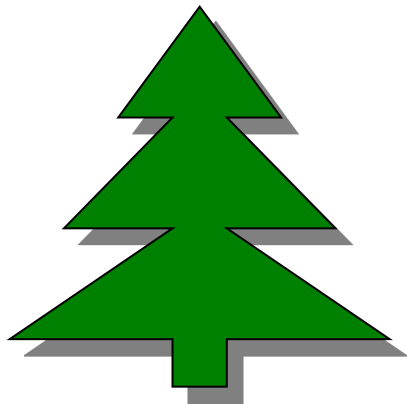


# Клеточный цикл и апоптоз



*Профессор кафедры клинической  
лабораторной диагностики  
ИГИУВа,  
д.м.н. Т.С.Белохвостикова*

# Введение

Кроветворение	3 ч.	28.09.2008
Клеточные цикл, апоптоз	3 ч.	29.09.2008
Лабораторная диагностика анемий	3 ч.	29.09.2008
Гемобластозы	3 ч.	30.09.2008.
Лимфопролиферативные заболевания	3 ч.	30.09.2008.
Миелопролиферативные заболевания	3 ч.	30.09.2008.

# I Прибайкальская межрегиональная научно-практическая конференция (2006 год)



# Кроветворение

**Кроветворение (синоним гематопоз) — процесс, заключающийся в серии клеточных дифференцировок, в результате которых образуются зрелые клетки крови**

Кроветворная ткань – одна из интенсивно пролиферирующих тканей организма. Для клеточного деления клеток крови необходима сумма сигналов.

# Сигнальные системы клетки

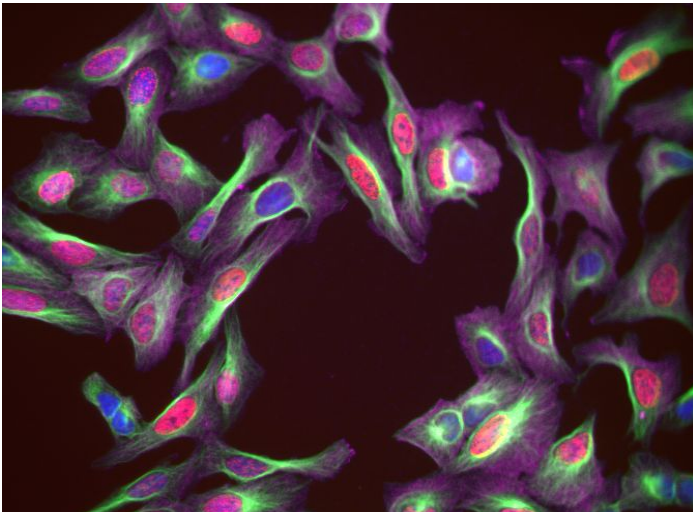
Связывание с  
лигандом

Активация  
рецепторов

Преобразование  
сигнала

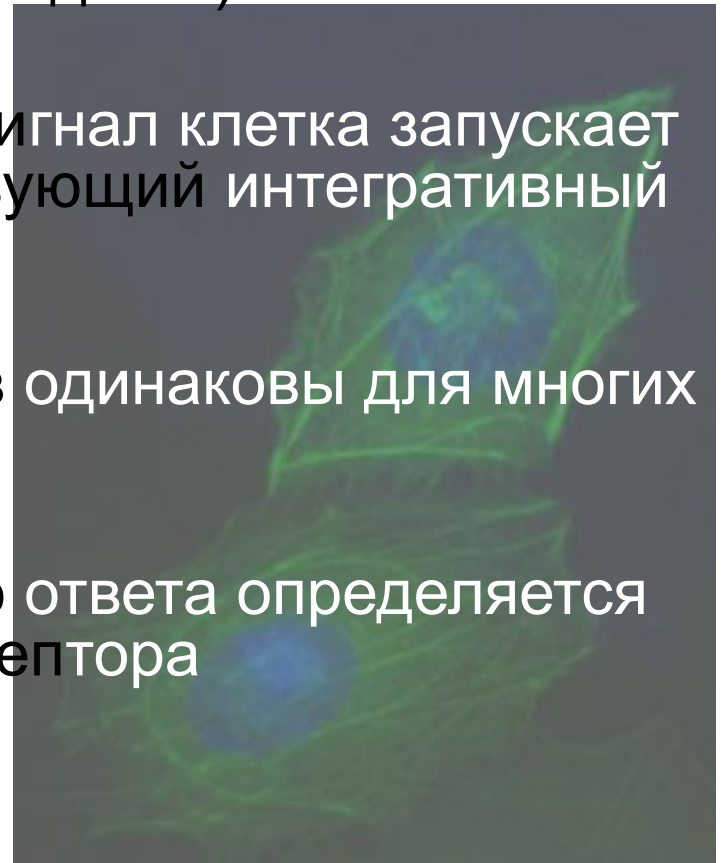
Активация  
эффекторов

Ослабление  
сигнала



# Биология сигнальных систем клетки

- Кроветворные клетки имеют рецепторы к экзогенным сигнальным молекулам: факторам роста, цитокинам, гормонам(стероидным и пептидным)
- В ответ на специфический сигнал клетка запускает каскадный механизм, реализующий интегративный путь биохимического ответа
- Способы передачи сигналов одинаковы для многих типов клеток
- Специфичность клеточного ответа определяется типом экспрессируемого рецептора





# Киназы и фосфатазы

- Фосфорилирование и дефосфорилирование - основные механизмы внутриклеточной передачи сигнала
- В этих процессах участвуют два типа ферментов: **киназы и фосфатазы**
- Фосфорилирование вызывает:
  - волновую активацию белков
  - создает в молекулах белков стыковочные участки и формирует временные внутриклеточные передатчики

# Рецепторы факторов роста

- Рецепторы факторов роста обычно стимулируют клеточный рост, однако при определенных условиях они могут подавлять клеточный рост или регулировать основные функции клеток.
- Большинство рецепторов факторов роста являются рецепторными тирозинкиназами (receptor protein-tyrosin kinases)
- Рецепторные тирозинкиназы являются рецепторами клеточной мембраны, активирующими тримерные G-белки, которые затем активируют эффекторные молекулы (аденилатциклазу, фосфолипазу C, протеинкиназу C и др.)



# Вторичные мессенджеры

- Циклический аденозинмонофосфат (сAMP)

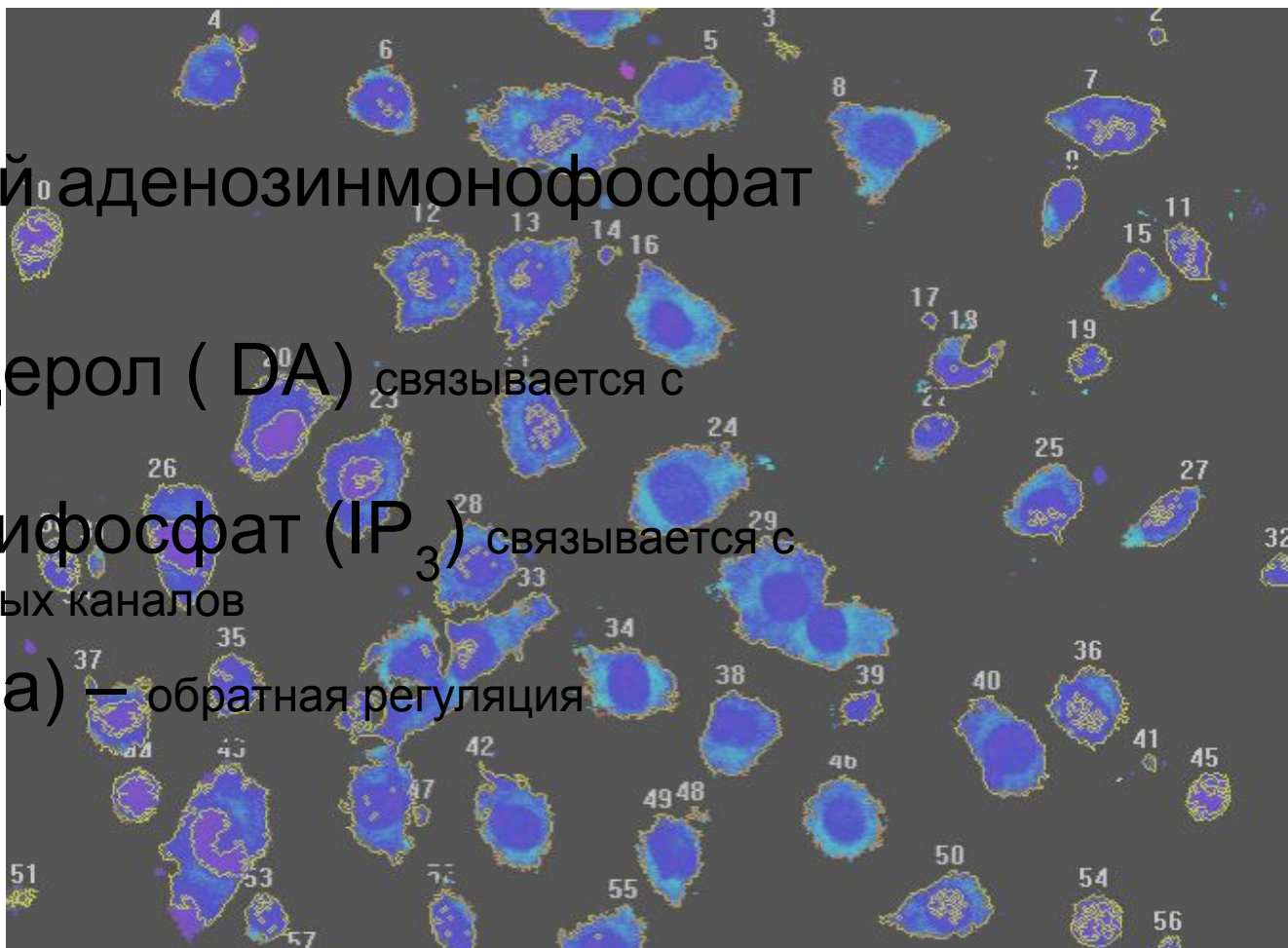
протеинкиназа А

- Циклический аденозинмонофосфат (сGMP)

- Диацилглицерол ( DA) связывается с протеинкиназой С

- Инозитолтрифосфат ( $IP_3$ ) связывается с белками кальциевых каналов

- Кальций (Ca) — обратная регуляция кальмодулином



Ca<sup>2+</sup> response in stably transfected (VR1 receptor) NIH 3T3 cells after stimulation with an agonist

# Способы доставки сигнальных молекул к клеткам

- **Эндокринный механизм**
- **Паракринный механизм** – клетка секретирует сигнальные молекулы и активирует соседние клетки. Сигнальные молекулы не поступают в кровоток.
- **Аутокринный механизм** – клетка отвечает на свой собственный сигнал
- **Юкстакринный механизм** (прикрепление к клеткам крови друг к другу или к эндотелию при гемостазе или воспалении, сигнал передается через межклеточные адгезионные молекулы)

# Рецепторы клеток

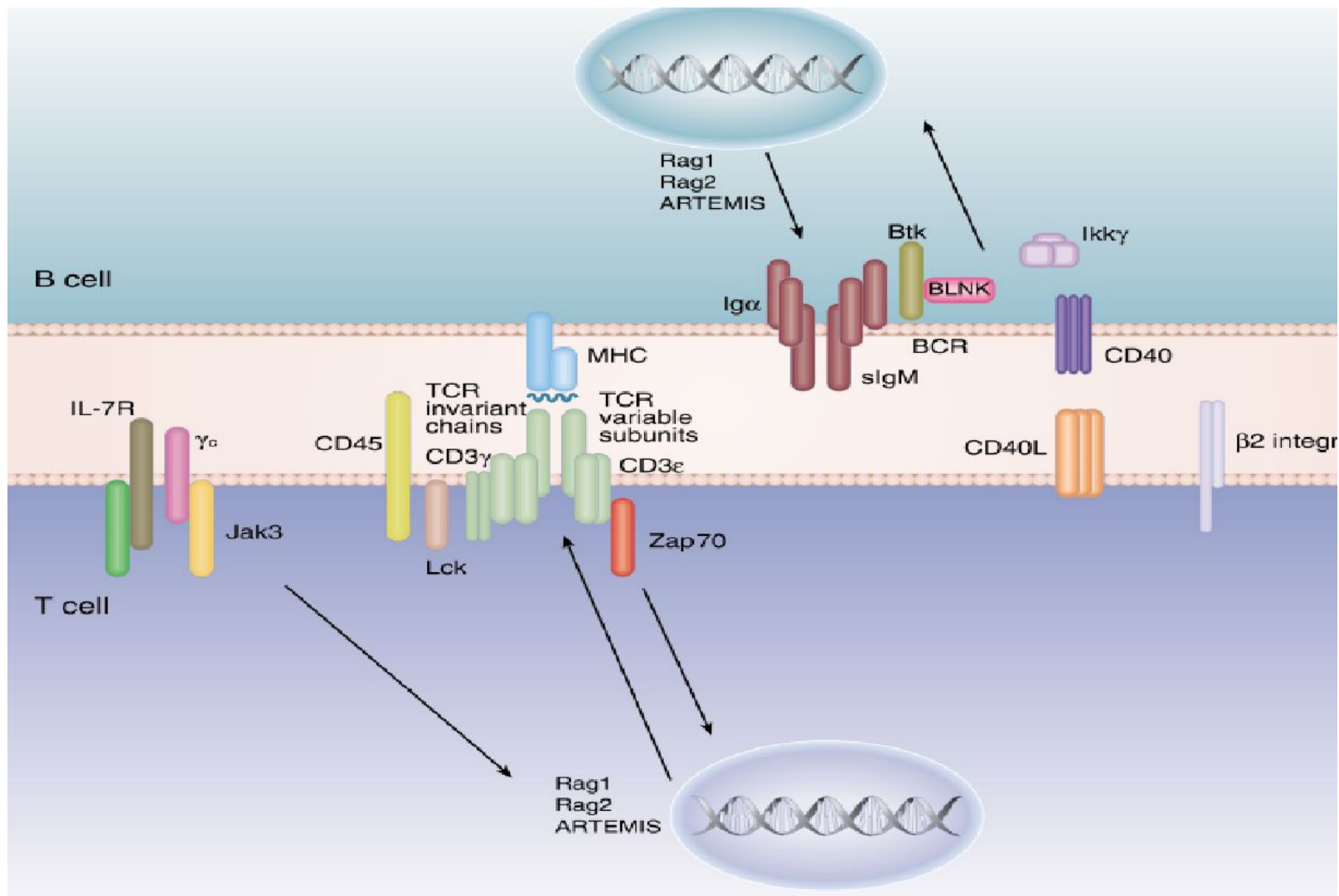
## Группа 1 Семейство липофильных рецепторов:

- Стероиды: ГК, МК, половые стероиды
- Тиреоидные гормоны, тироксин
- Ретиноиды, молекулы структурно сходные с витамином А и Д

## Группа 2 Семейство гидрофильных рецепторов

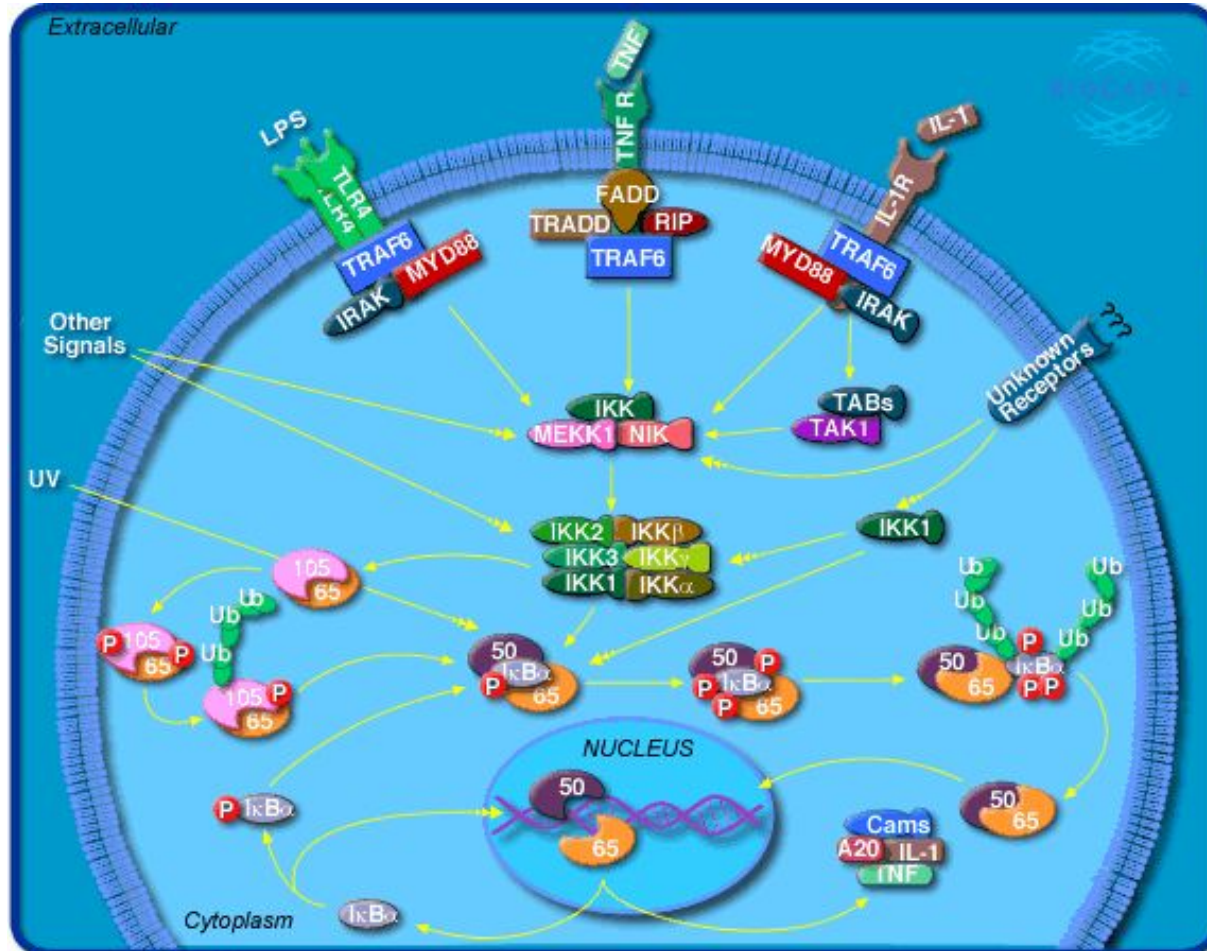
- Рецепторы, сопряженные с G-белками
- Рецепторы как ионные каналы. Pro BNP – мозговой натрийуретический пептид – выход Na
- Рецепторы, имеющие киназные домены
- Рецепторы с фосфатазной активностью
- Рецепторы цитокинов имеют сигналпередающие субъединицы.

