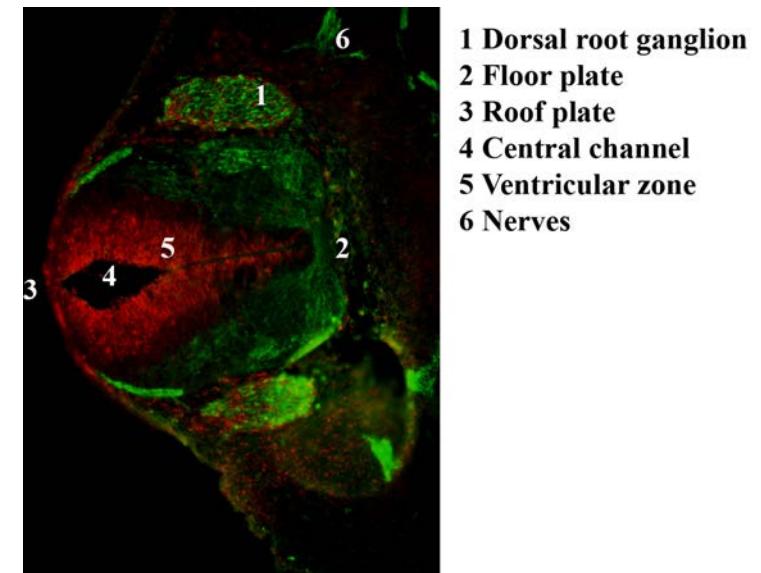


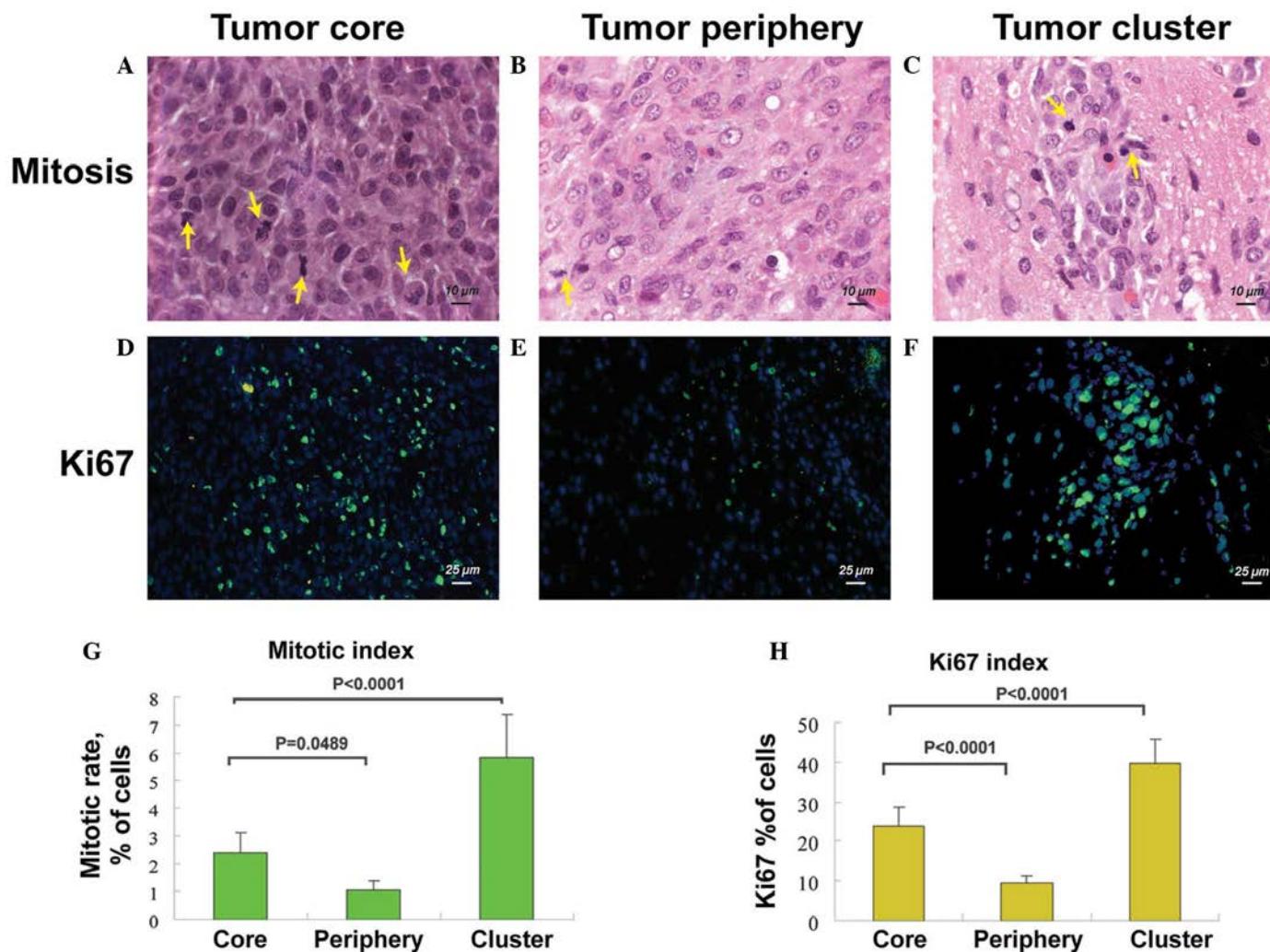
Оценка деления клеток с помощью белка Ki-67

- Ki-67 – маркер пролиферативной активности опухолевой клетки.
- Во время интерфазы антиген Ki-67 может быть обнаружен исключительно в ядре клетки, тогда как при митозе большая часть белка перемещается на поверхность хромосом.
- Белок Ki-67 присутствует во всех активных фазах клеточного цикла (G1, S, G2 и митоз), но отсутствует в покоящихся (покоящихся) клетках (G0).

Окрашивание иммунофлуоресцентными антителами против нейрофиламента (зеленый) и Ki-67 (красный) в эмбрионе мыши через 12,5 дней после оплодотворения.

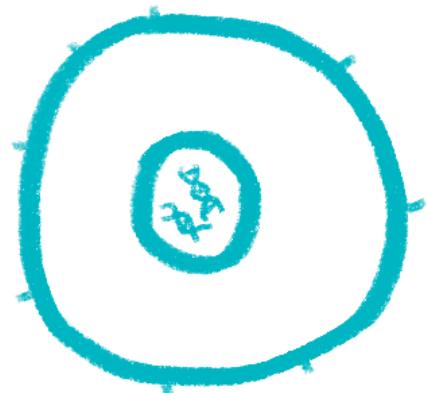
Пролиферирующие клетки находятся в желудочковой зоне нервной трубки и поэтому окрашены в красный цвет.



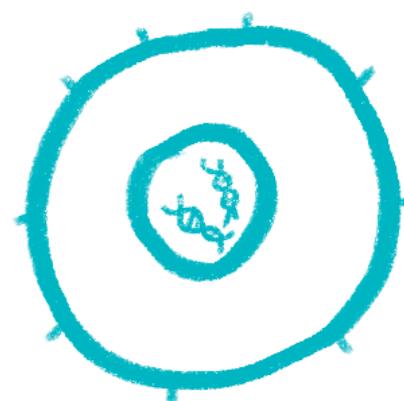


Выявление некроза (красители типа PI, 7-AAD и Zombie)

ДНК-КРАСИТЕЛИ



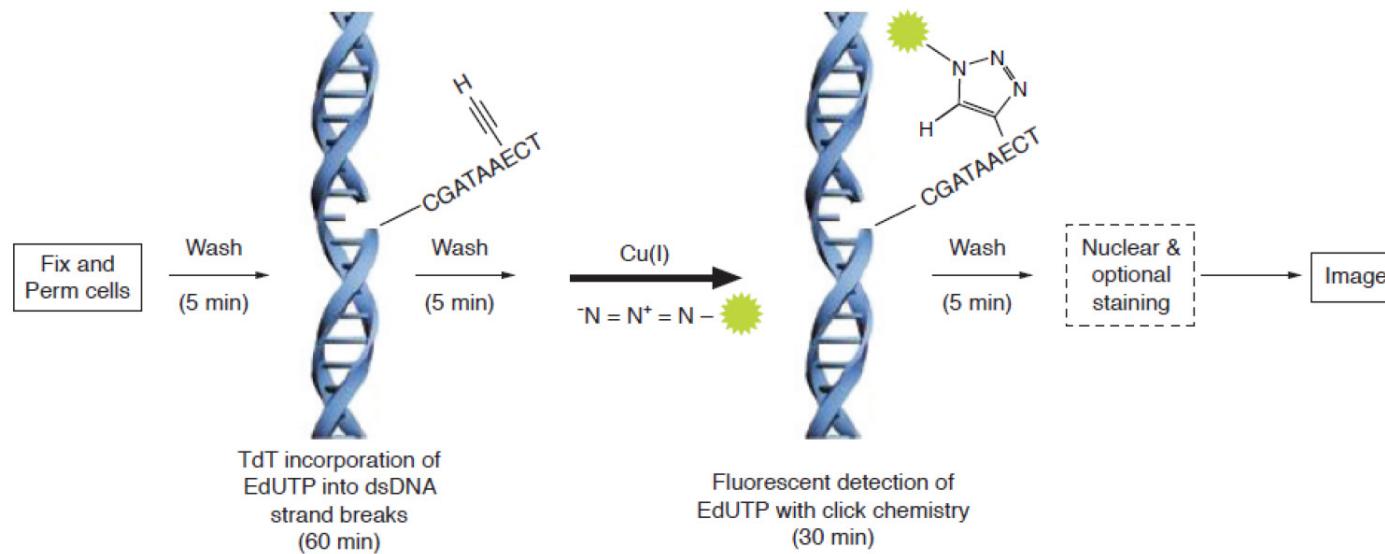
ЗОМБИ



Мембрана живых клеток непроницаема для этих красок. Они связываются только с белками на поверхности (сигнал при измерении на цитометре слабый).

Мембрана некротических клеток проницаема - Zombie связывается и с внутриклеточными белками (флуоресценция гораздо ярче).

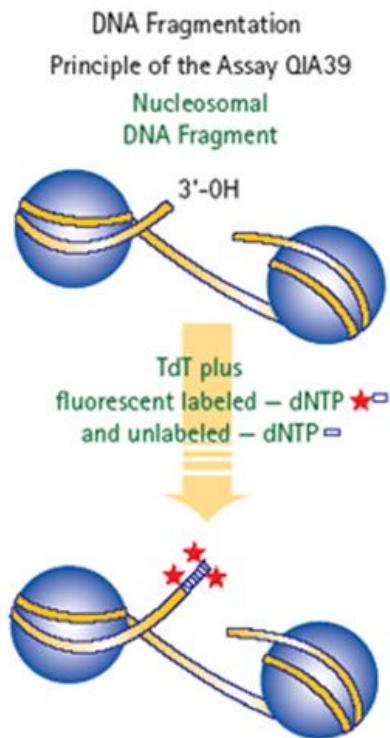
TUNEL — метод обнаружения фрагментации ДНК путем мечения концов в двухцепочечных разрывах ДНК, образующихся при апоптозе



Терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза (TdT) катализирует прикрепление дезоксинуклеотидов, меченных флуорохромом, к 3'-гидроксильным концам двухцепочечных разрывов ДНК.