# Экспрессия сигнальных молекул Т и В лимфоцитов



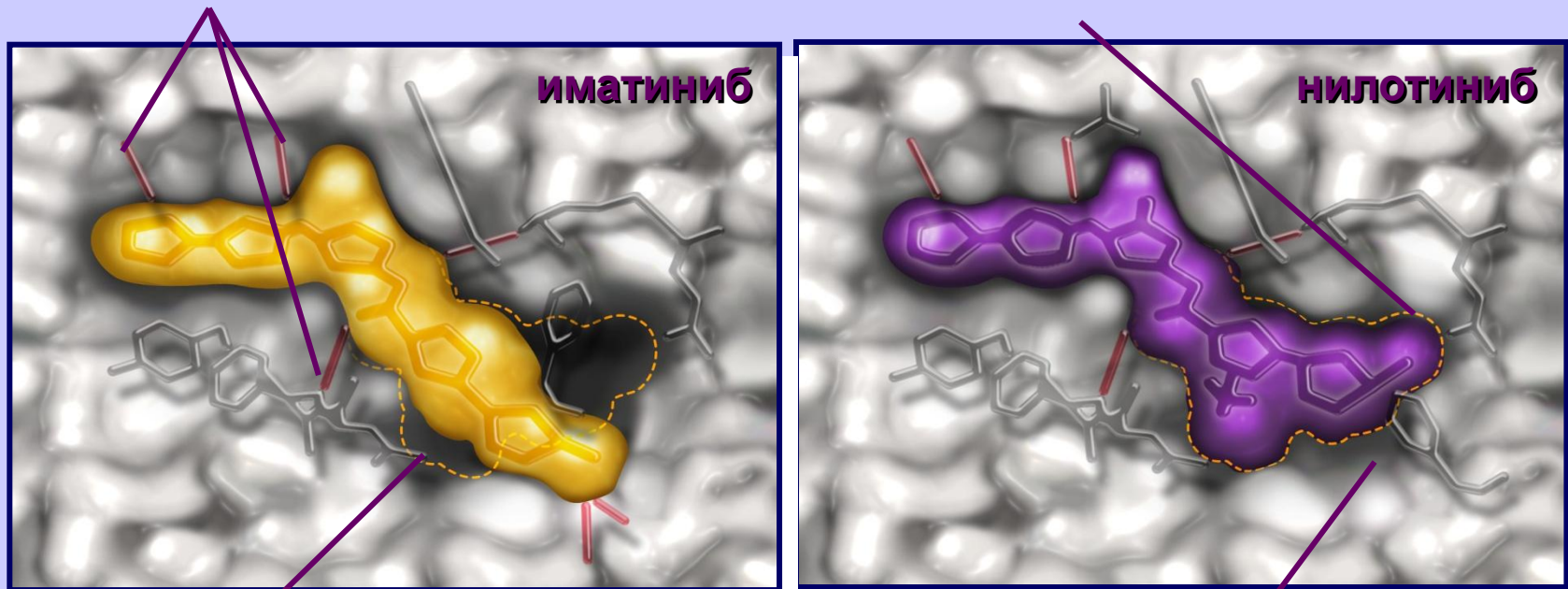
Fabio Candotti, Luigi Notarangelo, 2002

# Fluorescence Distribution - NF- $\kappa$ B Translocation Assay





# Связывание с bcr/abl-тирозинкиназой: сравнение иматиниба и нилотиниба



АТФ-связывающий  
«карман»

1. Corbin et al, *Blood*, 2003
2. Deiniger et al, *Blood*, 2005

# Внутриклеточные сигнальные пути

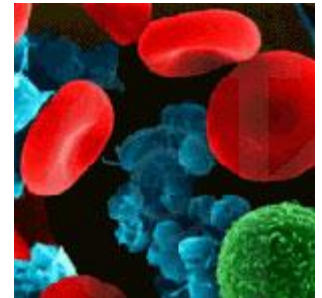
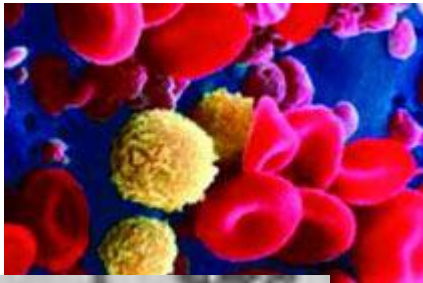
- Кроме активации ras-пути , в клетках существуют еще по крайней мере два пути, активирующиеся рецепторами факторов роста .
- Один из них - фосфатидилинозитольный путь, приводящий к активации протеинкиназы C
- Другой - фосфатидилинозитол-3-киназный путь (PI3K) - использует сходные молекулы в качестве вторичных мессенджеров, однако является самостоятельным путем, клеточная функция которого еще не вполне ясна



# Свойства факторов роста

- Факторами роста называют группу белковых молекул, индуцирующих синтез ДНК в клетке ( Goustin A.S. et al., 1986 ).
- Позднее было обнаружено, что спектр воздействий на клетки этих компонентов гораздо шире, чем предполагалось вначале. Так, некоторые белки этой группы в зависимости от типа клеток- респондентов могут индуцировать дифференцировку и подавлять пролиферацию .
- Кроме того, к ним относят регуляторные полипептиды, модулирующие подвижность клеток , хемотаксисы, но не обязательно влияющие на деление клеток ( Stoker M. and Gherardi E., 1987 ).
- Главное отличие факторов роста от белковых гормонов - аутокринный механизм действия или паракринный механизм действия ( холокринный механизм действия для гормонов ; Deuel T.F., 1987 ).
- Ростовые факторы предотвращают апоптоз клеток крови

# КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ



Основные термины:

Интерфаза

Митотический цикл,

Фаза G 1

Фаза G 0

Фаза S

Фаза G 2

фактор, стимулирующий созревание

Циклины

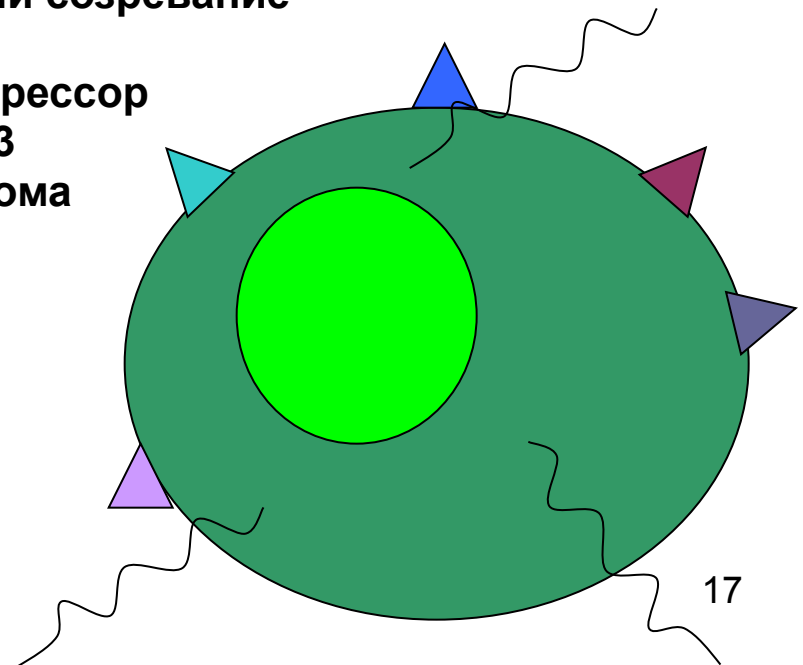
Опухолевый супрессор

Белок p 53

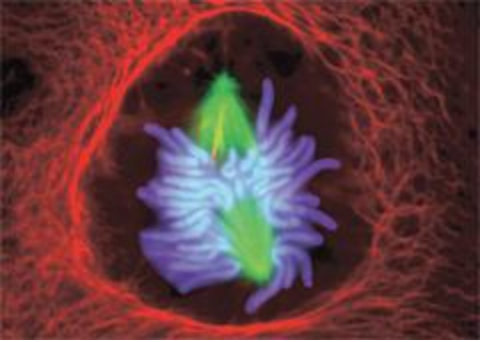
Ретинобластома

Апоптоз

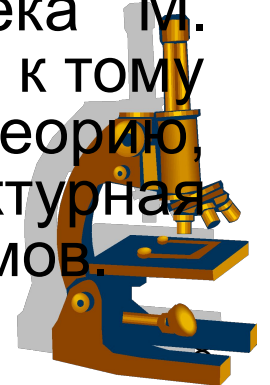
Хроматин



# Трубочки, колечки и висюльки

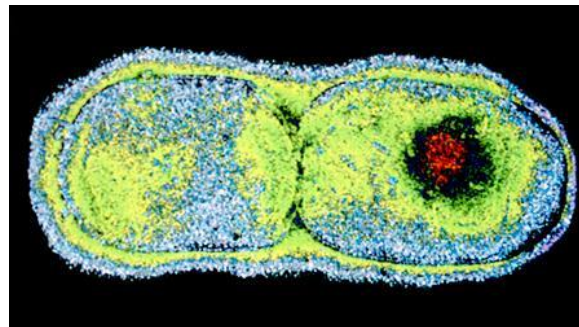


- Первым, как отмечают историки, клетку увидел Роберт Гук в 1663 году. Но его приспособление из пары линз давало 30-кратное увеличение, поэтому он мог видеть в изучаемых срезах пробки лишь нечто похожее на соты, которые он назвал клетками.
- Прибор Левенгука увеличивал уже в 300 раз — и голландец видел клетки крови, сперматозоиды и бактерии, названные им маленькими зверьками. Он вполне мог первым наблюдать и за тем, как делится клетка. В первой половине XIX века М. Шлейден и Т. Шванн, обобщив накопленные к тому времени знания, создали клеточную теорию, гласившую, что клетки — это структурная и функциональная основа всех живых организмов.