TUNEL assay

(TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling)
TdT=Terminal deoxynucleotidyl transferase



Терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза (TdT)

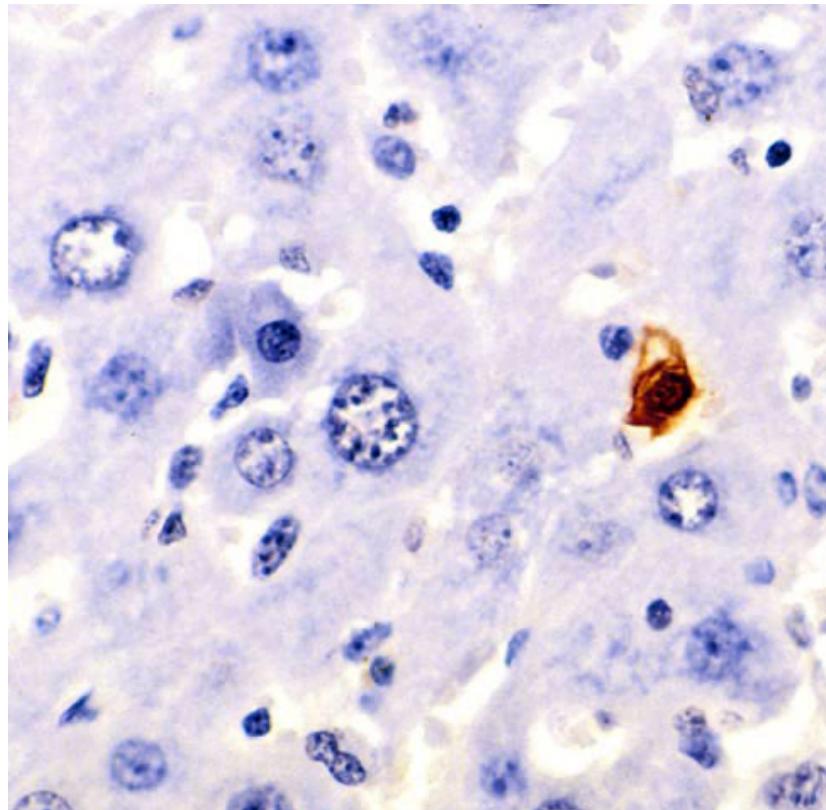
=

кДНК-нуклеотидилэксотрансфераза (DNTT)

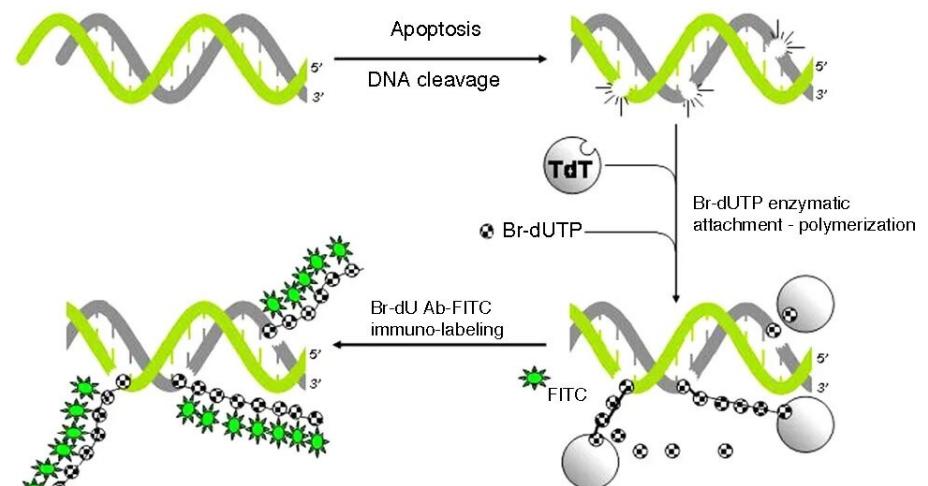
=

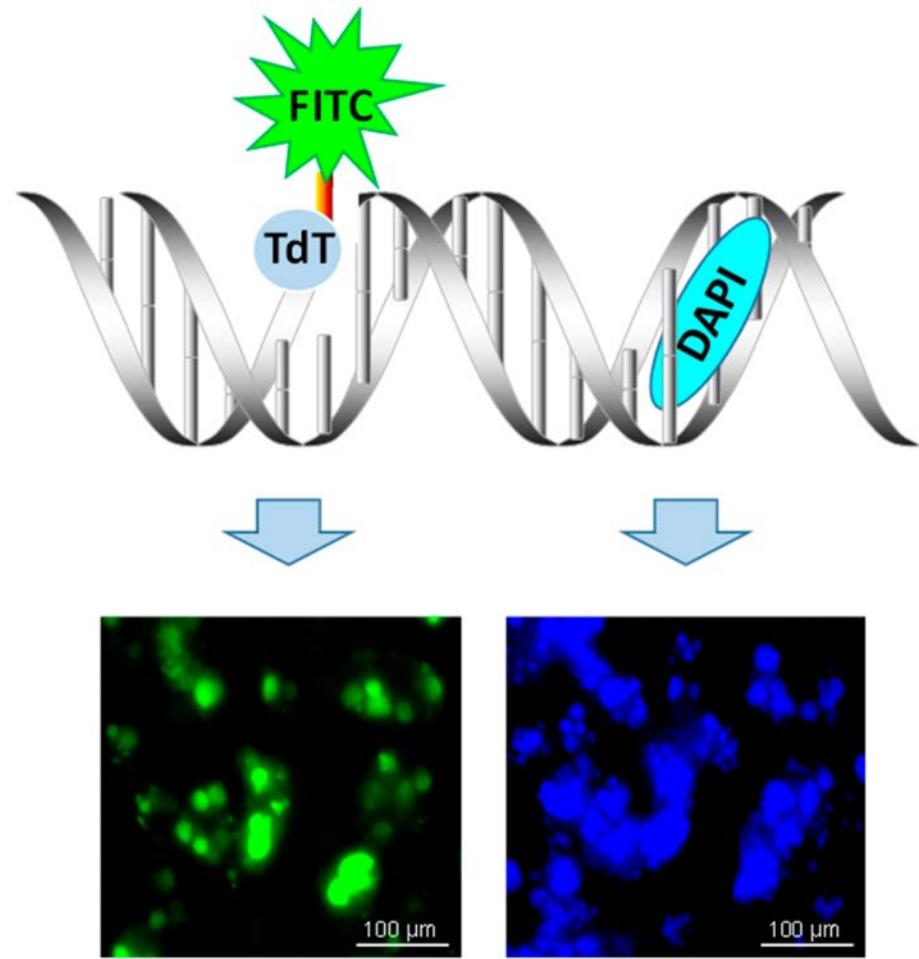
терминальная трансфераза,

- специализированная ДНК-полимераза, экспрессируемая в незрелых, pre-B, pre-T лимфоидных клетках и клетках острого лимфобластного лейкоза/лимфомы.



Печень мыши.
Апоптотическая клетка окрашена TUNEL

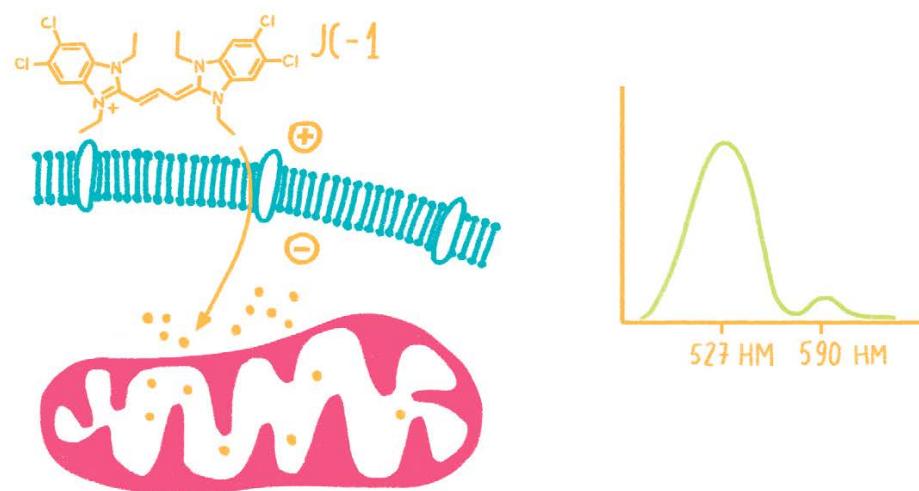




Исследования апоптоза с помощью проточной цитометрии

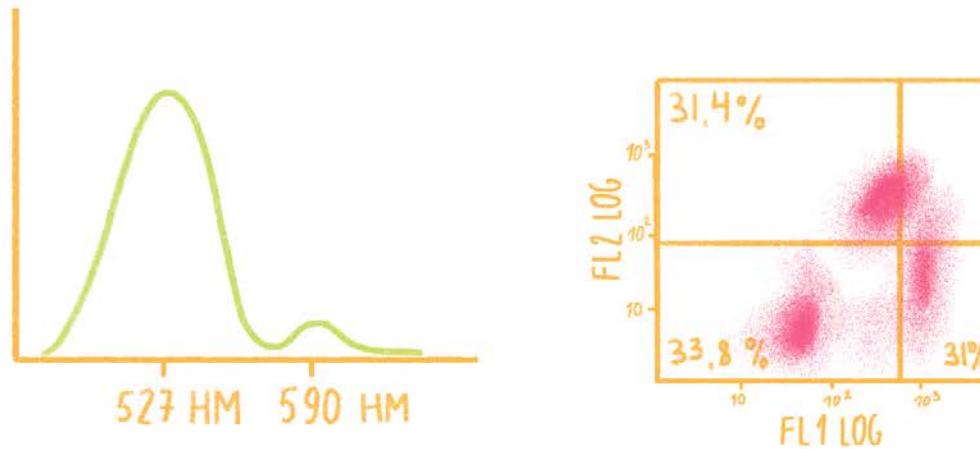
- **Исследование нарушения работы митохондрий** по выбросу в цитоплазму проапоптотических факторов (например, цитохрома c) и изменению трансмембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$) (фиксируется при помощи флуоресцентных катионных красителей).
- **Исследование превращения прокаспаз в каспазы и экспрессии белков-регуляторов** (например, PARP). По связыванию антител и ингибиторов каспаз.
- **Исследование деградации ядерной оболочки (образование апоптотических телец) и фрагментации хроматина.** Красители типа YO-PRO, Hoechst и PI (по отдельности или в комбинации) проникают в клетки при нарушении целостности клеточной мембраны и позволяют судить о наличии апоптотических и некротических клеток.
- **Оценка фрагментации ДНК** (на фрагменты около 200 п.н.— «*sub-G1 фракция*»). Окраска PI позволяет оценить фрагментацию, характерную для апоптоза.
- **Оценка миграции фосфолипида фосфатидилсерина на наружную поверхность плазмалеммы.** Регистрация фосфатидилсерина при помощи белка аннексина V, конъюгированного с флуорохромами.

Изменение трансмембранных потенциала митохондрий ($\Delta\Psi_m$) - ранний маркер апоптотических процессов



Определение $\Delta\Psi_m$ митохондрий с анионным красителем JC-1
(5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазоликарбоцианин йодид).

Липофильный JC-1 проникает через мембрану и накапливается в местах с повышенным содержанием протонов, формируя скопления — J-агрегаты. J-агрегаты флуоресцируют более красным светом с длиной волны 590 нм. При деполяризации митохондриальной мембраны (снижение $\Delta\Psi_m$) — J-агрегаты вновь распадаются, и JC-1 выходит в цитоплазму с соответствующим спектральным сдвигом.

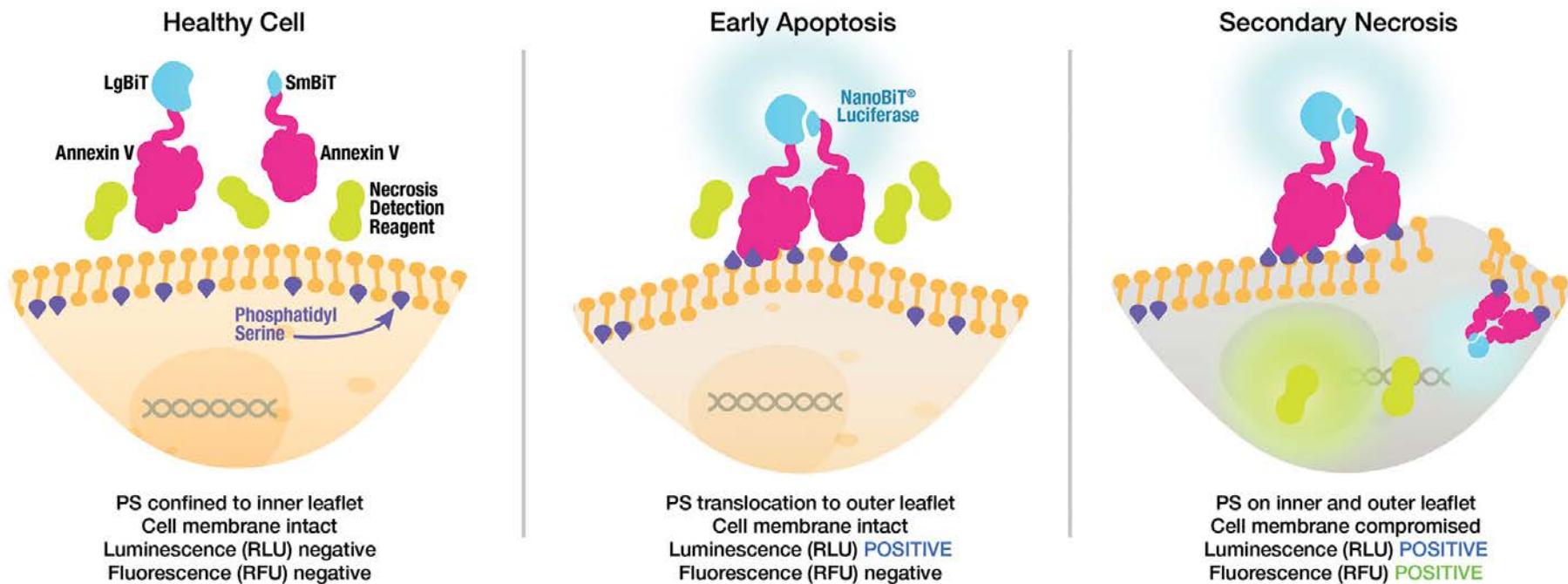


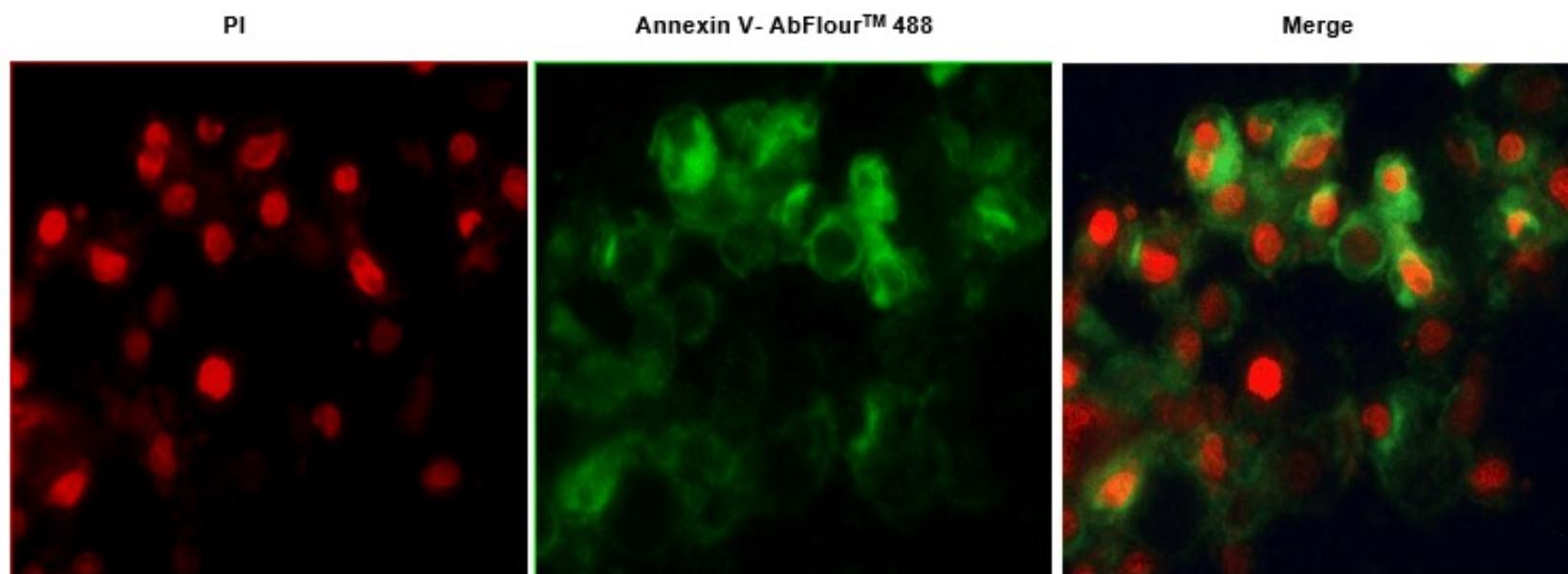
Двумерная диаграмма с проточного цитометра.

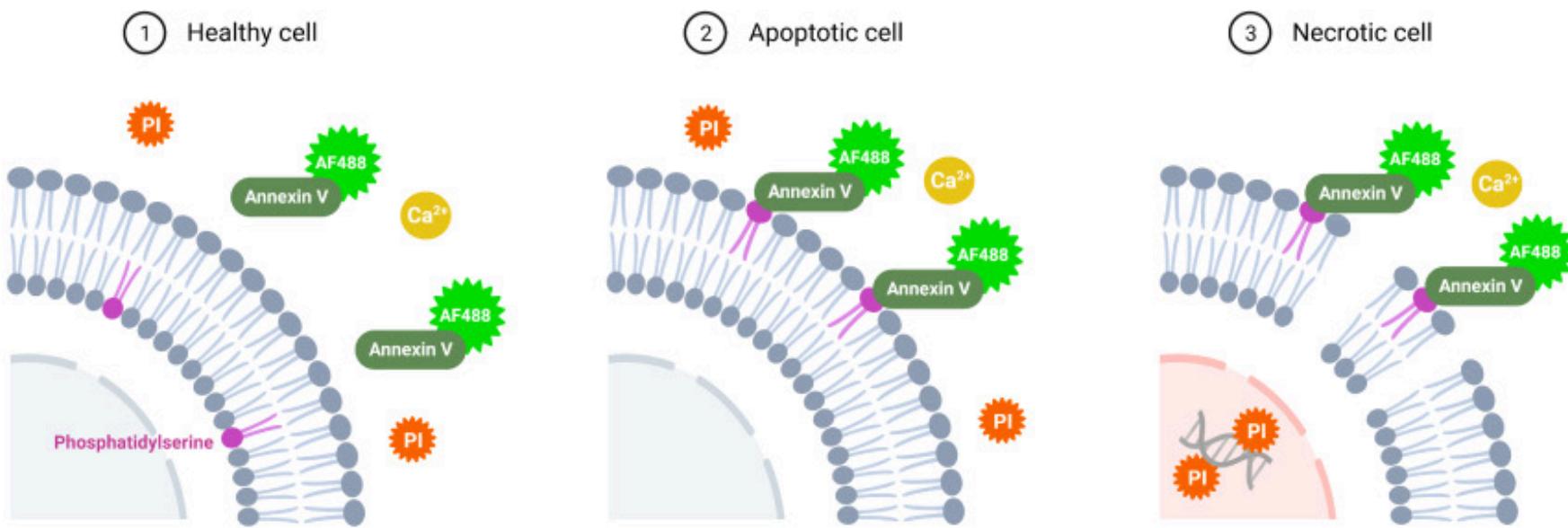
По осям — флуоресценция в каналах FL-1 (зеленая, соответствует мономерным формам JC-1) и FL-2 (красная, J-агрегаты). Около трети исследуемых клеток не содержит красителя, а клетки, в которых он есть, равновероятно содержат мономерную и агрегированную формы JC-1 (тоже около 1/3).

Таким образом, популяции апоптотических и здоровых клеток примерно равны.

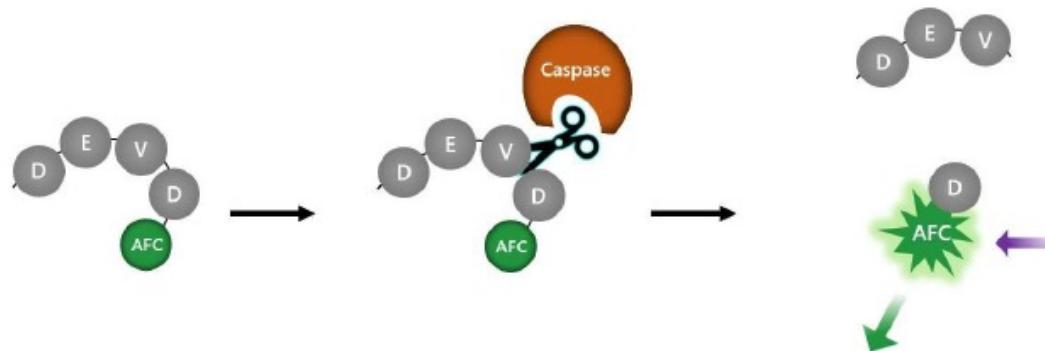
Аннексин А5 (аннексин V) — клеточный белок.
В проточной цитометрии используется для обнаружения апоптотических клеток по его способности связываться с фосфатидилсерином (маркером апоптоза), когда он находится во внешнем слое плазматической мембраны.







Каспазные тесты

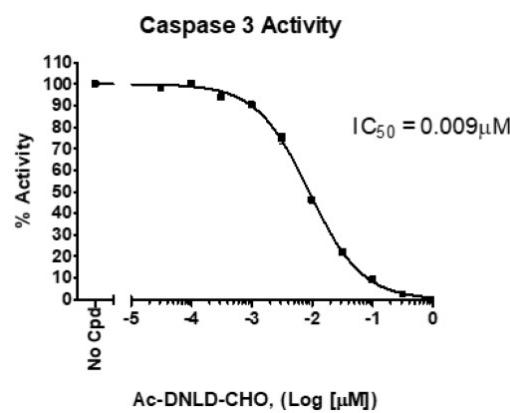
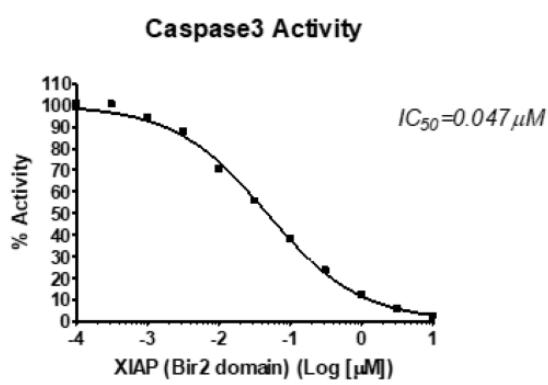


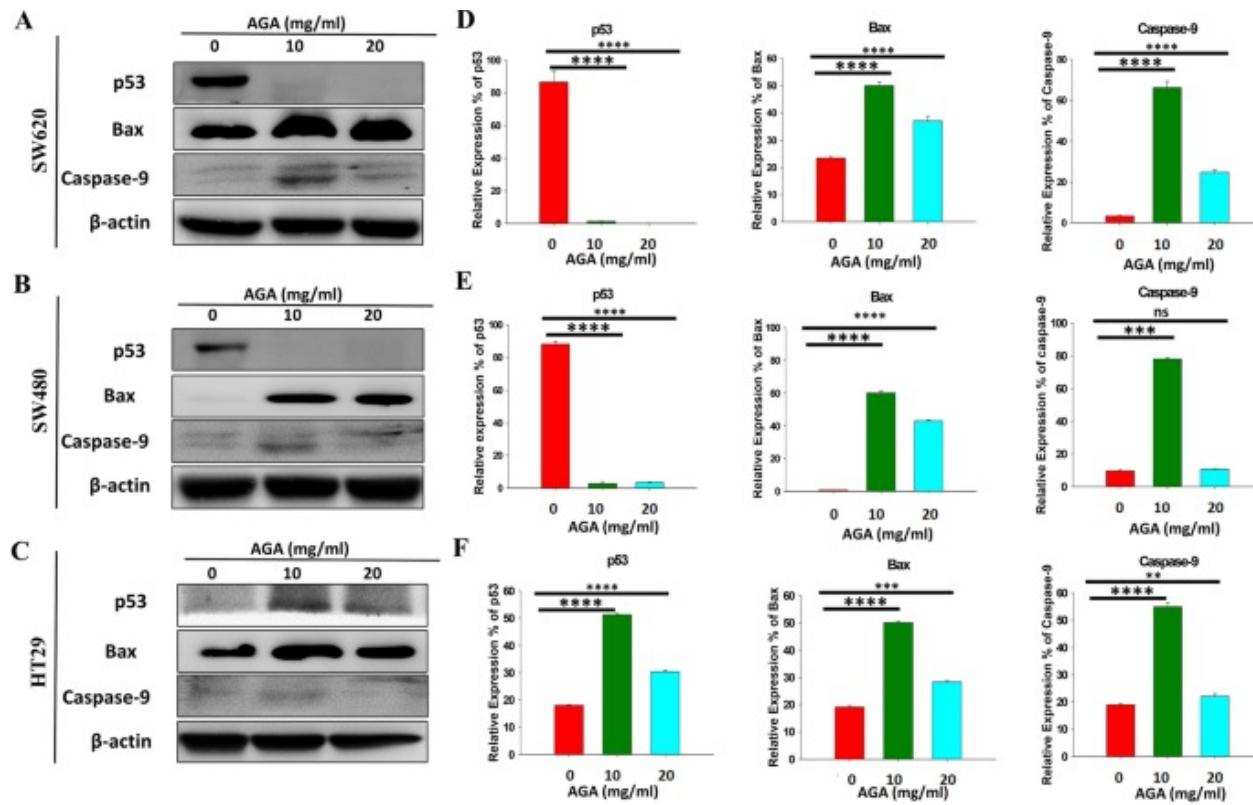
Обнаружение расщепления субстрат-AFC
(AFC: 7-амино-4-трифлуорометил кумарин).