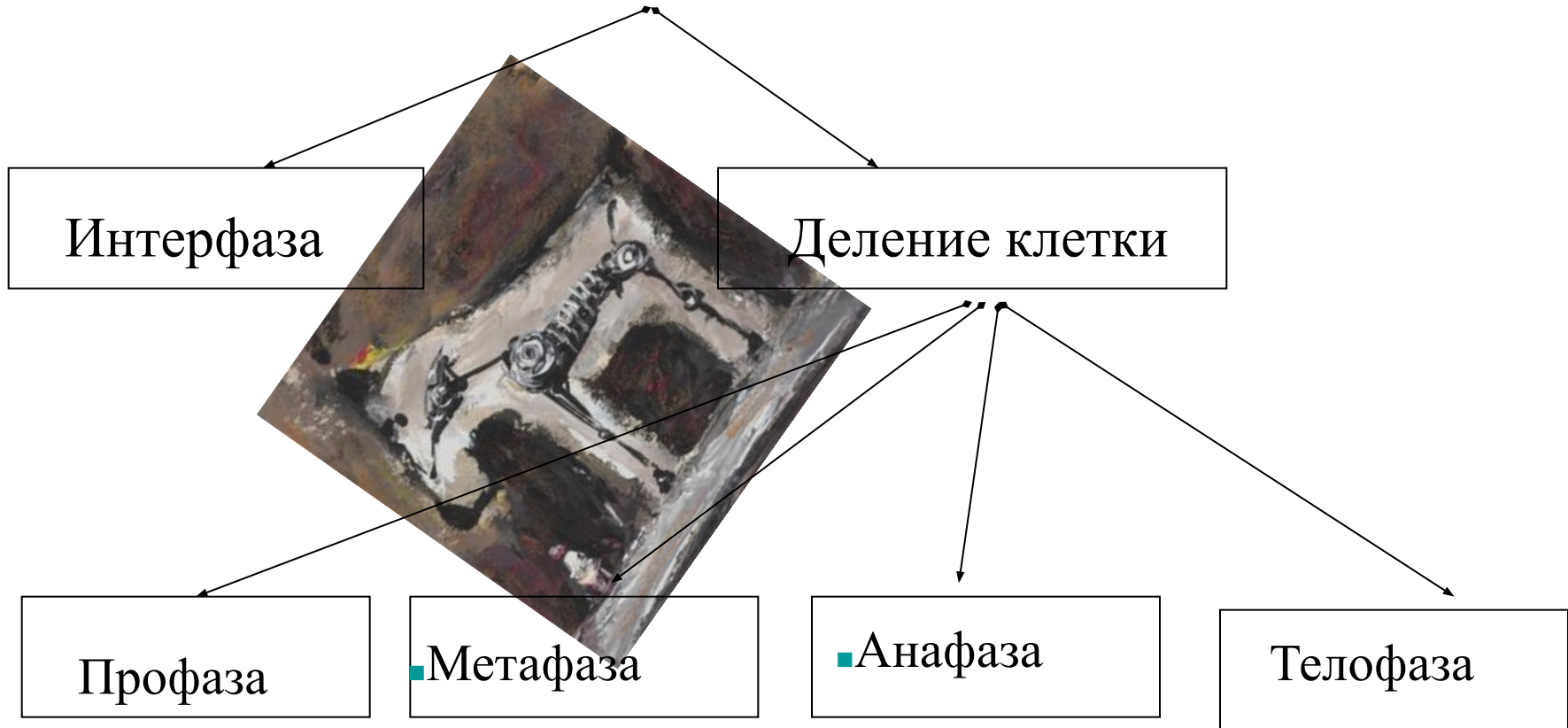


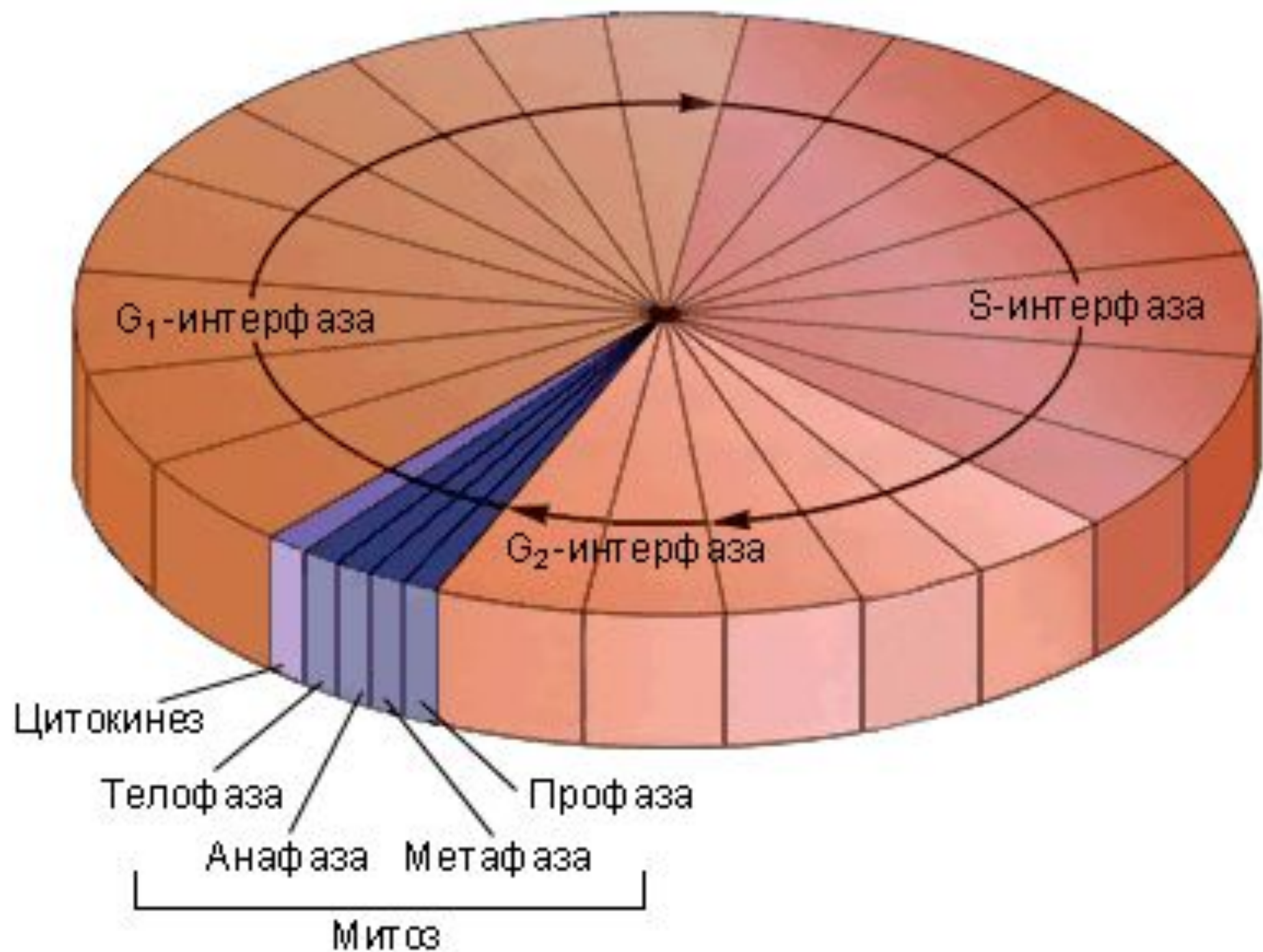
# Митотический цикл

- ***Митотический цикл*** - совокупность последовательных и взаимосвязанных процессов в период подготовки клетки к делению, а также на протяжении самого деления.
- Митоз греч "митос" - нить



# Жизненный цикл клетки

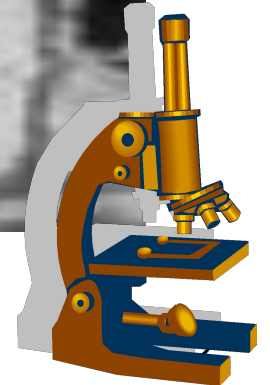






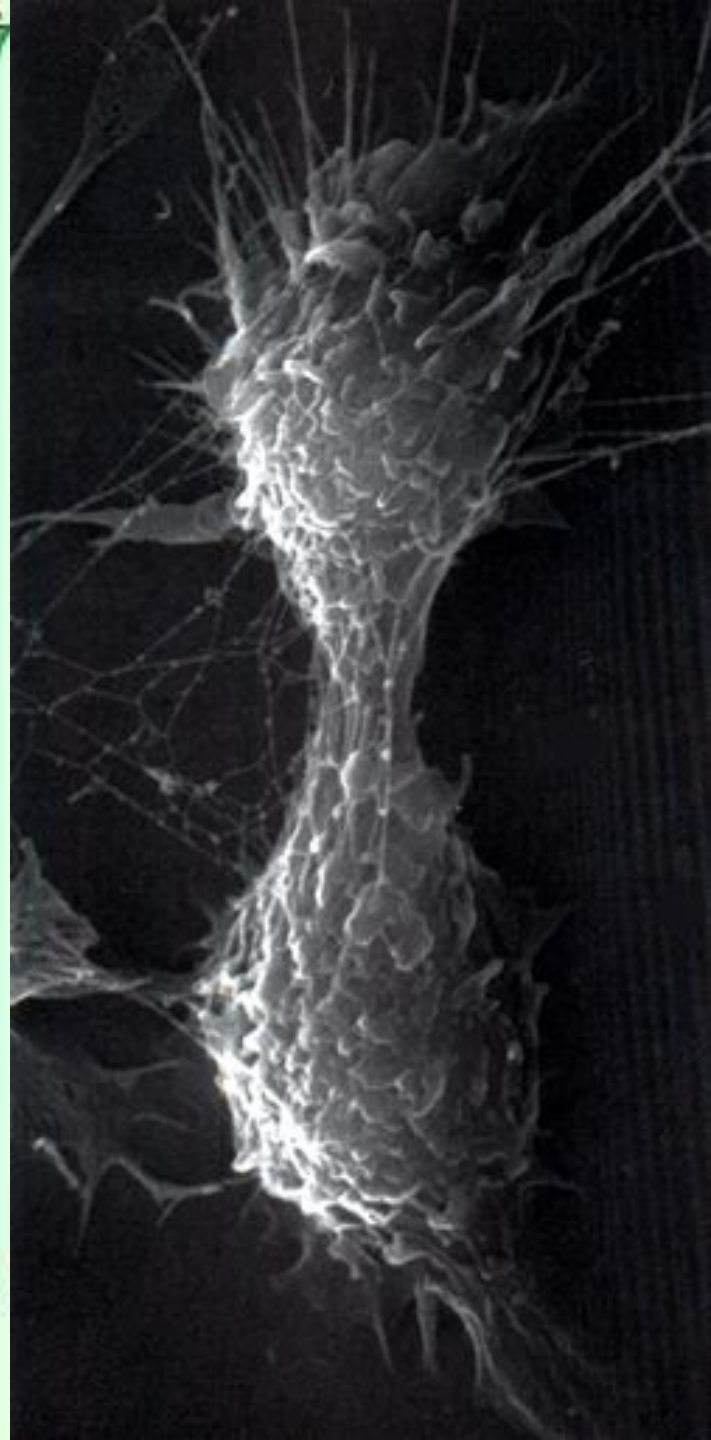
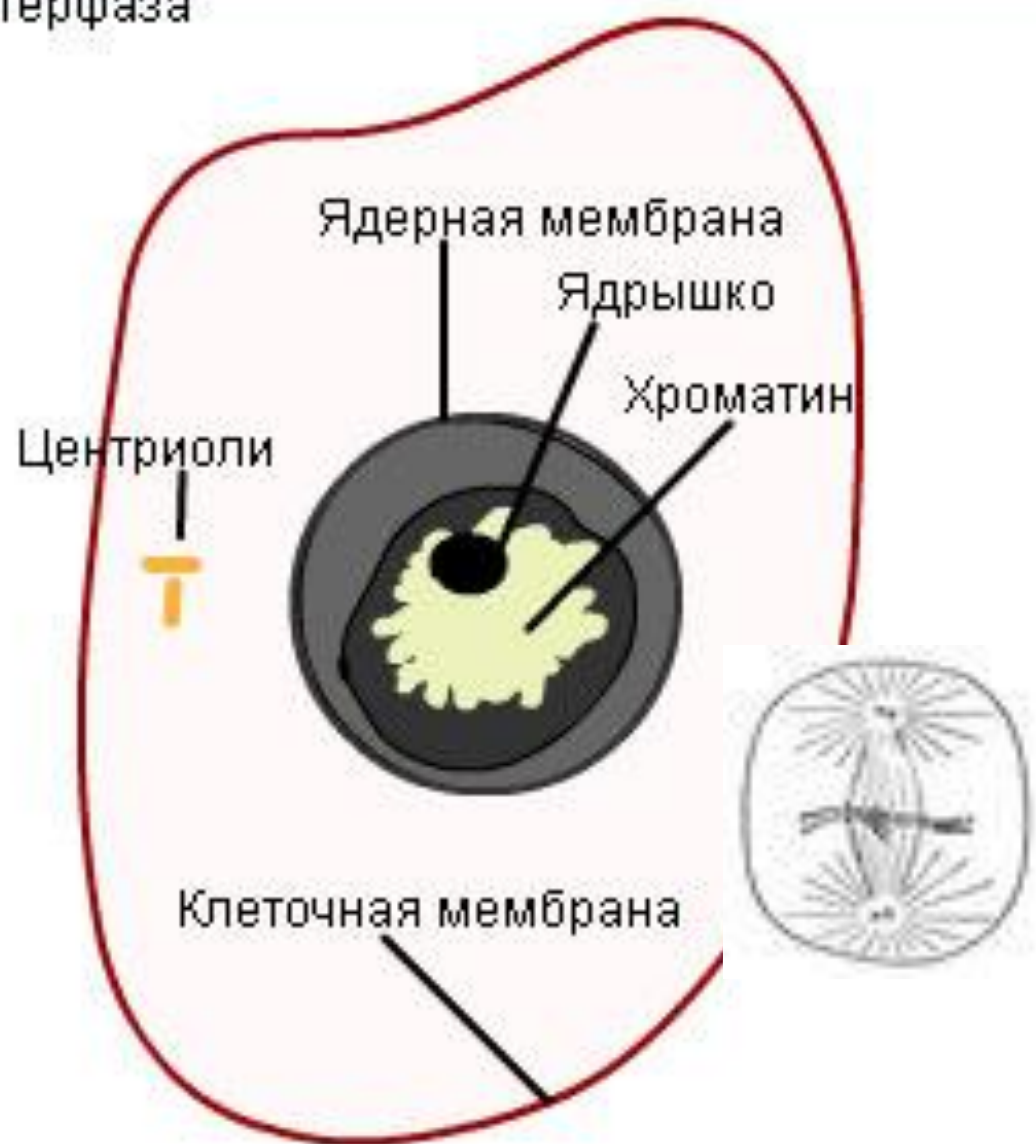
# Митотический цикл

**Митотический цикл** = фаза М – это цикл деления, который длится обычно 30-60 минут и завершается делением клетки на две дочерние.





# Интерфаза



Старт

Сторона

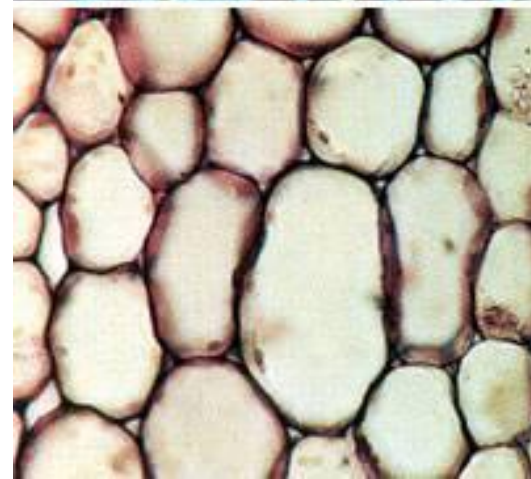
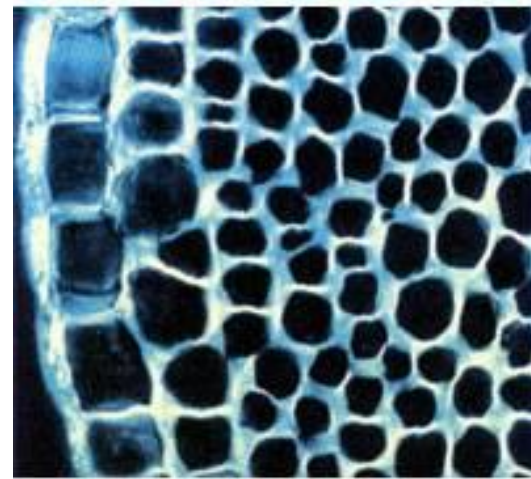


# G<sub>0</sub>

- наступает за фазой G<sub>1</sub>
- Клетка экспрессирует белки, которые используются не для клеточного деления
- Гены, кодирующие запуск клеточного деления «выключены»
- Гены, кодирующие белки, необходимые для клеточной дифференцировки «включены»
- Кардиомиоциты, нейроны постоянно находятся в фазе G<sub>0</sub> и цикл деления в них не возобновляется (все гены деления «выключены» навсегда)
- Исключением являются клетки крови и кишечного эпителия, где скорость клеточного деления высока
- Размножение при помощи митоза называют бесполом или вегетативным, а также **клонированием**. При митозе генетический материал родительских и дочерних клеток идентичен.

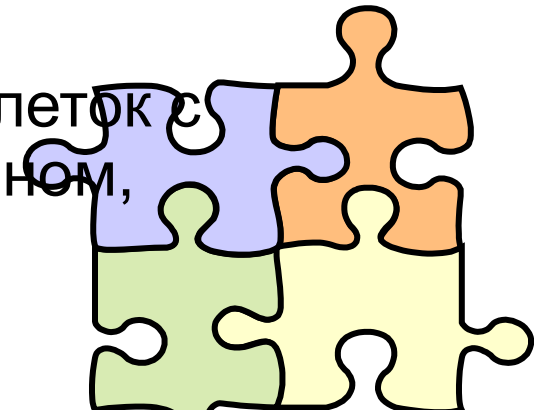
# Когда нормальные клетки прекращают делиться?

- Гены, включающие пролиферацию выключаются, если клетка получает сигнал, что все точки «контактов» заняты.
- Таким образом молекулы окружающей среды- межклеточное вещество- межклеточные контакты, участвуют в управлении клеточной пролиферацией (интегрины, кадгерины, катенины)

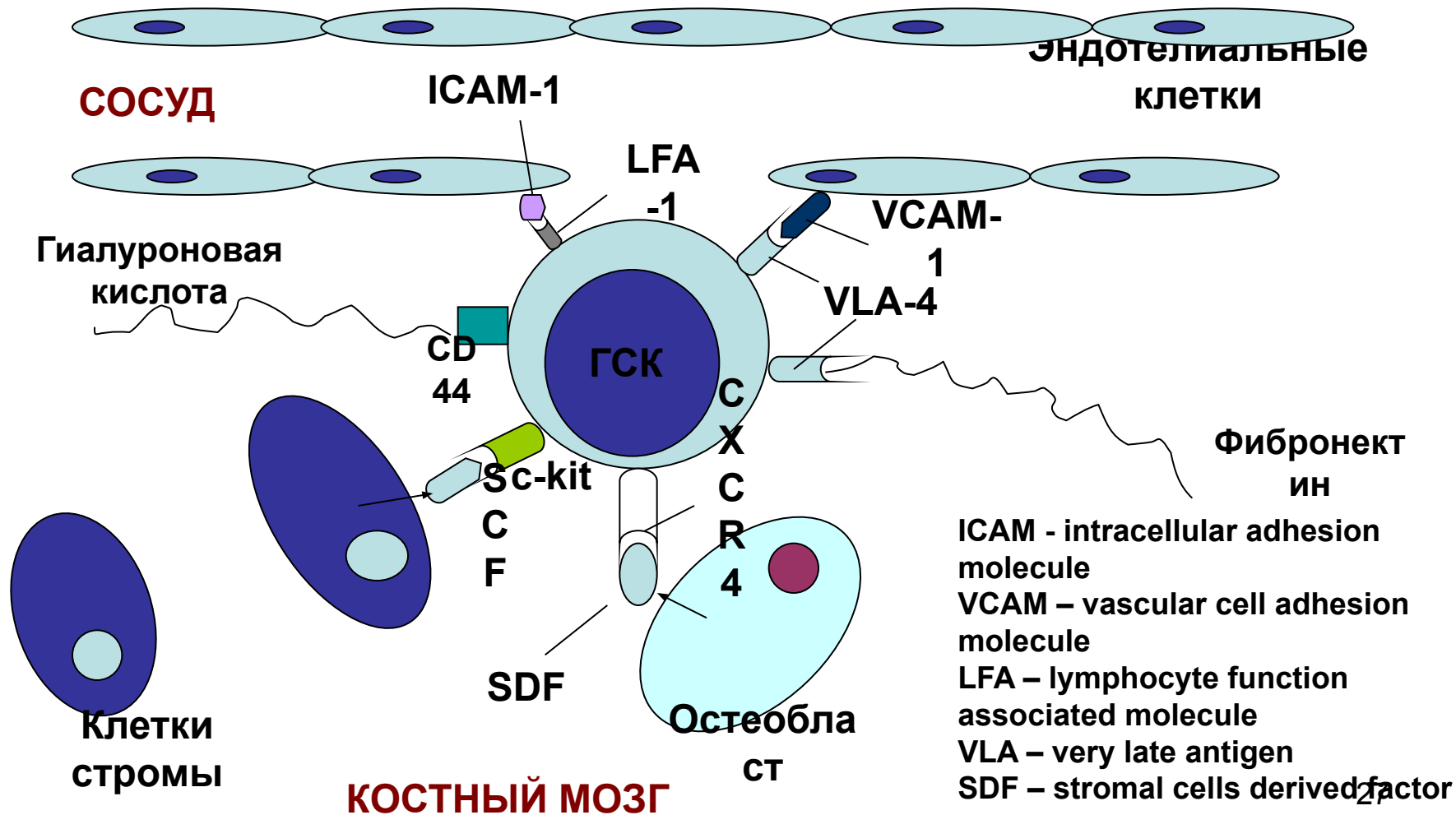


# Интегрины

- Интегрины-поверхностные рецепторы клетки, переносящие сигналы от внеклеточного матрикса к цитоскелету.
- «включают» рост, метастазирование, опухолевых клеток, апоптоз, свертывание крови и миграцию клеток в зоны воспаления
- Нековалентно связанные гетеродимеры из  $\alpha$  (16 разновидностей) и  $\beta$  (8 разновидностей) субъединиц
- Интегрины, формирующие межклеточные контакты, называются ICAM – межклеточными молекулами адгезии
- Интегрины способствуют связыванию клеток с внеклеточным матриксом: фибронектином, коллагеном, ламинином.