Субстрат-AFC излучает синий свет ($\lambda_{\text{max}} = 400 \text{ нм}$).

Свободный AFC излучает жёлто-зелёную флуоресценцию ($\lambda_{\text{max}} = 505 \text{ нм}$), которую можно количественно определить флуориметрически.

Тест позволяет обнаружить ранние и средние стадии апоптоза, а также отличить апоптоз от некроза.





Impact of AGA extract on the expression of apoptosis regulators in colon cancer cells. Immunoblot analysis of p53, Bax, and caspase-9 in AGA extract (0 mg, 10 mg, and 20 mg)-treated (**A**) SW620, (**B**) SW480, and (**C**) HT29 cells for 72 h. β-actin: loading control. **D-F** Quantified expression percentage of apoptosis regulator proteins obtained **A-C**. Data are expressed as mean fold induction \pm SD of three independent experiments. *p* values were determined by one-way ANOVA. * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01, and *** *p* < 0.001

ЖИВАЯ КЛЕТКА



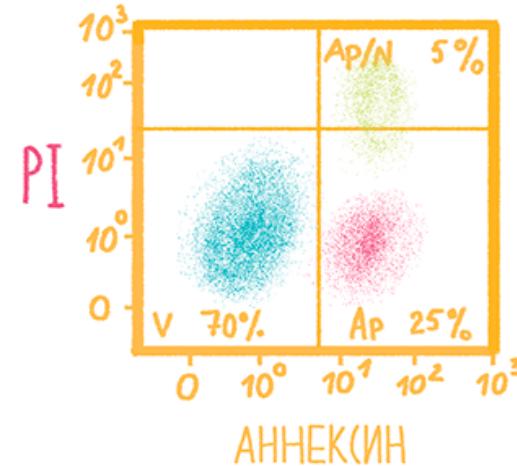
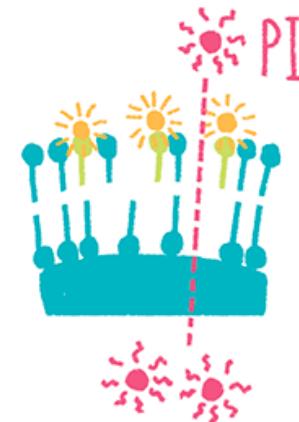
АПОПТОЗ

АННЕКСИН

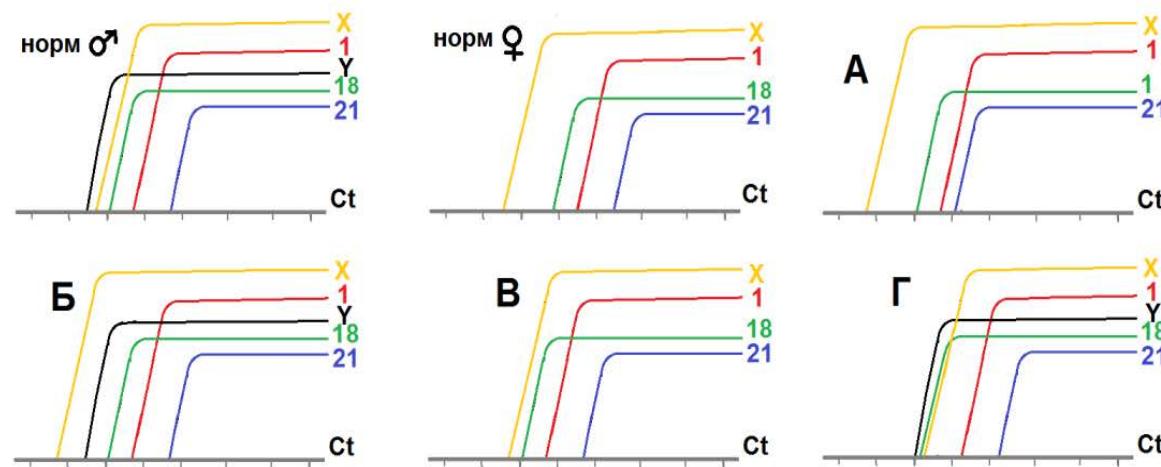


ПОЗДНИЙ АПОПТОЗ

PI



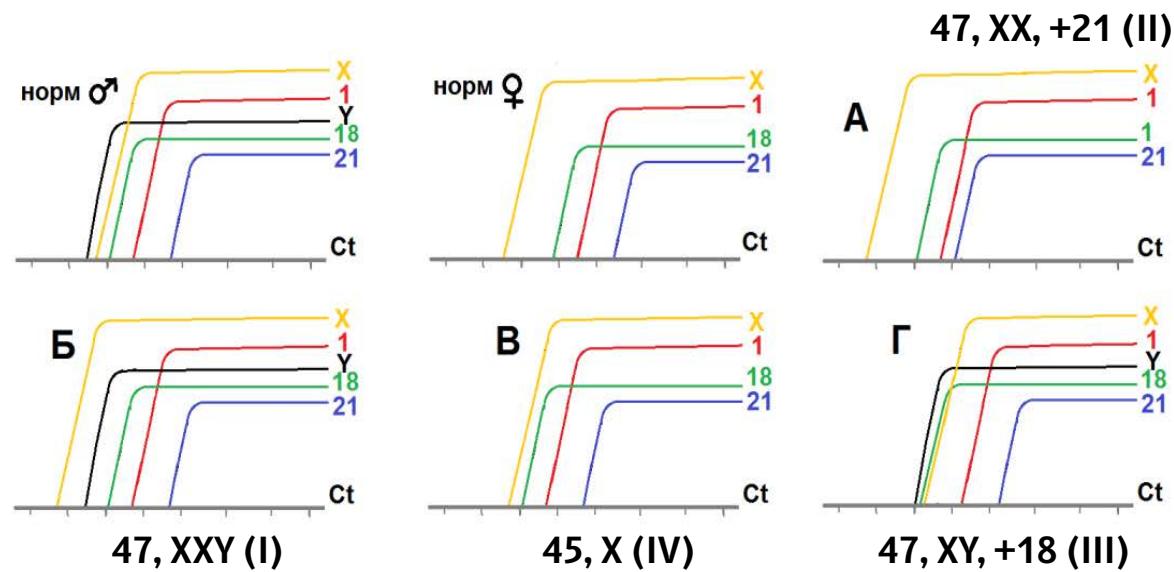
ПЦР в реальном времени (RT-PCR)



Половые хромосомы



ПЦР в реальном времени (RT-PCR)



Половые хромосомы



СИНДРОМЫ:

I Кайнфельтера



II Дауна

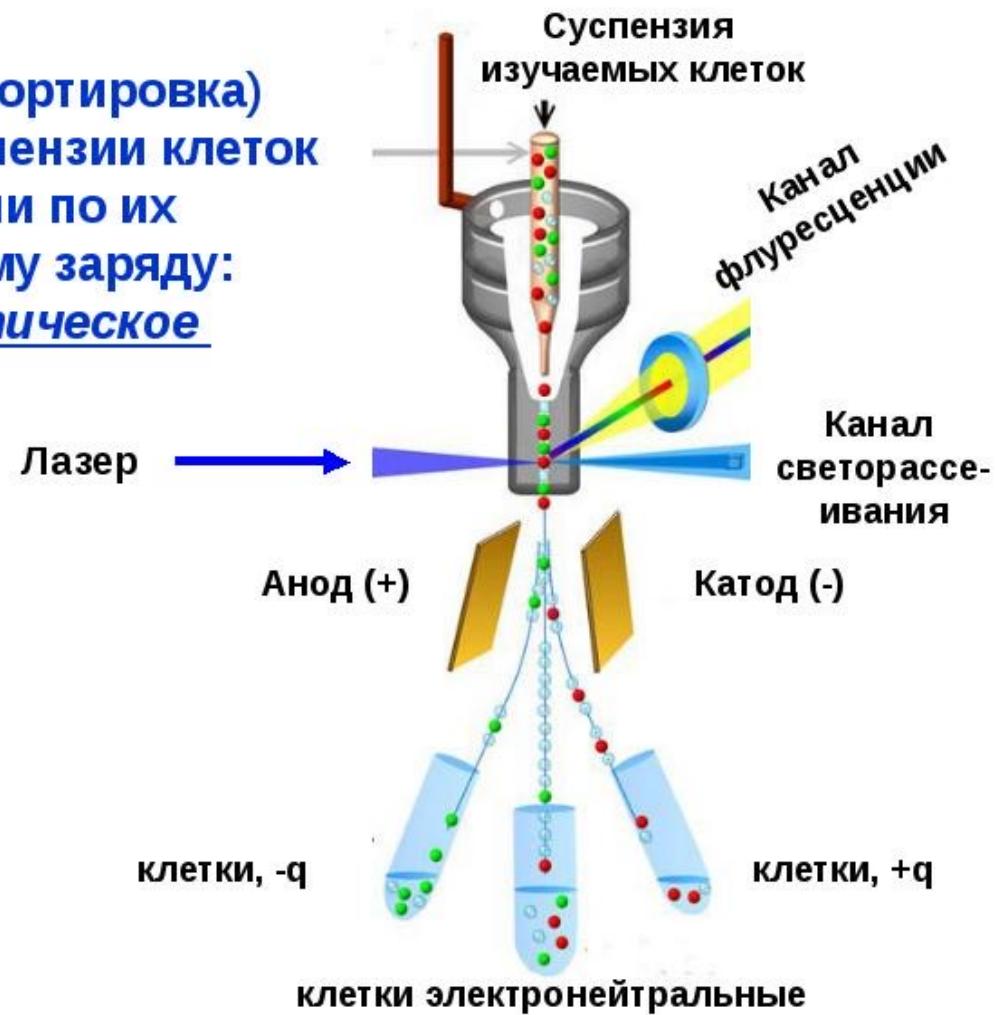


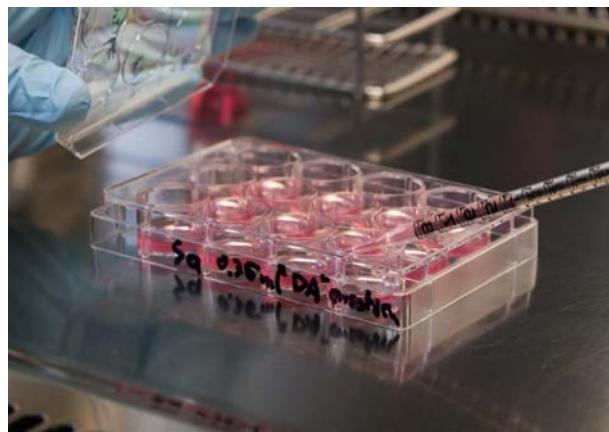
III Эдвардса

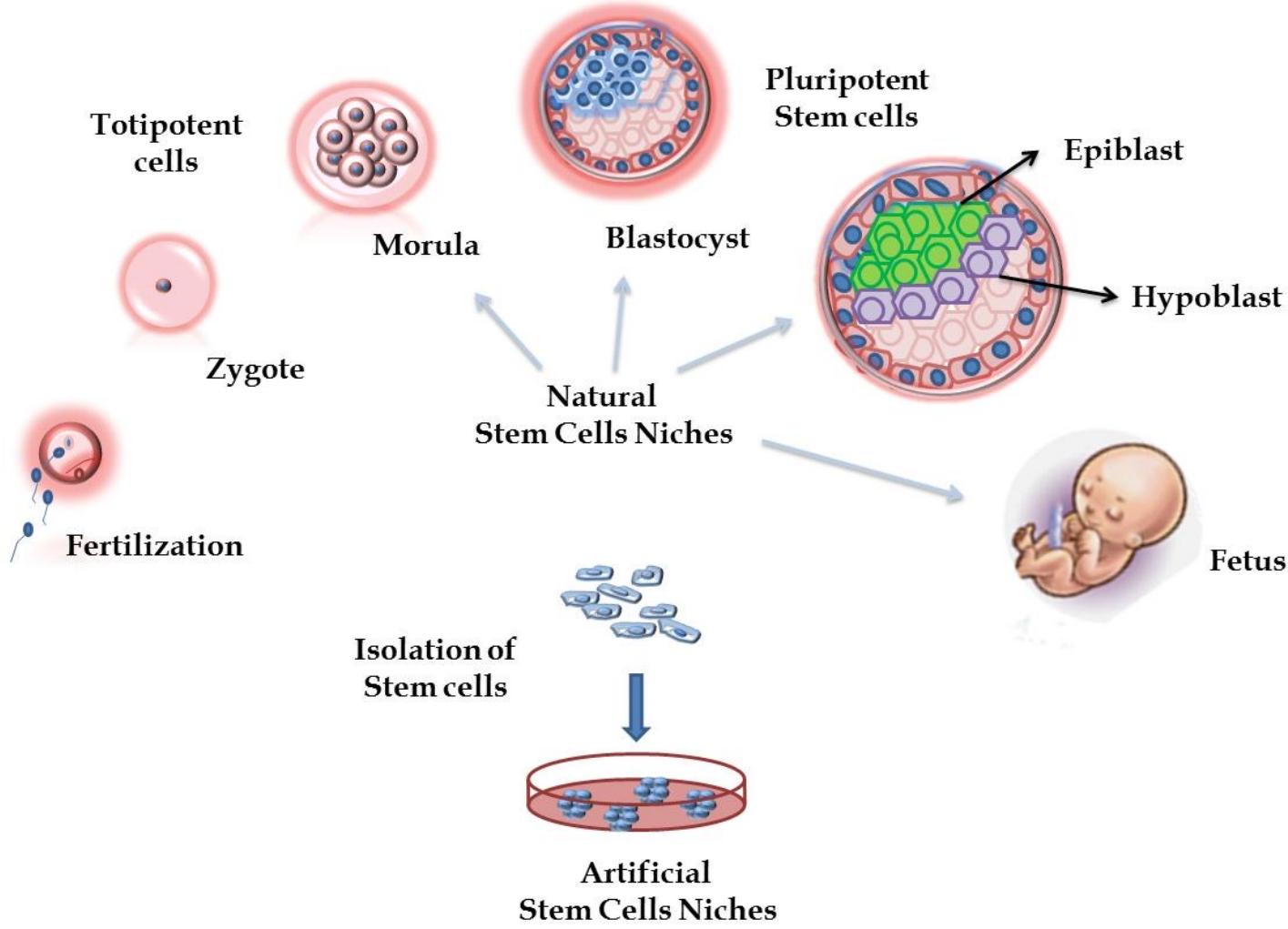


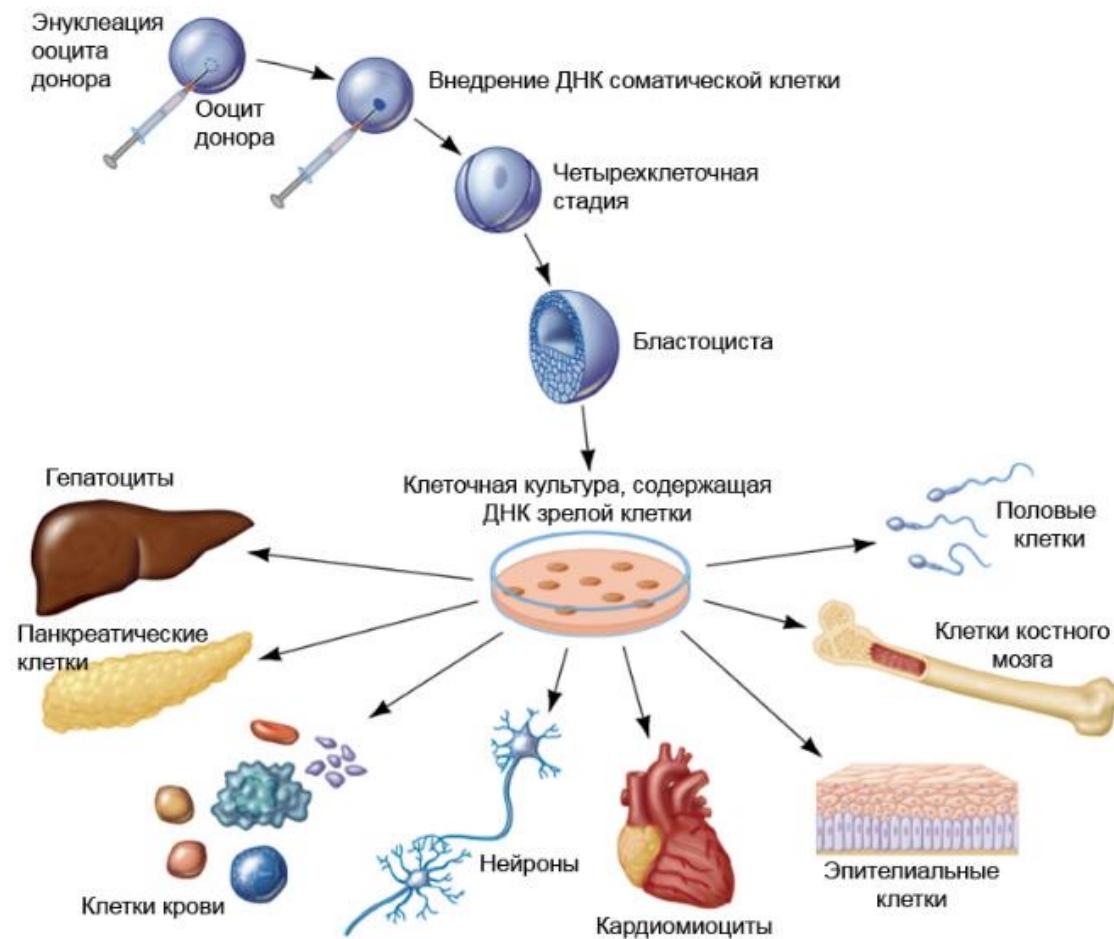
IV Шершевского-Тернера

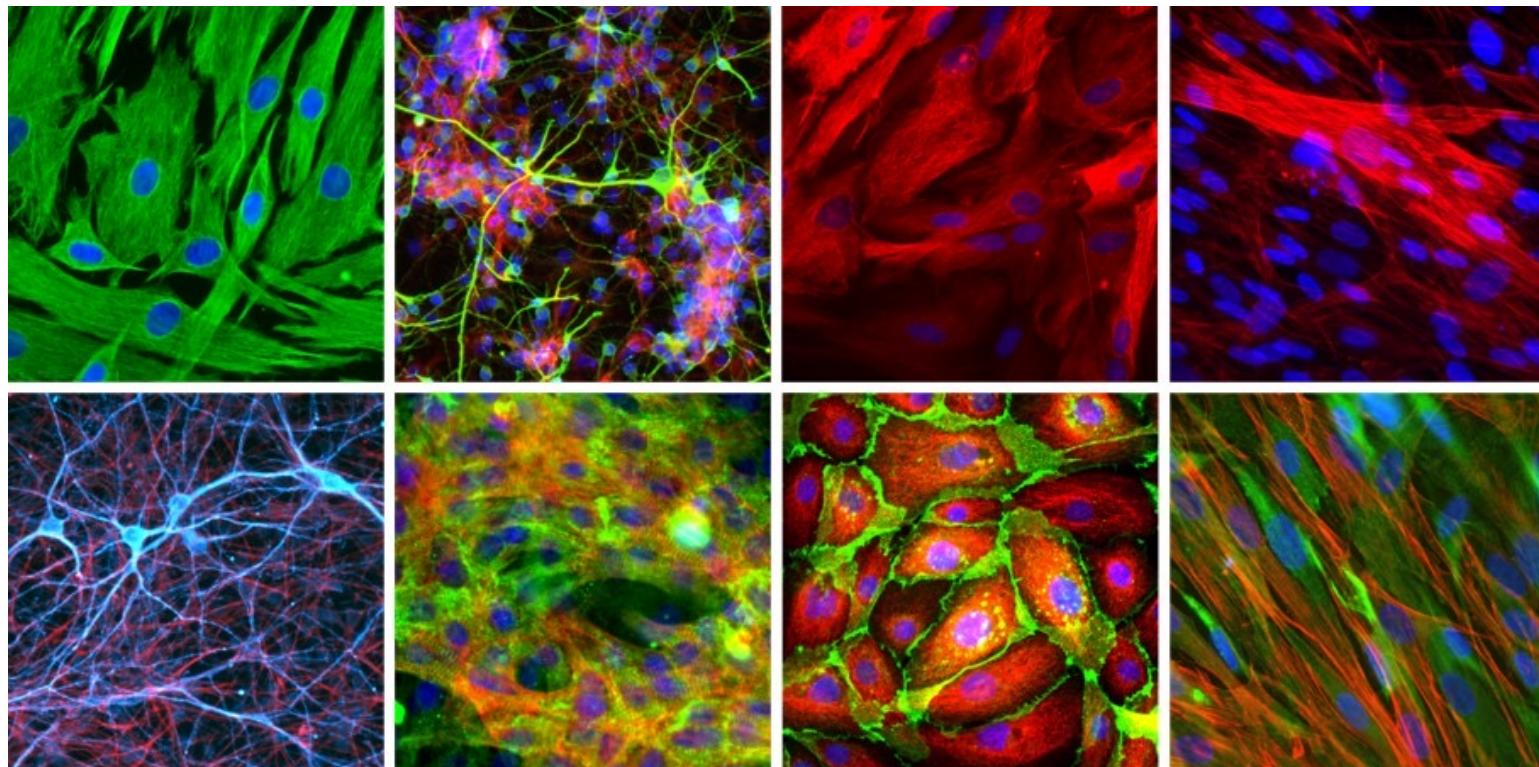
Разделение (сортировка) исходной суспензии клеток на три фракции по их электрическому заряду: электростатическое отклонение











Клеточный цикл и терапия

Точки приложения таргетной терапии в онкологии

- **Молекулы, отвечающие за процесс естественной смерти клеток.** Препарат вызывает гибель опухолевых клеток.
- **Рецепторы к факторам роста.** Терапия мешает клеткам опухоли расти, ограждая их от сигналов к росту, предназначенных для здоровых клеток.
- **Гены, регулирующие рост раковой опухоли.** Таргетный препарат разрабатывается прицельно под конкретную мутацию в заданном гене. Перед лечением проводится обязательное генетическое исследование биоптата из опухоли.

Таргетное воздействие происходит в разных направлениях:

- снижение чувствительности опухолевых клеток к факторам роста;
- блокировка молекул, отвечающих за деление клеток опухоли;
- ликвидация защиты опухолевых клеток от иммунитета;
- стимуляция саморазрушения опухолевых клеток, апоптоза.

Способы уничтожения опухолевых клеток

- Подавление роста сосудов опухоли. Для роста опухоль продуцирует стимуляторы ангиогенеза. Таргетный препарат подавляет активность этих веществ.
- Остановка роста и разрушение раковых клеток через нарушение каскада химических реакций.
- Помощь иммунной системе в распознавании злокачественной опухоли.