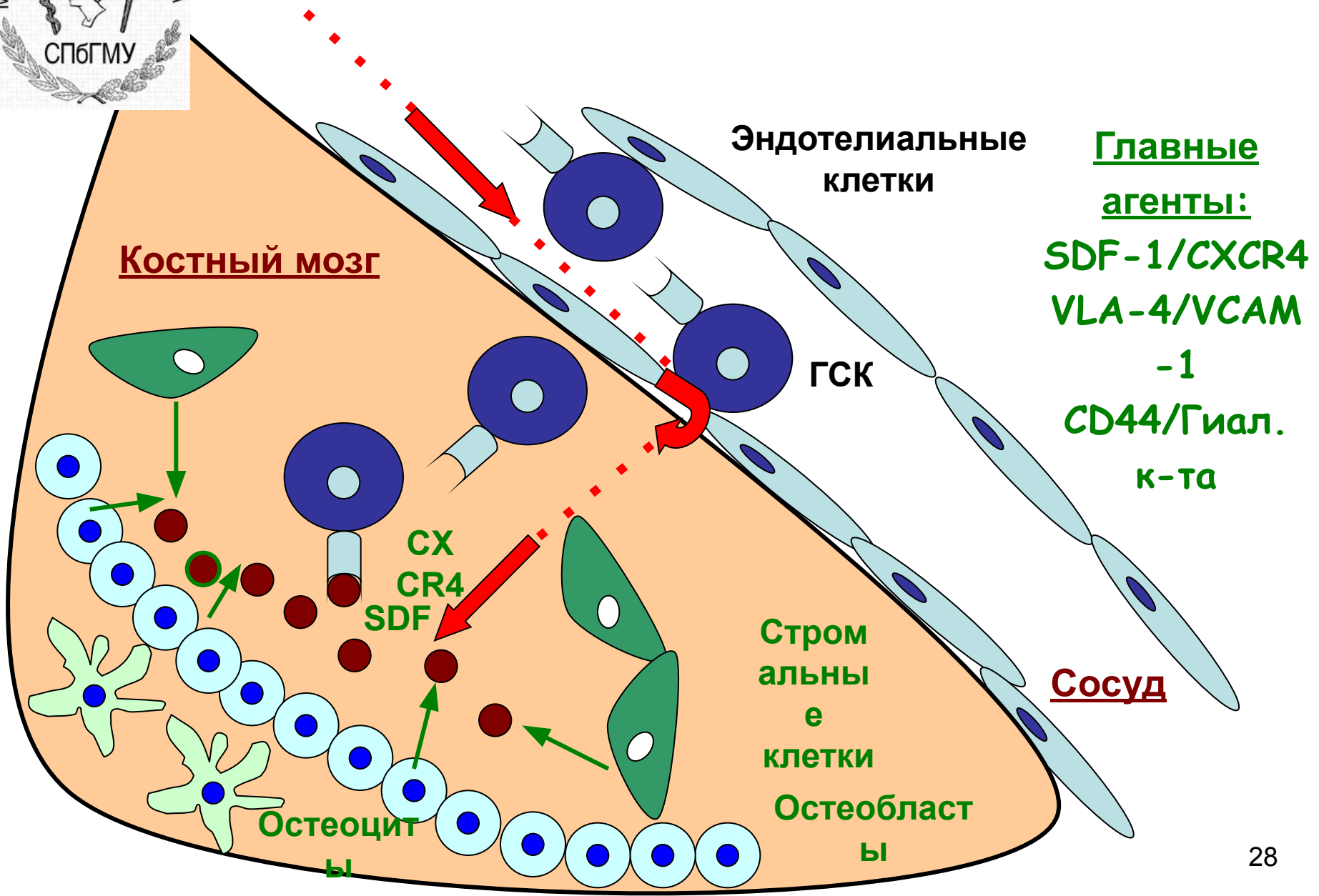
# Адгезионные молекулы







# ХОМИНГ



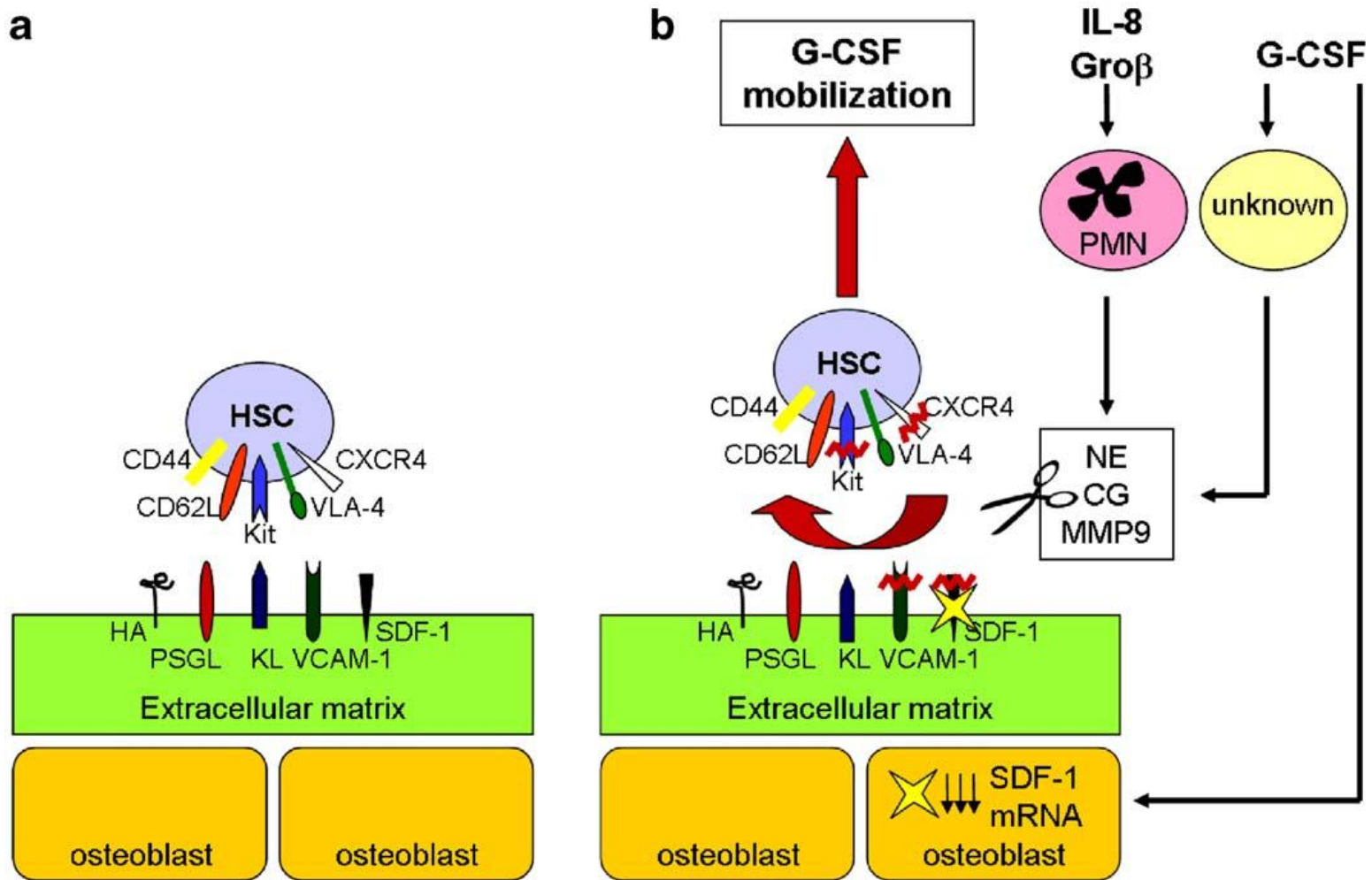
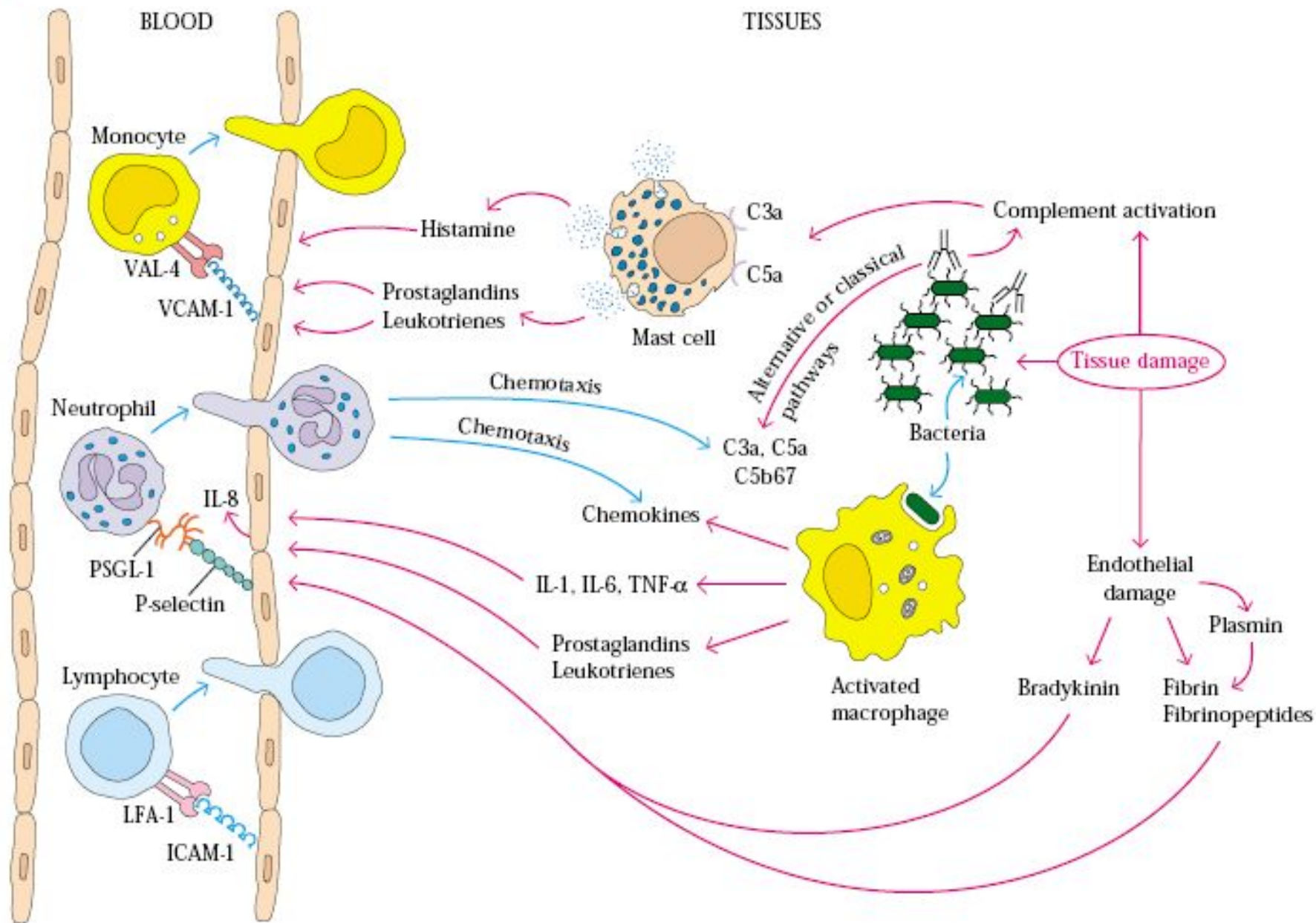


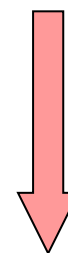
Figure 1. G-CSF HSC mobilization. a: There are adhesive interactions between HSC and matrix components in the BM. HSC express a wide range of cell adhesion molecules (CAM) including CXCR4, VLA-4, c-kit, CD62L, and CD44. The BM stroma expresses cognate ligands for these CAMs such as SDF-1, VCAM-1, KL, PSGL, and HA. b: HSC mobilization results from cytokine-induced functional changes in the adhesion profile expressed by the HSC in their relation to the BM stromal cells, osteoblasts, and other matrix components. G-CSF induces, through an unknown cell, the release of a number of proteases into the BM, including NE, CG, and MMP9. IL-8 and Gro $\beta$  release the same enzymes via neutrophils and monocytes. These proteases cleave several adhesion molecules thought to play an important role in HSC trafficking and mobilization, including c-kit, VCAM-1, CXCR4, and SDF-1. Recent data suggest that G-CSF treatment potently inhibits osteoblast SDF-1 expression at the mRNA level furthermore osteoblasts are the major source of SDF-1 in the BM. The resultant decrease in osteoblast SDF-1 may also contribute to enhanced HSC mobilization especially in response to G-CSF. Cathepsin G (CG), chemokine receptor-4 (CXCR4), hematopoietic stem cell (HSC), hyaluronic acid (HA), interleukin 8 (IL-8), kit ligand (KL), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), neutrophil elastase (NE), stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), very late antigen-4 (VLA-4), P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL).





# ОСНОВНЫЕ ПОВЕРХНОСТНЫЕ МАРКЕРЫ ЭК

- CD 62 E (E-селектин)
- CD 62 P (P-селектин)
- CD 106 (VCAM-1)
- CD 31 (PECAM-1)
- VEGFR-2 (KDR)
- CD 105 (endoglin)
- CD 144 (VE-cadherin)
- CD 146 (S-endo-1)
- CD 54 (ICAM-1)
- CD 34



проточная  
цитометрия

# Роль циклинов

- Деление клетки запускается MPF
- В клетках млекопитающих существует семейство циклинзависимых киназ (cyclin-dependent kinases –Cdk). Cdk пронумерованы с 1 по 5.
- В период выхода клетки из фазы  $G_0$  под действием факторов роста первым образуется комплекс циклин Д- Cdk. Этот комплекс запускает синтез белков, необходимых для репликации ДНК.
- Циклинов четыре: А, В, Е, Д.