Основные разновидности препаратов для таргетной терапии рака:

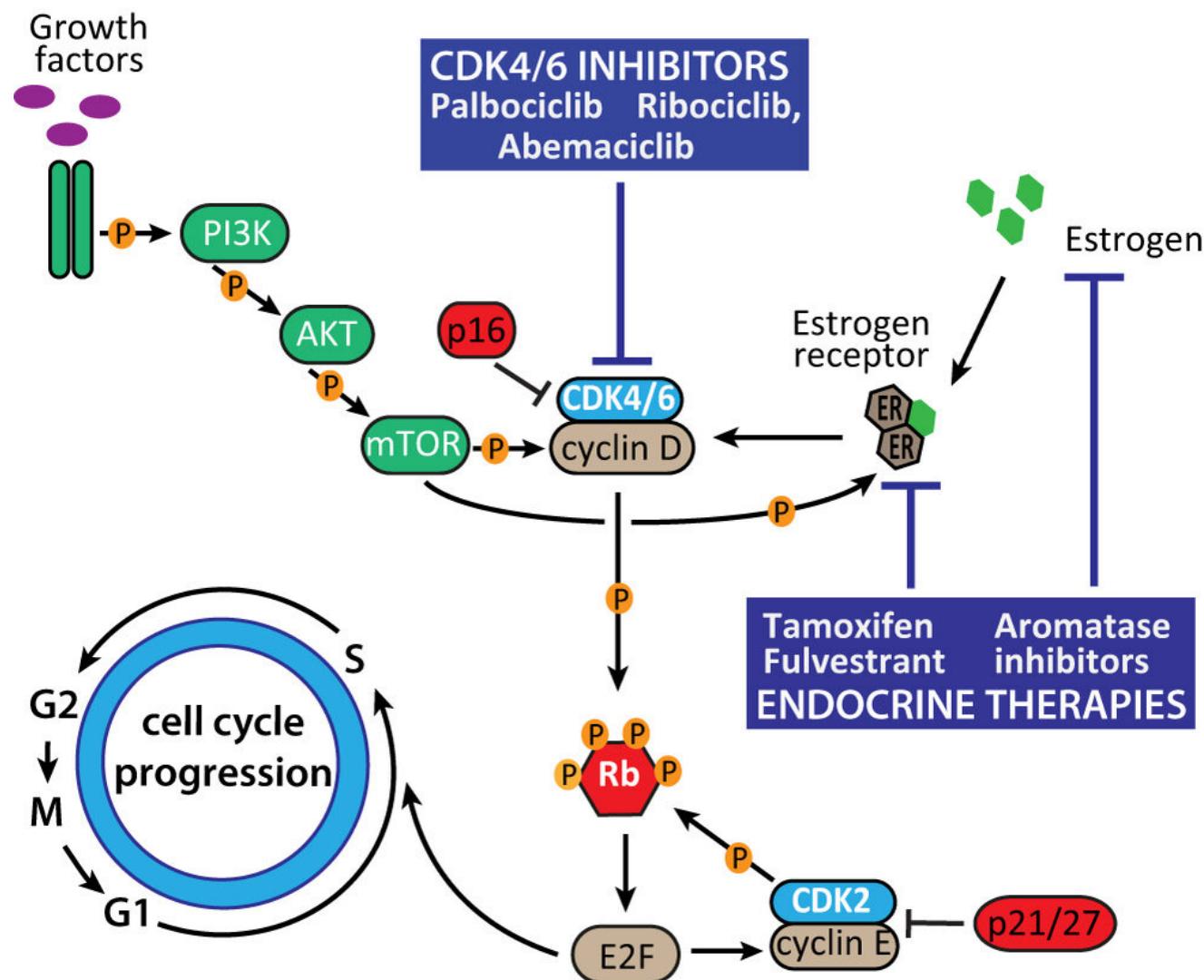
- **Малые молекулы.** Низкомолекулярные органические соединения, способные проникать в клетку, действуя на мишени и предотвращая пролиферацию и жизнедеятельность опухолевой клетки (сорафениб, дабрафениб). Как правило, представлены в виде капсулных или таблетированных форм для приёма внутрь.
- **Моноклональные антитела.** Гуманизированные антитела, способные связываться с определёнными рецепторами на поверхности опухолевых клеток (трастузумаб - для лечения рака молочной железы, ритуксимаб – для лечения лимфом). Чаще всего представлены парентеральными формами и вводятся либо внутривенно, либо (реже) подкожно.

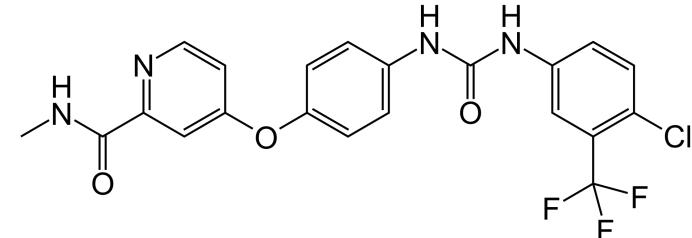
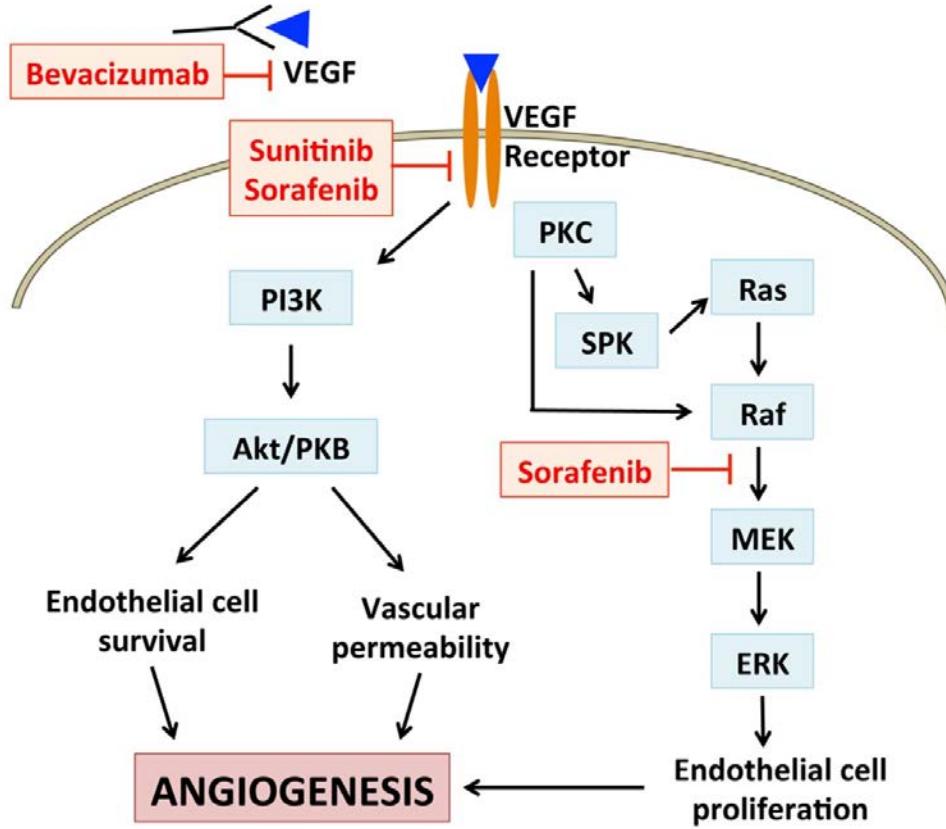
Ингибиторы циклин-зависимых киназ (CDK)

Ингибиторы CDK4/6: – рибоциклиб, палбоциклиб, абемациклиб

Эти киназы активируются при связывании с D-циклинами. При раке молочной железы с положительным статусом эстрогеновых рецепторов (ER+) комплекс циклин D1 и CDK4/6 способствует фосфорилированию белка ретинобластомы (Rb), прогрессированию клеточного цикла и пролиферации клеток.

Длительное воздействие абемациклиба в условиях *in vitro* ингибирует фосфорилирование Rb и блокирует прогрессирование клеточного цикла из фазы G1 в фазу S, что приводит к старению и апоптозу.





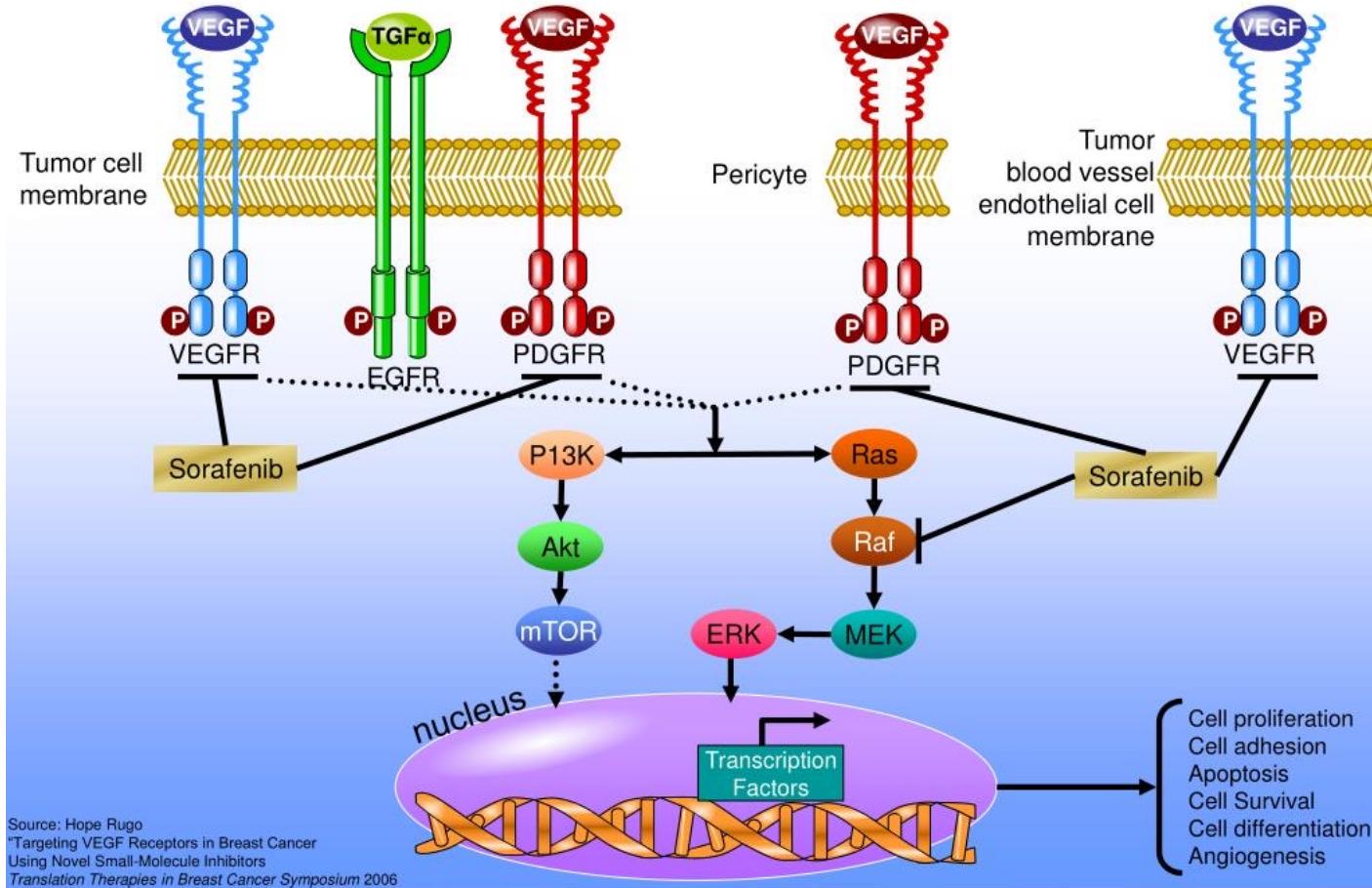
Сорафениб - низкомолекулярный мультикиназный ингибитор.

Снижает пролиферацию опухолевых клеток *in vitro*.

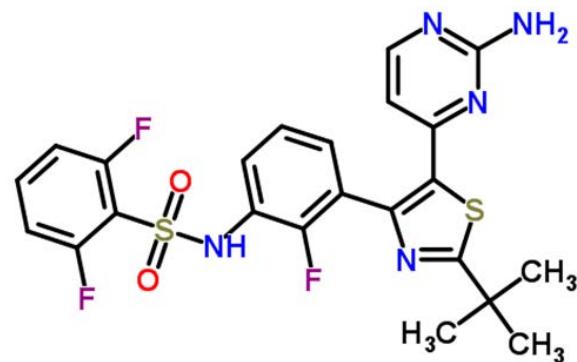
Подавляет внутриклеточные киназы (серин/треонинкиназы c-CRAF, BRAF и мутантную BRAF) и расположенные на поверхности клеток рецепторные тирозинкиназы.

Этих киназы играют ключевую роль в процессах ангиогенеза и апоптоза. В клинических испытаниях выявлено, что сорафениб подавляет рост опухоли при почечно-клеточном и печёночно-клеточном раке у человека.