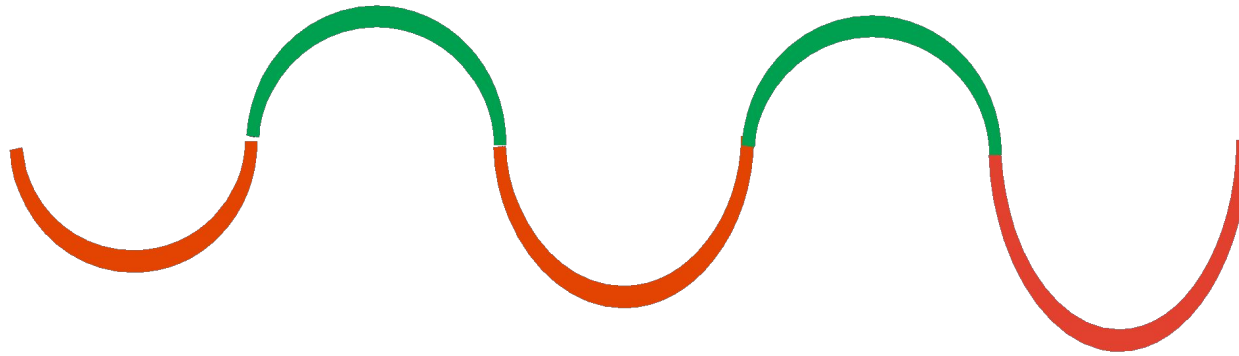
Циклины	Киназа	Функция
Д	Cdk4, Cdk6	Работа после точки ограничения на границе G1/s
Е,А	Cdk2	Инициация синтеза ДНК в ранней фазе S
В	Cdk1	Переход от G2 к М

# Циклин В

- **Циклин В – контролирует входение клеток в митоз.**
- Состоит из 2 субъединиц:
  - киназного домена (способен к фосфорилированию специфических веществ в клетке) и
  - регуляторной субъединицы (циклиновой), синтез которой усиливается и ослабевает в течение клеточного цикла.
- *Разрушение циклина Д происходит не за счет протеолиза, как у большинства белков, а за счет присоединения к N-концевому пептиду, который называется «блок разрушения» как минимум двух белков (распознающий и убиквитинлигазы) после чего его разрушение происходит в протеасоме.*
- Для вступления клетки в митоз необходим еще один сигнал – это MPF – регулятор митотических процессов.  
**Разрушение MPF циклином Д вызывает выход из митоза.**
- MPF участвует в начальных этапах деления клетки: компактизации хромосом, разрушении эндоплазматического ретикулума и комплекса Гольджи.

# MPF (циклин В)

Осцилляции концентрации циклина В на протяжении клеточного цикла				
митоз	интерфаза	митоз	интерфаза	митоз



Разрушение MPF циклином Д вызывает выход из митоза.  
MPF участвует в начальных этапах деления клетки: компактизации хромосом, разрушении эндоплазматического ретикулума и комплекса Гольджи.  
Циклин В нестабилен, при снижении концентрации факторов роста разрушается



# МИТОЗ

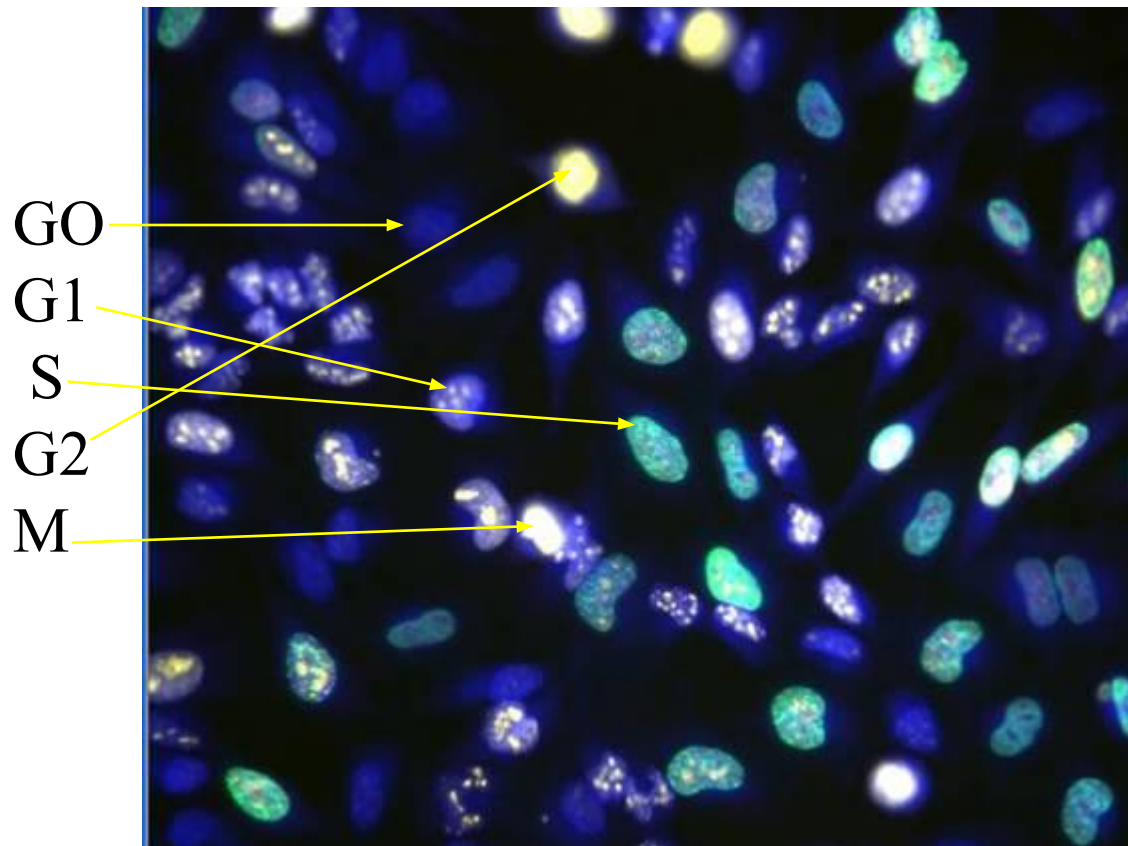
Сопровождается:

1. Компактизацией, конденсацией хромосом, в
2. 10 000 раз в нуклеосомы в середине  $G_2$  фазы
3. Растворением ядерной оболочки (ламин А и В)
4. Формированием веретена деления и выравниванием хромосом в плоскости экватора клетки (с помощью центриолей, астральных и полярных микротрубочки, кинетохора)
5. Расхождением сестринских хроматид к полюсам клетки (динеин, кинезин), образуются борозды деления, клетка окончательно делится на две дочерние (актин, миозин).



# Cell Cycle – Representative Image

Hoechst dye and 3 antibodies enable identification of Cells in G0, G1/G2, S and M phase

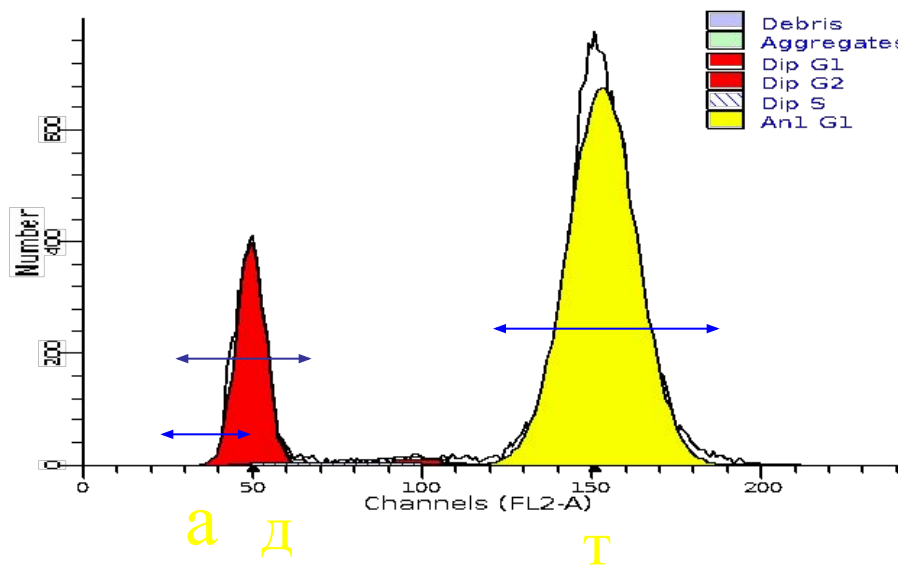


Anti- Ki-67 yellow  
Anti- BrdU cyan  
Anti-Phospho  
Histone H3 green  
Hoechst blue

20x objective



# ДНК-цитометрия



File analyzed: Data.002  
 Date analyzed: 22-Sep-2005  
 Model: 2DA0n\_DSD\_ASD  
 Analysis type: Automatic analysis

Diploid: 21.51 %  
 Dip G1: 87.75 % at 49.58  
 Dip G2: 4.58 % at 99.16  
 Dip S: 7.67 % G2/G1: 2.00  
 %CV: 8.37

Aneuploid 1: 78.49 %  
 An1 G1: 100.00 % at 153.17  
 An1 G2: % at  
 An1 S: 0.00 % G2/G1:  
 %CV: 6.61 DI: 3.09

Total Aneuploid S-Phase: 0.00 %  
 Total S-Phase: 1.65 %  
 Total B.A.D.: 0.00 %

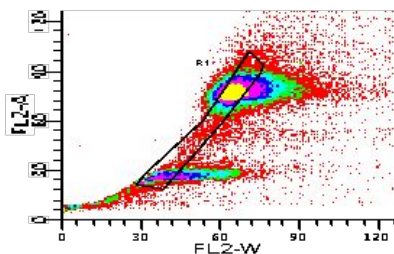
Debris: 0.05 %  
 Aggregates: 0.12 %  
 Modeled events: 21837  
 All cycle events: 21800  
 Cycle events per channel: 208  
 RCS: 3.841

Д- диплоидные клетки

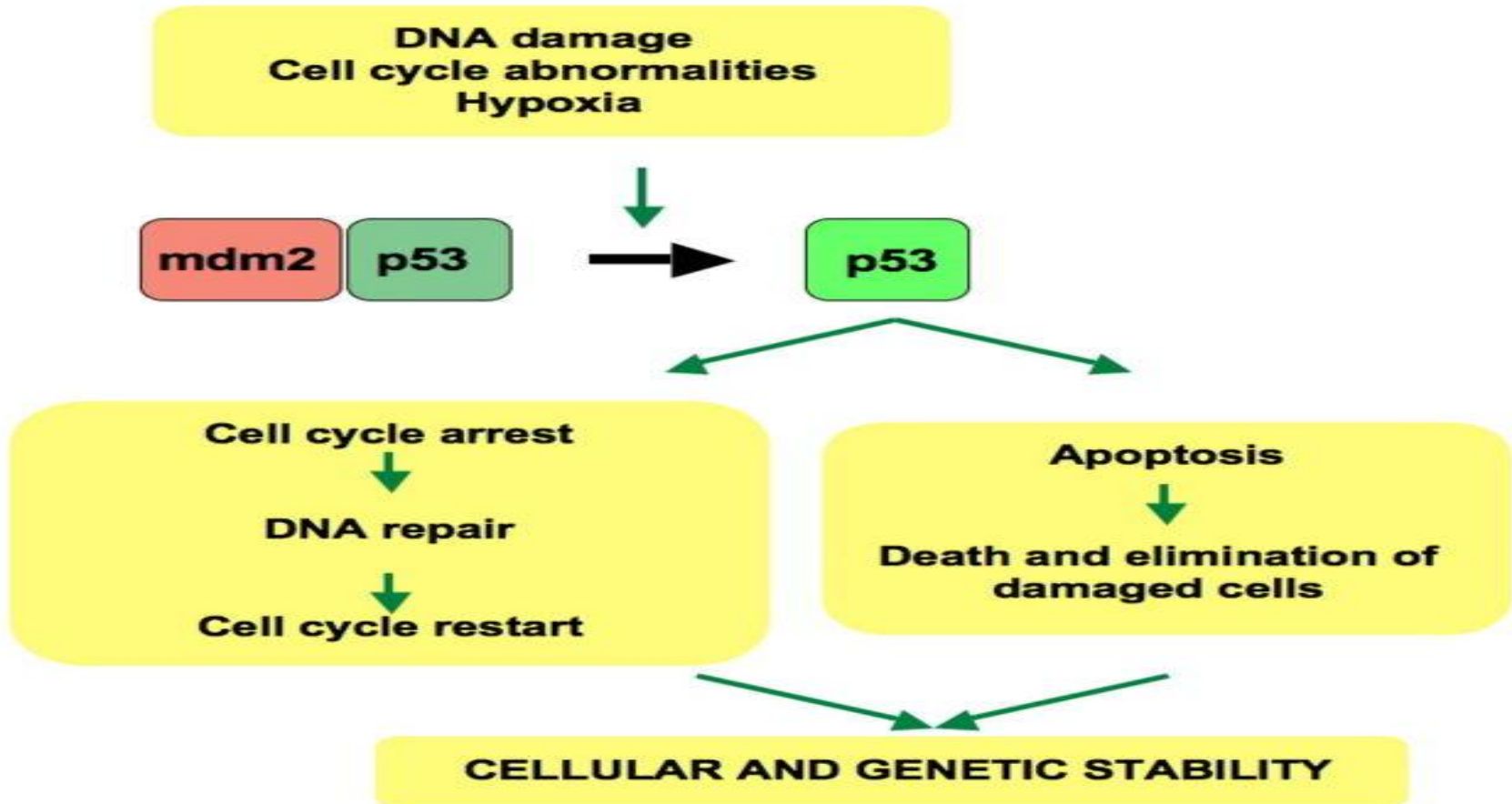
А-клетки в апоптозе

Т- тетраплоидные клетки

} анеуплоидия



# Белок p 53



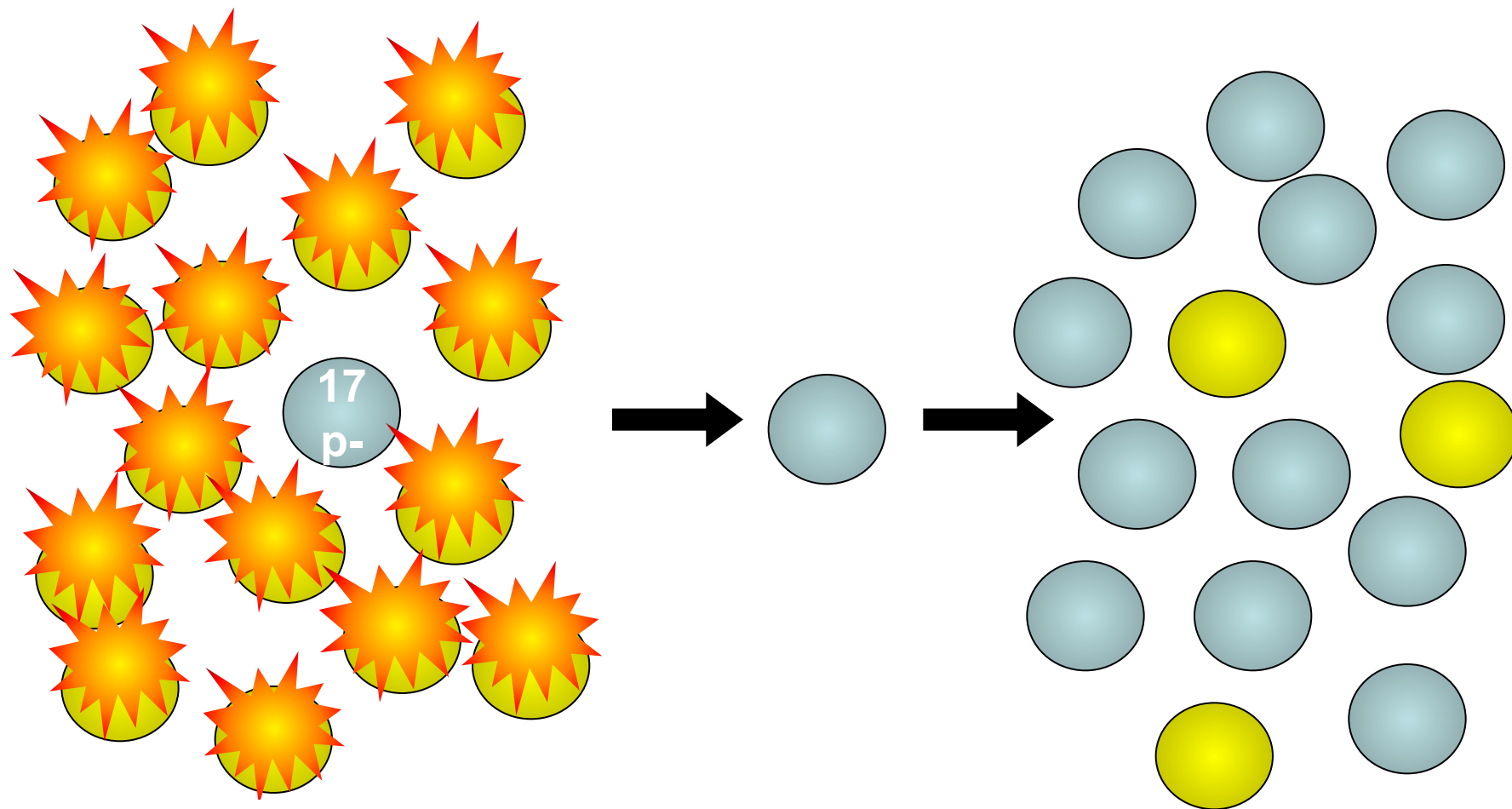
- Точная репликация и распределение генетического материала – это важнейшее условие выживания клетки. В клеточном цикле существуют четыре точки, в которых точность репликации, правильность последовательности и 38 равное разделение ДНК контролируются специальными клеточными механизмами.

# Определение группы высокого риска при В-ХЛЛ

---

- Делеция 17p перед началом терапии
- Прогрессия на фоне лечения или рецидив в течение 12 месяцев от начала терапии

# Ключевая роль p53 в резистентности



Химиотерапия, действующая по  
пути p53 (хлорамбуцил,  
флударабин, FC)

# Показания к кэмпас в первой линии В-ХЛЛ

---

- Делеция 17p
- Прогрессия на фоне лечения или рецидив в течение 12 месяцев от начала терапии

Преимущественное поражение костного мозга –  
монотерапия

Большие размеры лимфоузлов – в комбинации с FC  
с СНОР

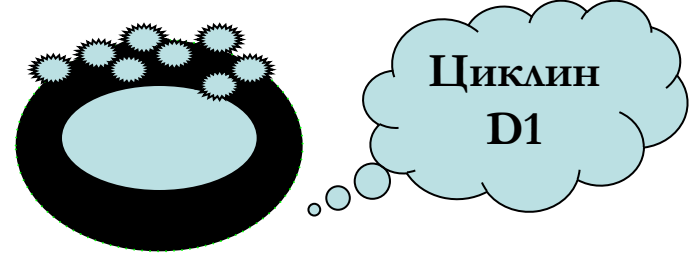
- Гиперлейкоцитозные формы с цитопенией

- Протоонкогены – гены, чьи продукты участвуют в регуляции клеточной пролиферации.
- Мутации этих генов приводят к неконтролируемой пролиферации и протоонкоген может стать онкогеном (хромосомные транслокации, точечные мутации, амплификация)

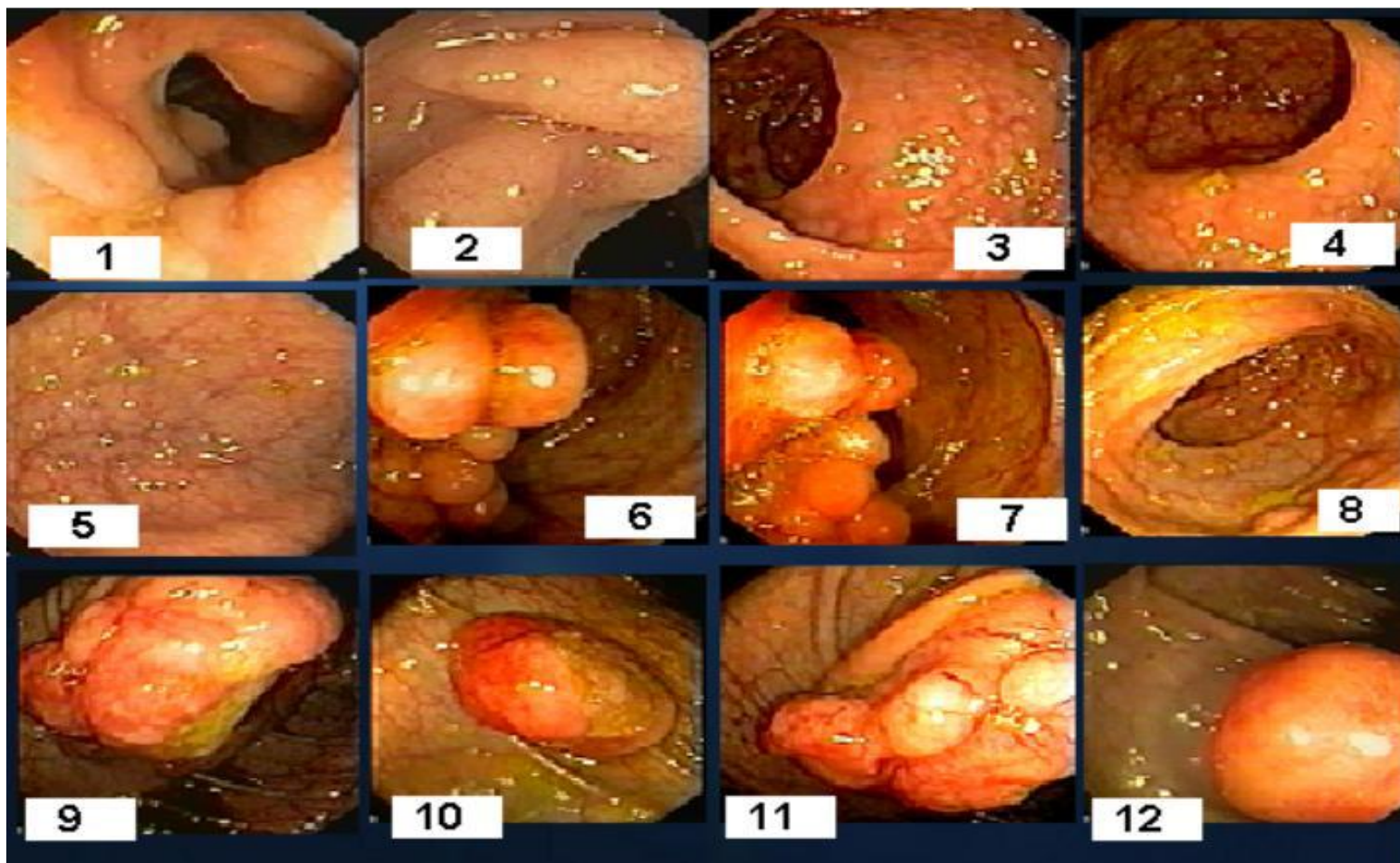
<b>Онкоген</b>	<b>Форма рака</b>
<b>C-raf</b>	Рак легкого, слюнной железы
<b>C-kit</b>	Рак легкого
<b>myc</b>	Мелкоклеточный рак легкого, рак толстой кишки, лимфома
<b>N-myc</b>	Нейробластома
<b>R-ras</b>	Рак толстой кишки
<b>erbA</b>	Лимфома. Мелкоклеточный рак легкого
<b>Bcr-abl</b>	Хронический миелолейкоз
<b>ras</b>	Рак толстой кишки, поджелудочной железы, мочевого пузыря, легкого



# ЛКМЗ

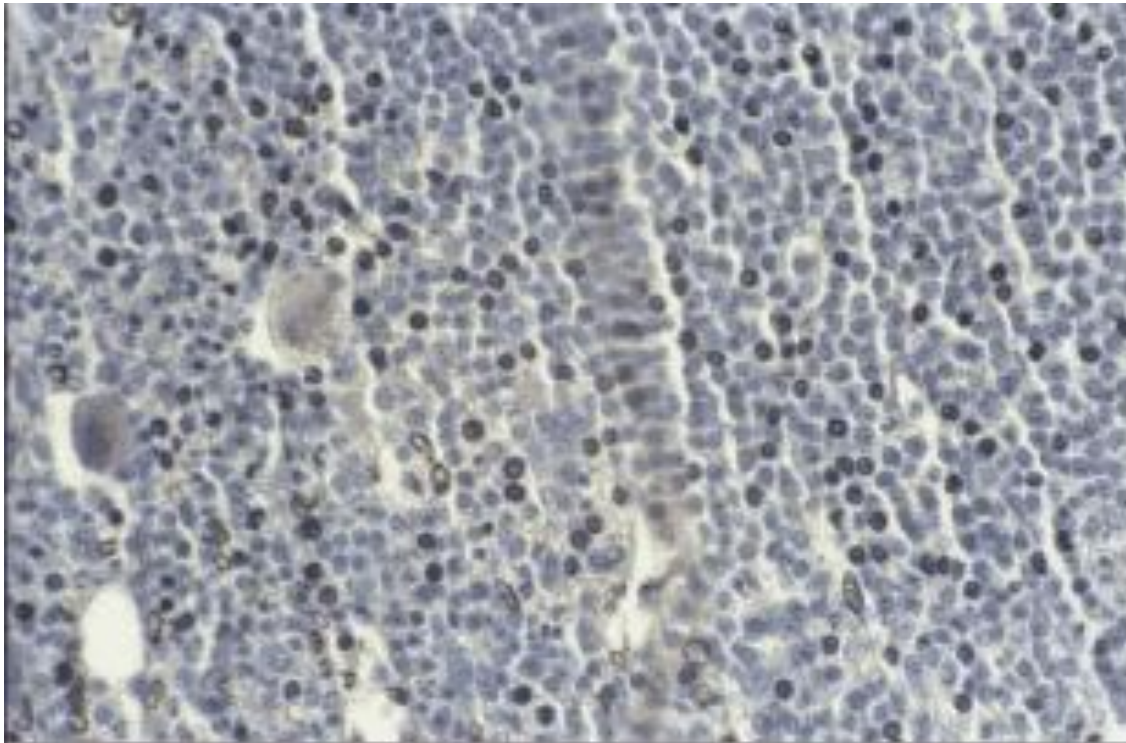


- В-клеточная опухоль, характеризующаяся транслокацией или амплификацией локуса 11q13, приводящими к гиперэкспрессии ядерного белка циклина D1
- **Циклин D1, в комплексе с циклинзависимыми киназами 4 и 6 (ЦЗК4/6) является регулятором перехода клеток из G1 в S-фазу клеточного цикла.**
- В группу циклинов D1 входят 3 белка: D1 D2 D3, в лимфоцитах в норме экспрессируется D3. (D1 экспрессируется только в эпителиальных и мезенхимальных клетках. )
- В кариотипе опухолевых клеток выявляется патогенетическая транслокация  $t(11;14)(q13;q32)$ , приводящая к гиперэкспрессии ядерного белка циклина D1 и нарушению обратной регуляции клеточного цикла.  
В клетке существует два класса ингибиторов комплекса циклин D1:
  - семейство Cip/Kip представлено белками p21, p27 и p57
  - семейство INK4 представлено белками p15 и p16, p18 и p19.
- Эти гены избирательно блокируют циклин D-зависимые киназы. Вторичные цитогенетические нарушения при прогрессии лимфомы из клеток мантийной зоны связаны с делециями именно этих генов.



1-2 – толстые ригидные складки;  
3-5 – лимфатические фолликулы подслизистого слоя;  
6-8 – лимфоматозный полипоз; 9-12 – опухоли.

# ЛКМЗ

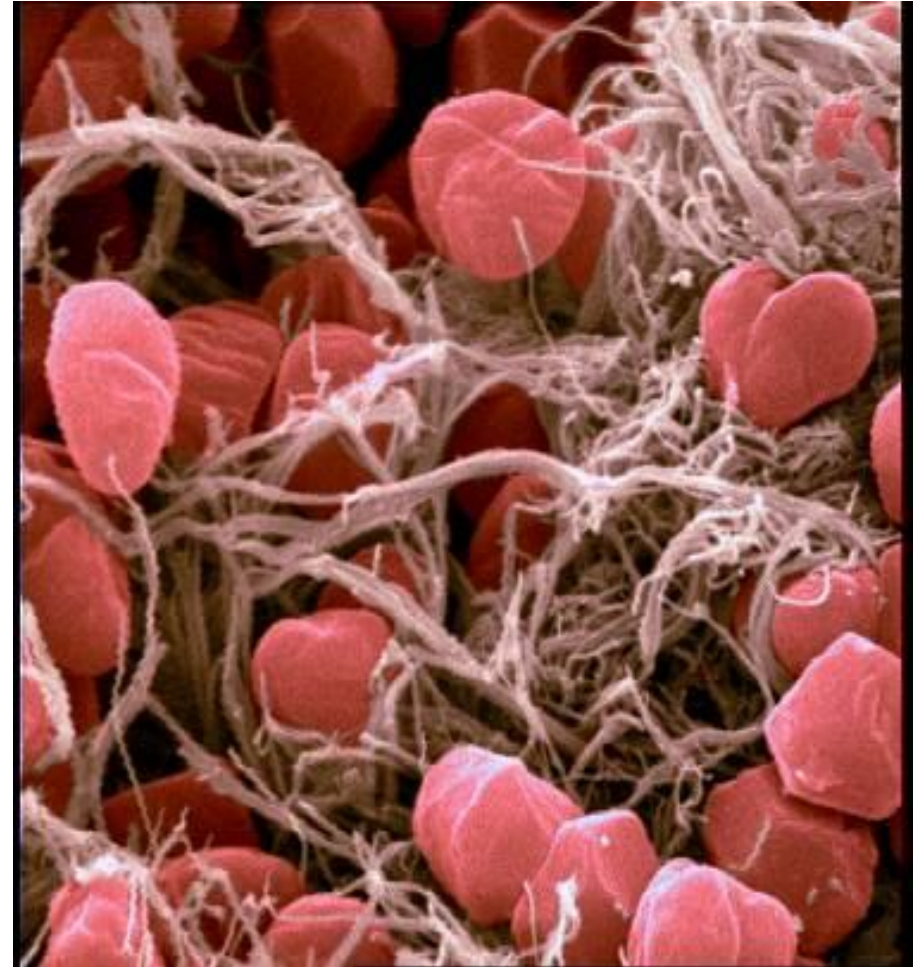


- *Ядерная экспрессия циклина D1 клетками костномозгового субстрата лимфомы из клеток мантии.  
Иммуногистохимия, ув. 250*



# Регуляция клеточного цикла в тканях

- При разработке метода выращивания клеток в культуре, было отмечено, что клетки растут лучше, если находятся внутри кровяных сгустков. Это вещество – тромбоцитарный фактор роста – PDGF
- Факторы роста с широким диапазоном клеточной и тканевой специфичности: PDGF, EGF, FGF, NGF, EPO, IL-2, IL-3



# Факторы роста

## Факторы роста

- Семейство тромбоцитарных факторов роста (PDGF) : PDGF A, PDGF B, VEGF, PLGF, CSF-1 SCF-стабильный фактор;
- Семейство факторов роста фибробластов (FGF) :  $\alpha$  FGF,  $\beta$  FGF, int-2, K-FGF, FGF-5, FGF-6, KGF, FGF-8, FGF-9;
- Семейство инсулинов: инсулин, инсулиноподобный фактор роста IGF-1, инсулиноподобный фактор роста IGF-2;
- Семейство эпидермальных факторов роста (EGF)
- Фактор роста опухолей  $\alpha$
- Семейство факторов роста нервов NGF NGF, BDNF, NT-3,4,5,
- Семейство факторов роста гепатоцитов HGF

## Колонистимулирующие факторы CSF

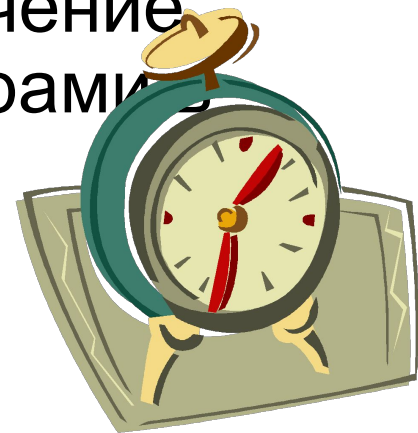
- Гранулоцит-колонистимулирующий фактор G-CSF,
- Моноцит-колонистимулирующий фактор M-CSF,
- Гранулоцит-моноцит-колонистимулирующий фактор GM-CSF

## Трансформирующие фактор роста

- TGF $\beta$
- BMP

# Старение - феномен Хейфлика.

- Клетки запрограммированы на определенное число делений, а затем прекращают делиться
- Репликативное старение
  - сокращение длины теломер
  - повышение экспрессии p21, ингибитора циклинзависимых киназ
- Существуют серьезные доказательства, что окислительное воздействие и ограничение калорий являются ключевыми факторами в процессе старения





# Теломеры

- Теломеры-это концевые участки хромосом, которые содержат повторяющиеся последовательности ДНК и укорачиваются с каждой репликацией.
- В самообновляющихся и активно делящихся популяциях клеток (например, стволовых) действует фермент теломераза, способный наращивать теломерные последовательности.
- От степени сохранности теломер зависит пролиферативный потенциал клетки; в опухолевых клетках длины теломер обычно поддерживаются на постоянном уровне