Sorafenib: Mechanism of Action and Phase II Study

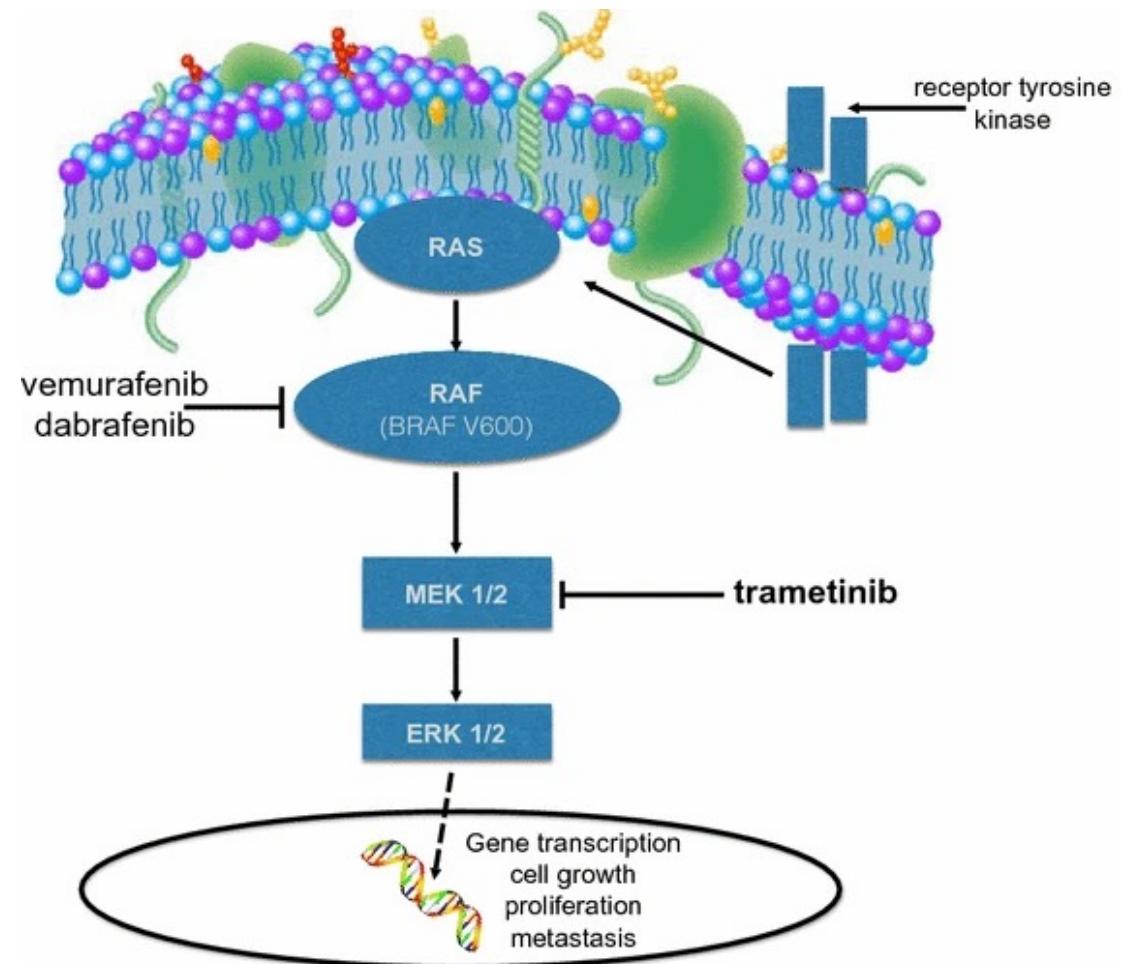


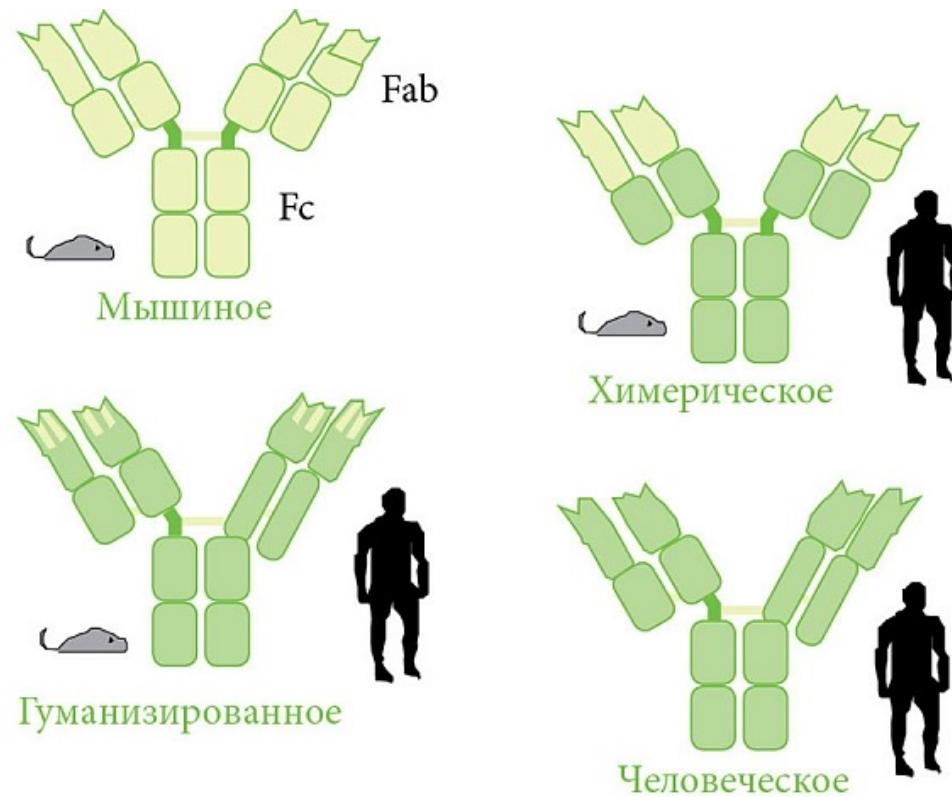
Dabrafenib



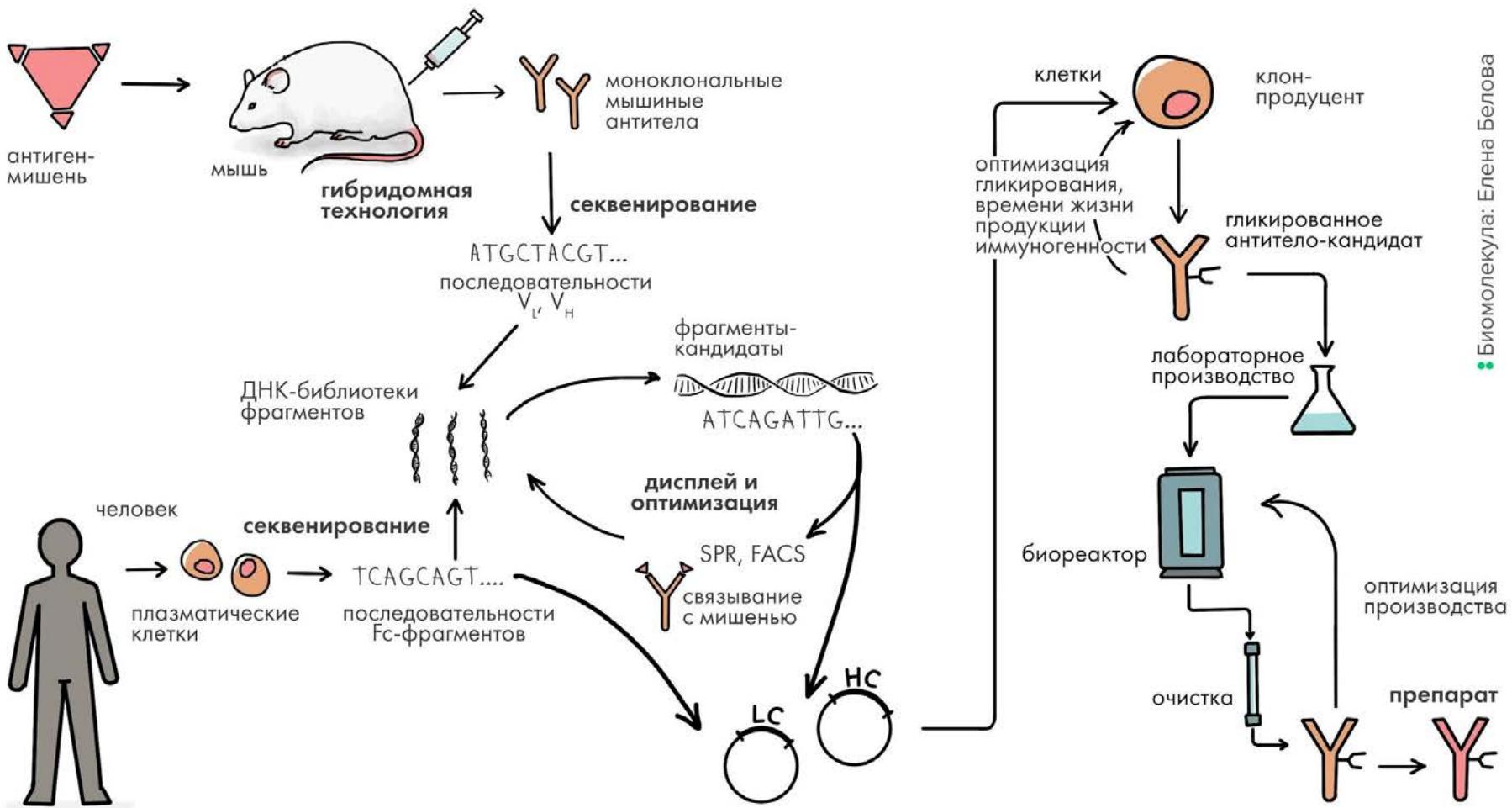
Используется для лечения раковых заболеваний, связанных с мутированной версией гена BRAF.

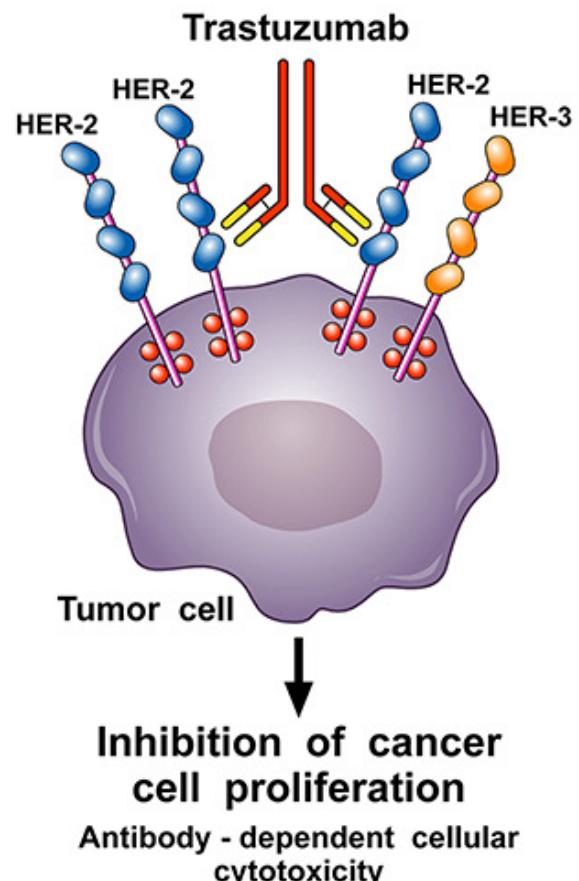
Действует как ингибитор связанного фермента B-Raf, который играет роль в регуляции роста клеток.



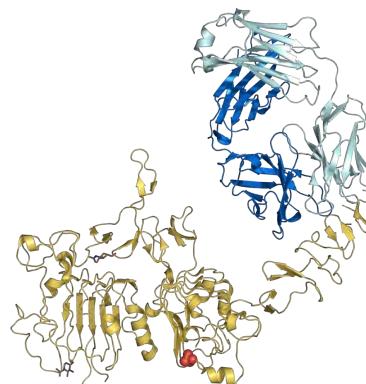


Примечание. Fab – антигенсвязывающий участок, Fc – константный фрагмент.





Используется для лечения рака, который является положительным к рецептору HER2.