# Апоптоз – программируемая клеточная гибель.



- Регуляция процессов клеточного деления необходима для выживания организма. Размножение клеток зависит от скорости пролиферации и смерти клеток. Скорость клеточной смерти зависит от скорости стимулирования и ингибирования клеточной смерти.
- Систематическое удаление клеток путем апоптоза (апо-полное ptosis – падение, утрата) в переводе с греческого опадание цветочных лепестков, «осенний листопад»). Этот термин впервые применен в 1972 году J.F.Kerr для описания конкретной морфологической картины одного из видов клеточной смерти.
  - Удаление умирающих клеток при апоптозе происходит без воспаления
  - Некроз-патологическая форма смерти клеток в результате их острого повреждения, разрыва оболочки, высвобождения содержимого цитоплазмы

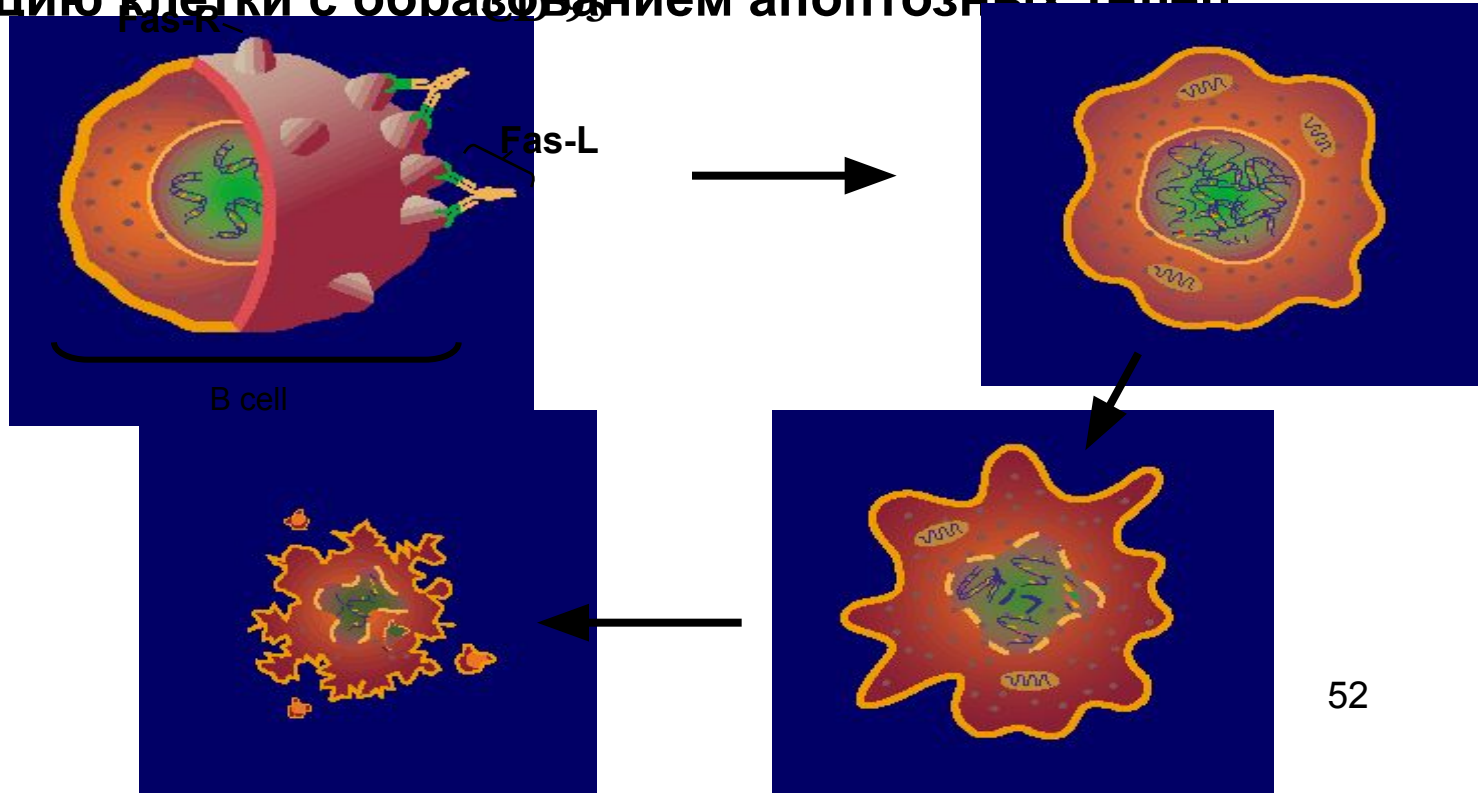
# Апоптоз – программируемая клеточная гибель.

- француз Бонне различал следующие четыре типа ядерной дегенерации:
- **Кариорексис** - хроматин распадается на бесформенные скопления обломков и гранул, которые после разрыва ядерной оболочки попадают в цитоплазму и там дегенерируют
- **Кариопикноз** - "хроматиновая сеть" отстает полностью или почти полностью от ядерной оболочки и слипается в гомогенную массу. Ядерная оболочка сморщивается, ядро теряет тургор, хроматин распыляется и отдельные его гранулы растворяются в цитоплазме.
- **Кариолизис** или хроматолиз - хроматин постепенно растворяется. Ядро и цитоплазма в начале окрашиваются основными красителями весьма интенсивно, но затем хроматин теряет свои морфологические и химические особенности и ядерное вещество переходит в цитоплазму и там растворяется.
- **Вакуолированная ядерная дегенерация** - в ядре появляется одна или несколько вакуолей, которые постепенно увеличиваются, оттесняя хроматин к периферии ядра и здесь он образует отдельные скопления

# Этапы апоптоза

Каскад апоптотической гибели включает:

- Конденсацию хроматина, разрезание нитей хроматина эндонуклеазой на равные отрезки около 180 пар нуклеотидов («лестница» на электрофореze), распад ядра на фрагменты (кариорексис)
- Разрушение ядра
- Вспучивание плазматической мембраны
- Фрагментацию клетки с образованием апоптотических телец



# Механизмы апоптоза

- 2 фазы:
- Формирование и проведение апоптотического сигнала – фаза принятия решения
- Демонтаж клеточных структур – эффекторная фаза. Каспазы (цистеиновые протеазы) расщепляют белки в местах расположения аспарагиновых оснований



# Каспазы



- Семейство протеаз, участвующих в апоптозе
- Существует 14 видов каспаз
- Активаторы цитокинов (каспазы 1,4, 5, 13)
- Индукторы активации эффекторных каспаз (каспазы 2,8,9,10) ICAD
- Эффекторные каспазы-исполнители апоптоза (каспазы 3,6,7)
- После активации каспазы 9, затем каспазы 3, белок Вах накапливается, образует гомодимеры и инициирует высвобождение цитохрома С.
- Ингибирует апоптоз каспаза Bcl-2
- Ускоряет апоптоз белок Bad, образующий гетеродимеры с Bcl-2



# Сигнальные пути апоптоза

- Повреждение ДНК, радиация, токсические воздействия, глюкокортикоиды, укорочение теломер приводит к активации каспазы 9
- Проапоптотические сигналы Fas-R, TNF-R, активация каспазы 8,  $Ca^{2+}$  (зависимый от протеинкиназы C)
- **Инициация апоптоза происходит под действием :**
  - двухвалентных ионов  $Ca^{2+}$  (проапоптотическая мобилизация внутриклеточного депо  $Ca$ ) ,
  - недостатка  $Zn^{2+}$  (антиапоптоз, за счет подавления эндонуклеазы)
  - изменения мембран апоптотических клеток



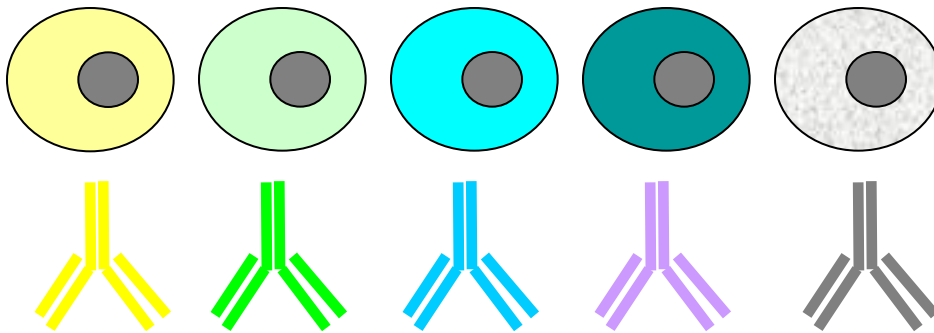
# Изменения мембран апоптотических клеток

- Клеточная мембрана апоптозной клетки теряет сиаловую кислоту на гликопротеинах и гликолипидах, входящих в ее состав
- Клетка становится доступной для фагоцитоза
- Макрофаги притягивают экспрессирующиеся рецепторы для витронектина
- Поверхностное расположение фосфатидилсерина

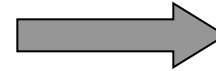


# СХЕМА ПОЛУЧЕНИЯ ГИБРИДОМ для производства моноклональных антител

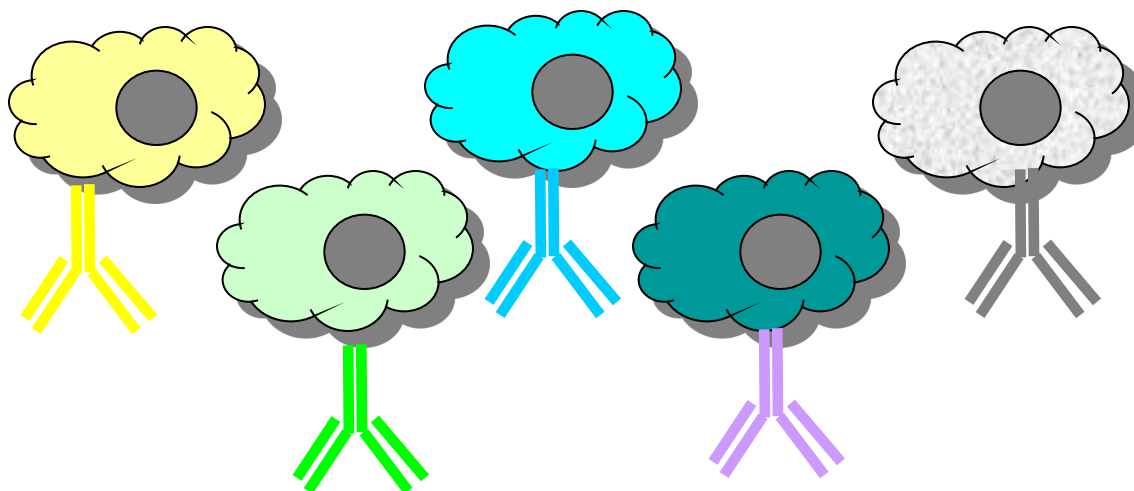
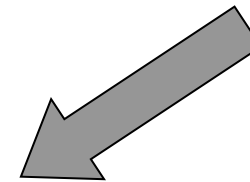
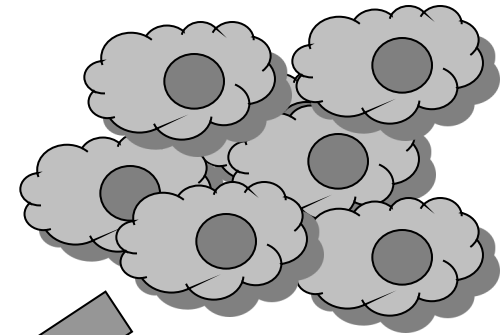
клетки, секретирующие антитела



слияние

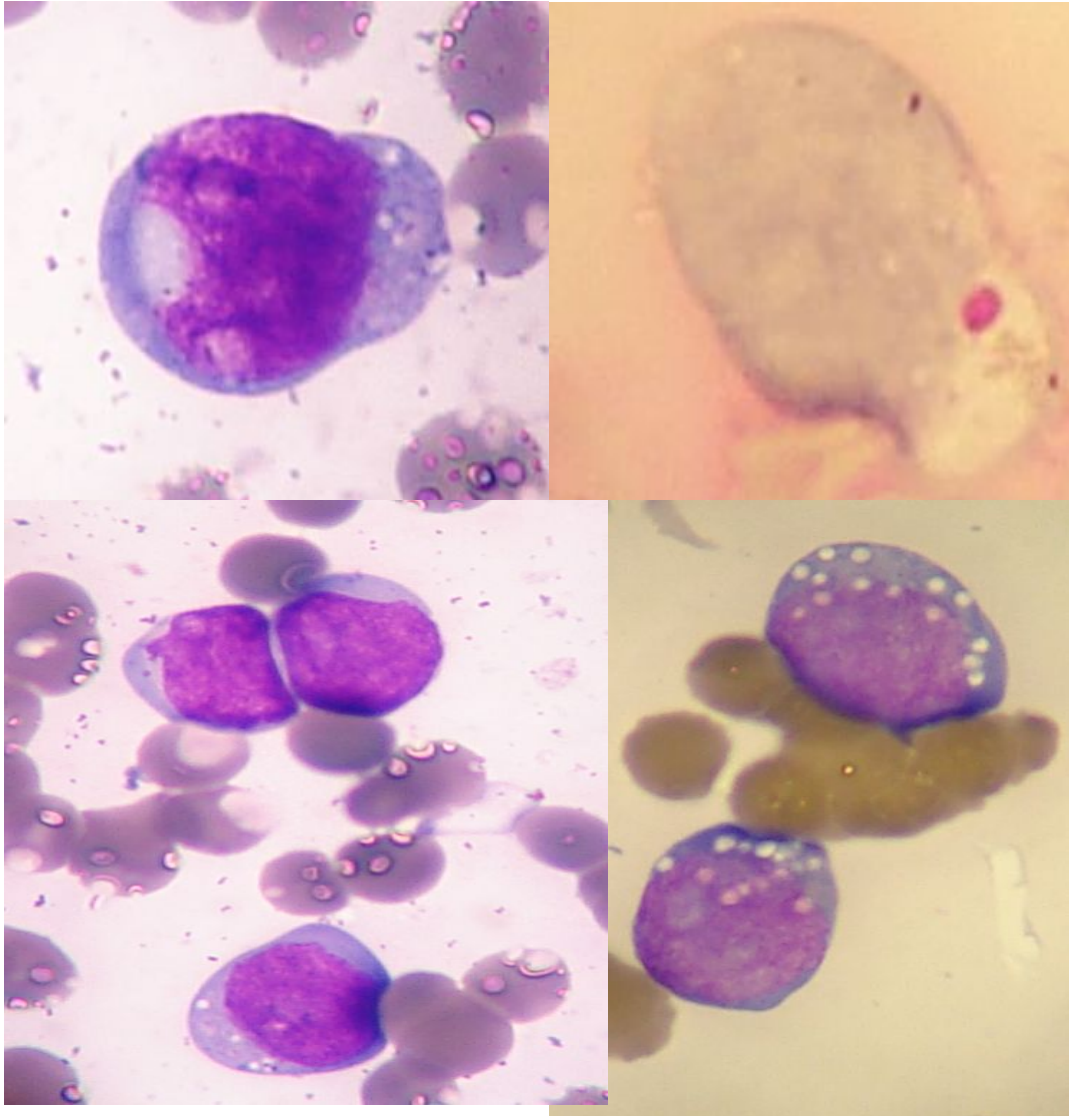


бессмертная  
клеточная линия



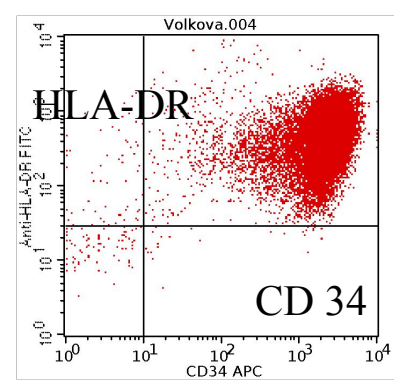
в результате  
слияния  
получаются  
гибридомы

# Клинический случай 1



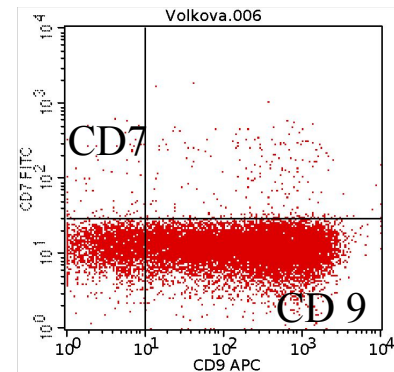
- **Б-ая В.** 66 лет , поступила в отделение гематологии 21.05.2007 , ОАК:  
L- $8.66 \cdot 10^9$ /л, СОЭ 82 мм/ч  
Hb 52 г/л, Эр. $1.52 \cdot 10^9$ /л  
тромбоцитопения, Бластных клеток 48%.
- Печень, селезенка не увеличены, л/узлы передне-шейные, надключичные, подмышечные до 1.5-2 см плотной консистенции.
- На коже рук, ног петехиально-экхимозные гемorragии
- В костномозговом пунктате бластных клеток 72%,
- Цитохимически: МПО в 1%, гликоген гранулярный в 63% , преимущественно одиночные крупные гранулы