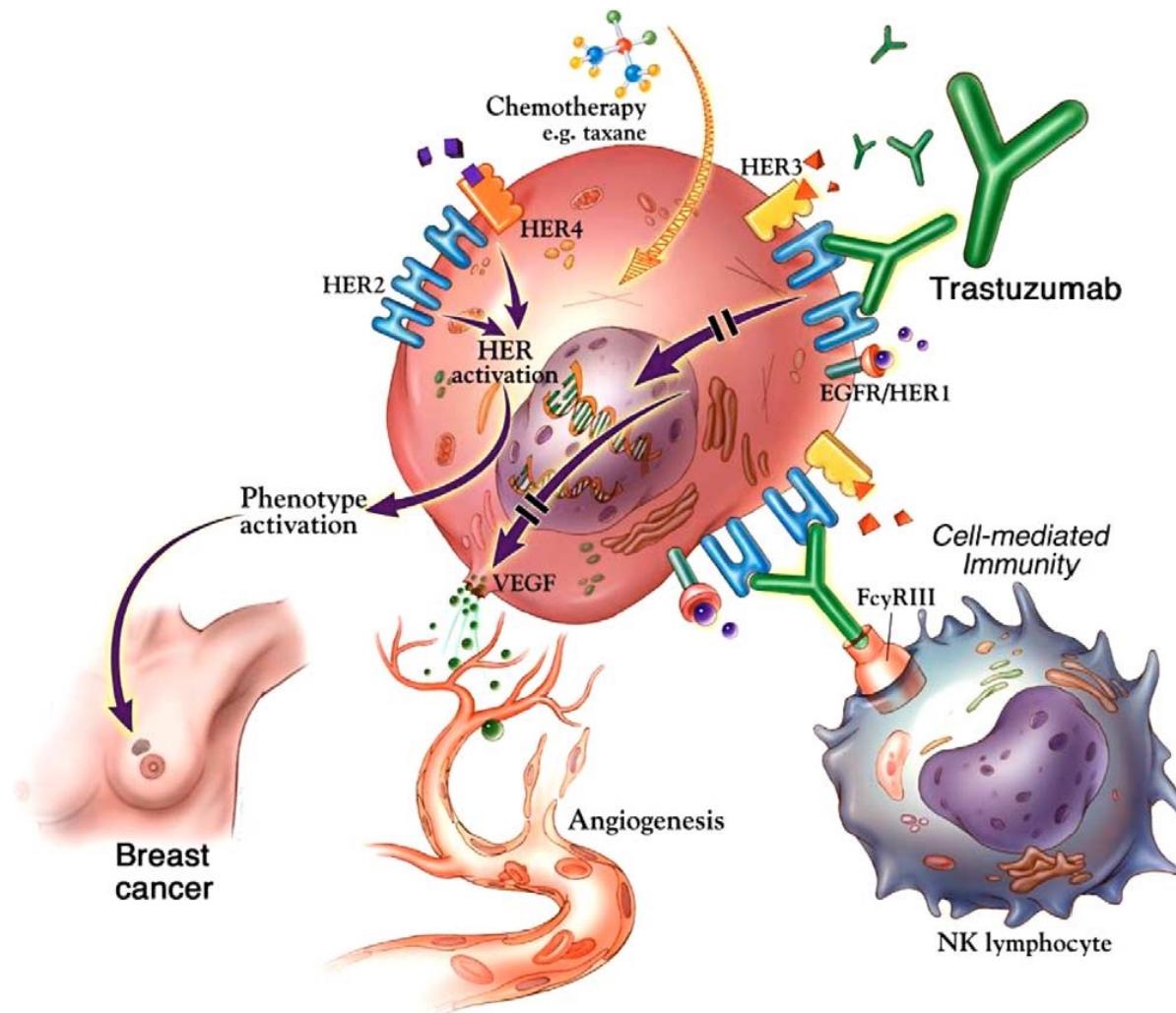


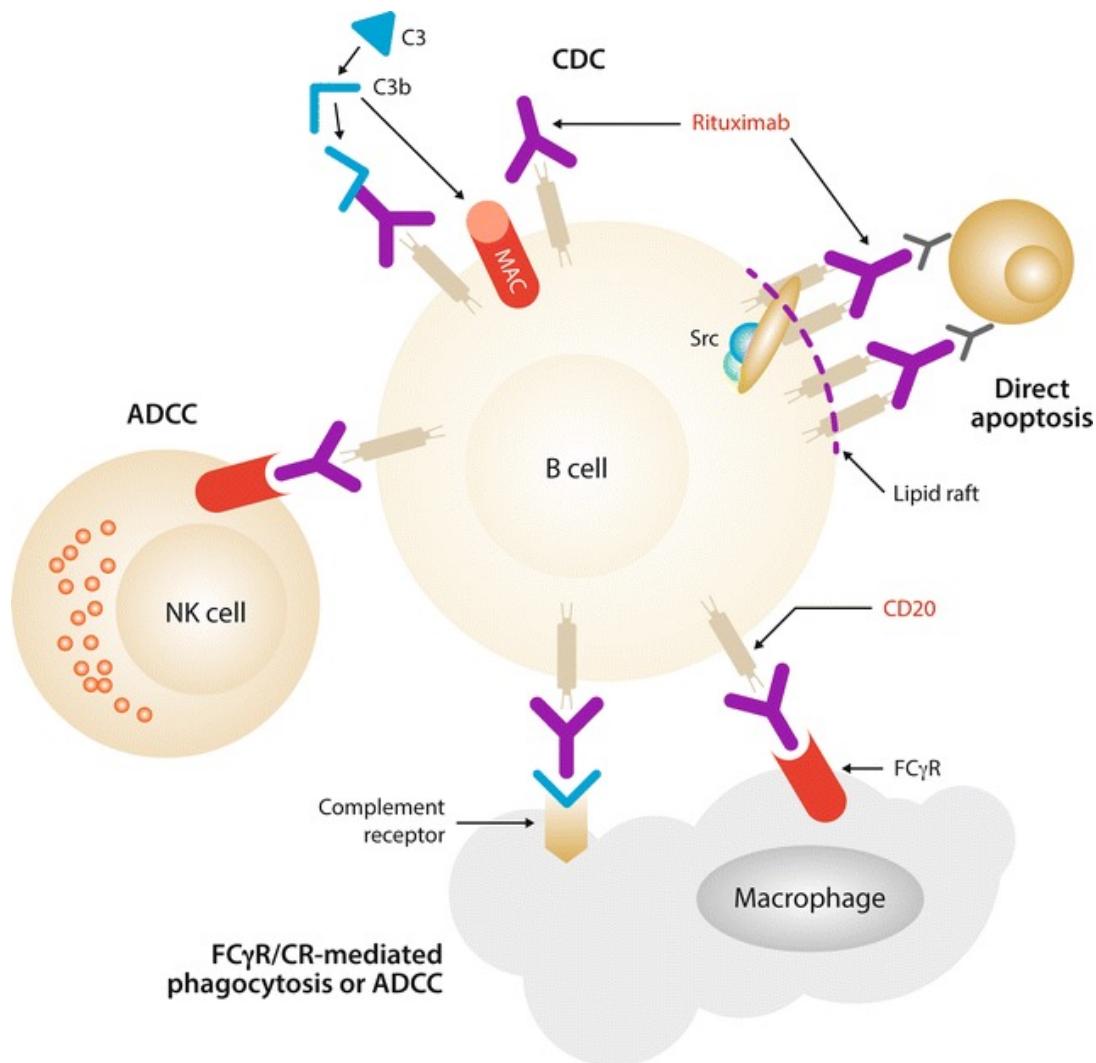
Трастузумаб (Fab region) (голубой) связывает HER2/neu (желтый)

С-концевой домен HER2 отвечает за связывание с рецептором, HER3, и препятствует активации последнего.

В раковых клетках белок HER2 может экспрессироваться в 100 раз больше, чем в нормальных клетках, позволяет обходить контрольные точки регуляции клеточного цикла и вызывает неконтролируемую пролиферацию клеток.

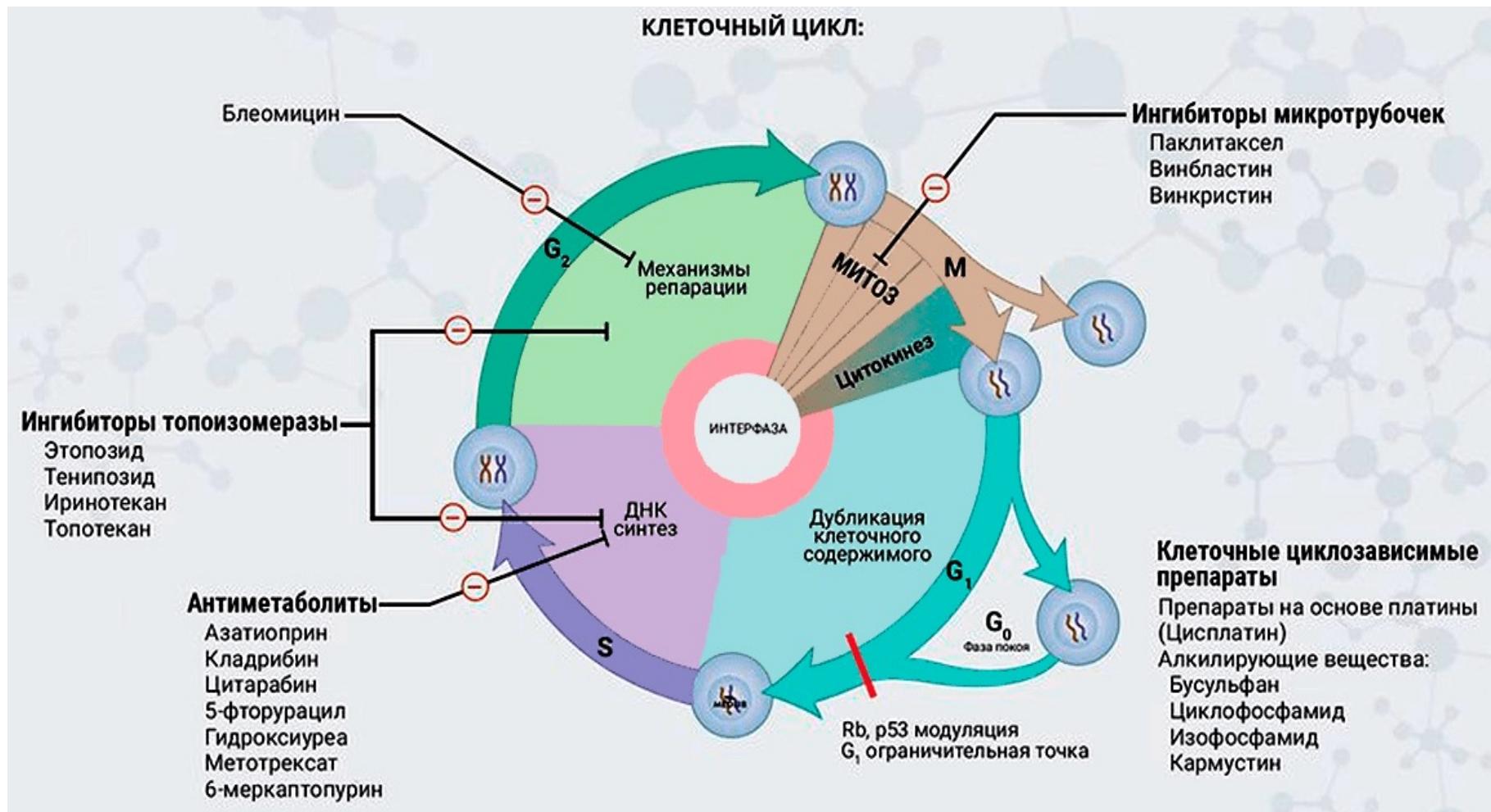
Трастузумаб связывается с доменом IV внеклеточного сегмента рецептора HER2/neu. Клетки, обработанные трастузумабом, задерживаются во время фазы G1 клеточного цикла, поэтому пролиферация снижается.





Препараты для химиотерапии

- **Фазоспецифические.** Действуют в определённые фазы клеточного цикла (антиметаболиты, ингибиторы топоизомеразы I и II, таксаны, винкалкалоиды).
- **Циклоспецифические.** Действуют на протяжении всего клеточного цикла (алкилирующие агенты, антрациклины).
- **Циклонеспецифические.** Действуют в фазе покоя G0 (препараты нитрозомочевины).



Резистентность опухолевых клеток к терапии

- **Первичная резистентность.** Некоторые изначально присущие опухолевым клеткам характеристики обеспечивают их устойчивость к какому-либо лекарственному препарату.
- **Вторичная резистентность.** Изначально чувствительные к лекарственному воздействию опухолевые клетки становятся устойчивыми к терапии уже во время лечения.

Механизмы резистентности опухолевых клеток к терапии

- **Выведение препаратов из клетки во внеклеточное пространство**
- **Расщепление препаратов внутри клетки.**
- **Изменение структуры** внутриклеточных компонентов-мишеней для препаратов.
- **Окисление** с помощью системы оксидаз липофильных токсических соединений с образованием более водорастворимых производных.
- **Конъюгация** с помощью ферментных систем токсических соединений с образованием менее токсичных водорастворимых соединений, которые легче выводятся из клетки.
- **Повышение активности ферментов**, обеспечивающих метаболизм ксенобиотиков внутри клеток.
- **Подавление передачи апоптотического сигнала.**
- **Пребывание клетки вне фазы клеточного цикла**, наиболее уязвимой для повреждения.
- **Расположение клеток в местах**, малодоступных для повреждающих факторов.

Трастузумаб работает только у пациенток с высокой экспрессией HER2, и у большинства впоследствии развивается резистентность к препарату, то есть опухоль снова начинает расти.

Компания *Roche* разработала антитело «Перджета» (пертузумаб), которое связывается с другим эпитопом HER2, отвечающим за его связывание с рядом рецепторов. Пертузумаб предотвращает активацию самого HER2, тем самым позволяя преодолеть резистентность к трастузумабу.