# Клинический случай 1



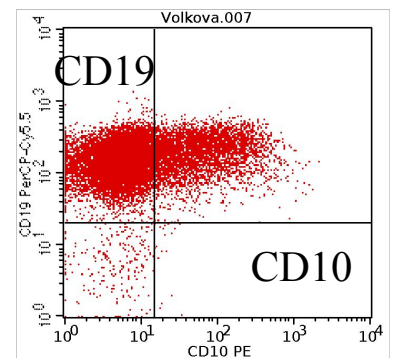
File: Volkova.004  
 Tube: HLA-DR/CD13/CD34  
 Gate: G2  
 X Parameter: CD34 APC (Log)  
 Y Parameter: Anti-HLA-DR FITC (L)

Quad	Events	% Gate	% Tot
UL	65	0.34	0.15
UR	19061	99.16	44.71
LL	71	0.37	0.17
LR	26	0.14	0.06



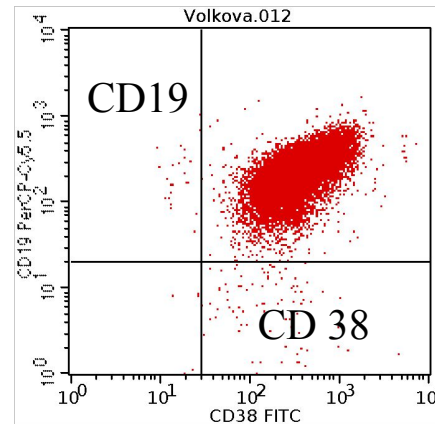
File: Volkova.006  
 Tube: CD7/CD33/CD9  
 Gate: G2  
 X Parameter: CD9 APC (L)  
 Y Parameter: CD7 FITC (L)

Quad	Events	% Gate	% Tot
UL	78	0.44	0.18
UR	256	1.44	0.60
LL	2478	13.91	5.85
LR	15002	84.21	35.44



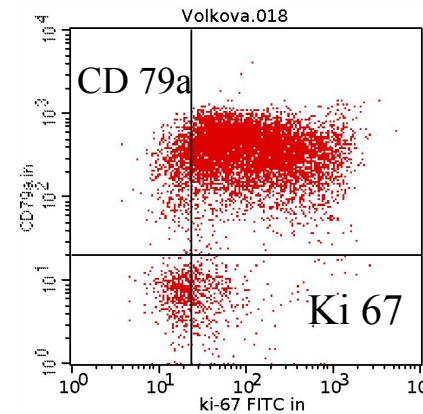
File: Volkova.007  
 Tube: CD5/CD10/CD19/CD138  
 Gate: G2  
 X Parameter: CD10 PE (Log)  
 Y Parameter: CD19 PerCP-Cy5.5 (L)

Quad	Events	% Gate	% Tot
UL	1139	71.31	26.22
UR	4341	27.18	9.99
LL	226	1.41	0.52
LR	15	0.09	0.03



File: Volkova.012  
 Tube: CD38/CD56/CD19/CD11C  
 Gate: G2  
 X Parameter: CD38 FITC (Log)  
 Y Parameter: CD19 PerCP-Cy5.5 (L)

Quad	Events	% Gate	% Tot
UL	24	0.15	0.06
UR	16052	99.31	41.30
LL	5	0.03	0.01
LR	83	0.51	0.21



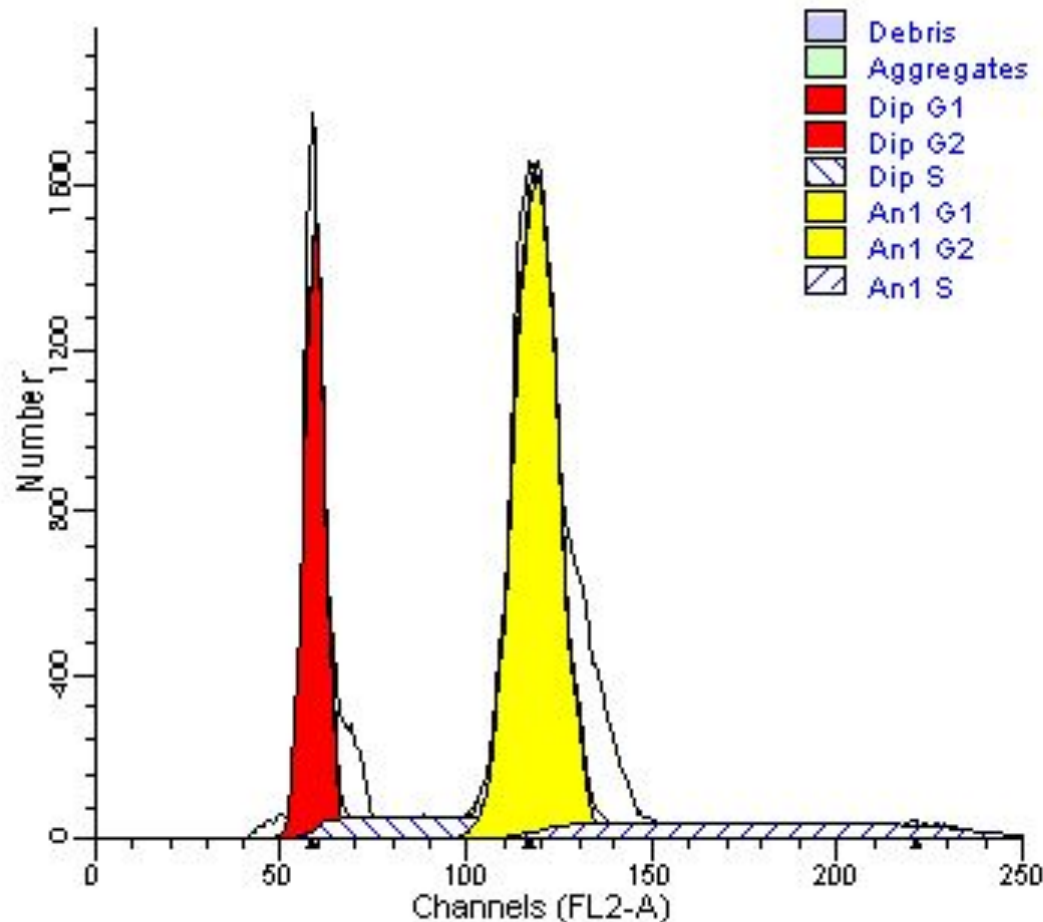
File: Volkova.018  
 Tube: Ki67/CD79a/CD3  
 Gate: G7  
 X Parameter: ki-67 FITC in (L)  
 Y Parameter: CD79a in (Log)

Quad	Events	% Gate	% Tot
UL	685	7.90	1.53
UR	7215	83.16	16.16
LL	421	4.85	0.94
LR	355	4.09	0.80

Иммунофенотип опухолевых клеток: CD34+, HLA-DR+, CD19+, CD79a+, CD10-/+ , CD9+, CD38+, Ki-67+, TDT-, CD45+.

**Заключение:** Данный иммунофенотип соответствует В-клеточному острому лимфобластному лейкозу, В I варианту.

# Клинический случай 1



File analyzed: Volkova.010  
Date analyzed: 22-May-2007  
Model: 2DA0n\_DS\_n\_TSD  
Analysis type: Automatic analysis

Diploid: 35.63 %  
Dip G1: 72.38 % at 59.15  
Dip G2: 8.00 % at 118.86  
Dip S: 19.62 % G2/G1: 2.01  
%CV: 4.78

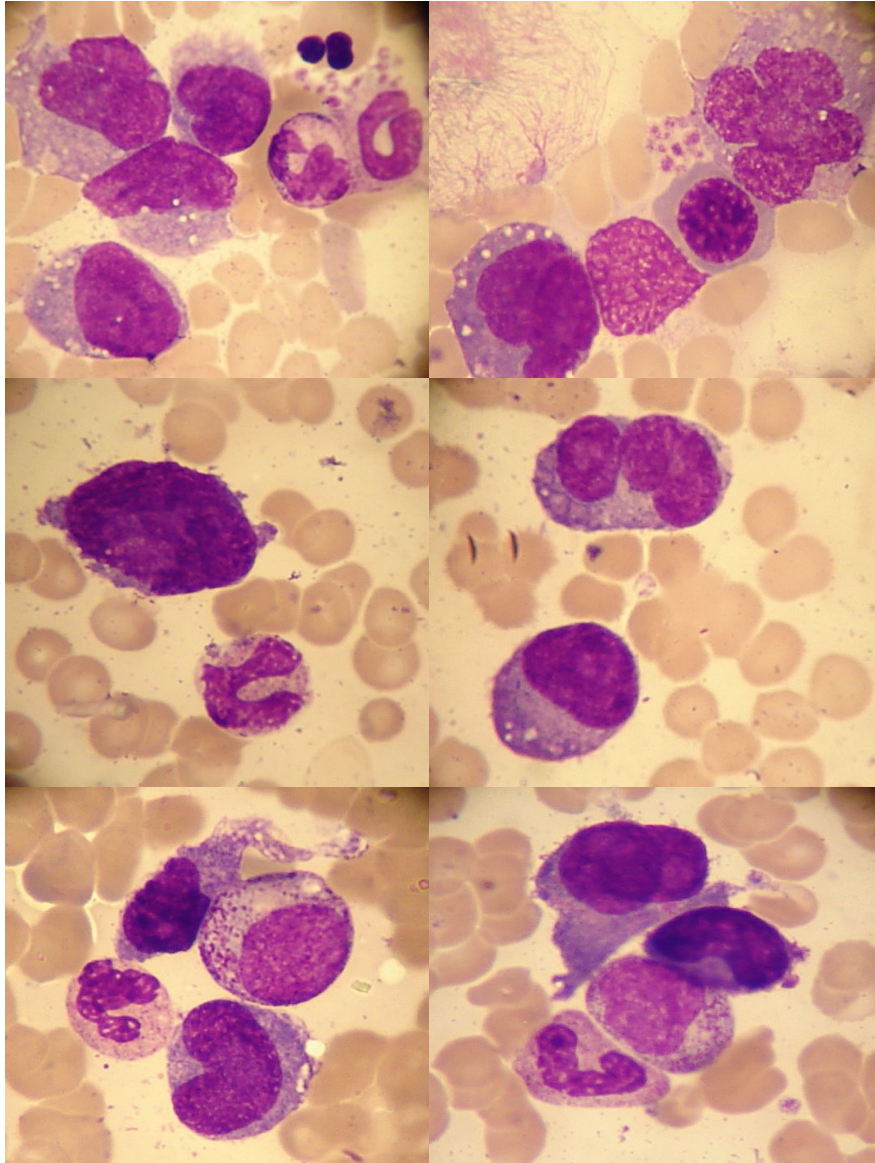
Tetraploid: 64.37 %  
An1 G1: 84.73 % at 118.86  
An1 G2: 0.00 % at 237.72  
An1 S: 15.27 % G2/G1: 2.00  
%CV: 4.98 DI: 2.01

Total Aneuploid S-Phase: 15.27 %  
Total S-Phase: 16.82 %  
Total B.A.D.: 0.00 %

Debris: 0.07 %  
Aggregates: 0.00 %  
Modeled events: 42091  
All cycle events: 42064  
Cycle events per channel: 234  
RCS: 37.510



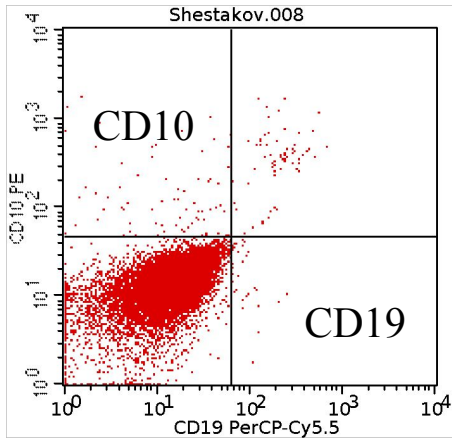
# Клинический случай 2



Б-й Ш., 39 лет, поступил с жалобами на повышение температуры до 40

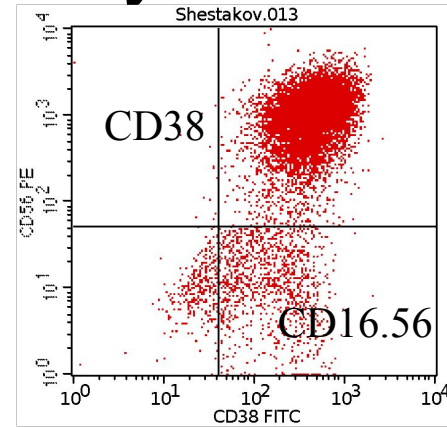
- наблюдается в отделении гематологии с апреля 2006 года
- В миелограмме обнаруживалось до 31 % атипичных лимфоцитов
- Биопсия лимфоузла 12.05.2006: фрагмент лимфоузла а паранодальной клетчаткой с наличием пролиферации крупных клеток (в 3-5 раз больше лимфоцита). Определяются крупные клетки с пузырьковидными ядрами и центрально расположенным базофильным ядрышком, клетки средних размеров с 2-3 ядрышками, клетки с ращепленными ядрами и участки с наличием зрелых лимфоидных клеток. Патологические митозы. Инфильтрация капсулы и паранодальной клетчатки. Закл.: больше данных за диффузную крупноклеточную лимфому.
- Выявлен М-градиент 41,4 г/л (46%), секрета легких цепей каппа-типа
- Гепатомегалия+3см.,
- Внутрибрюшинные лимфоузлы увеличены до 4.5см
- Проведено 8 курсов ПХТ (R-CHOP), ремиссия не достигнута.

# Клинический случай 2



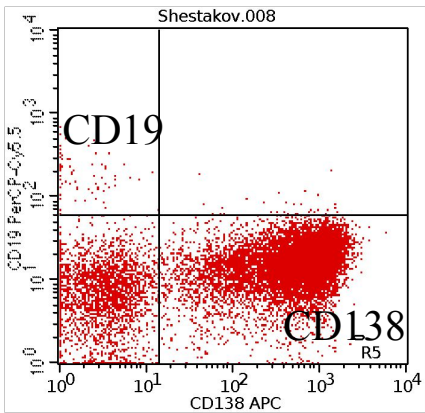
File: Shestakov.008  
 Tube: CD5/CD10/CD19/CD138  
 Gate: G2  
 X Parameter: CD19 PerCP-Cy5.5 (Log)  
 Y Parameter: CD10 PE (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	75	0.55	0.09
UR	65	0.48	0.08
LL	13381	98.75	15.75
LR	29	0.21	0.03



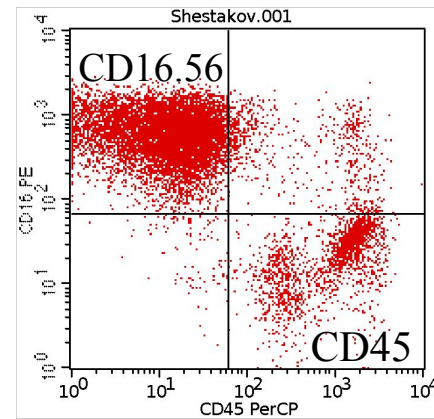
File: Shestakov.013  
 Tube: CD38/CD56/CD19/CD11  
 Gate: G2  
 X Parameter: CD38 FITC (Log)  
 Y Parameter: CD56 PE (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	14	0.13	0.02
UR	9498	87.03	14.13
LL	299	2.74	0.44
LR	1102	10.10	1.64



File: Shestakov.008  
 Tube: CD5/CD10/CD19/CD138  
 Gate: G2  
 X Parameter: CD138 APC (Log)  
 Y Parameter: CD19 PerCP-Cy5.5 (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	73	0.54	0.09
UR	36	0.27	0.04
LL	2408	17.77	2.84
LR	11033	81.42	13.02



File: Shestakov.001  
 Tube: CD3/CD16+56/CD45/CD  
 Gate: G2  
 X Parameter: CD45 PerCP (Log)  
 Y Parameter: CD16 PE (Log)

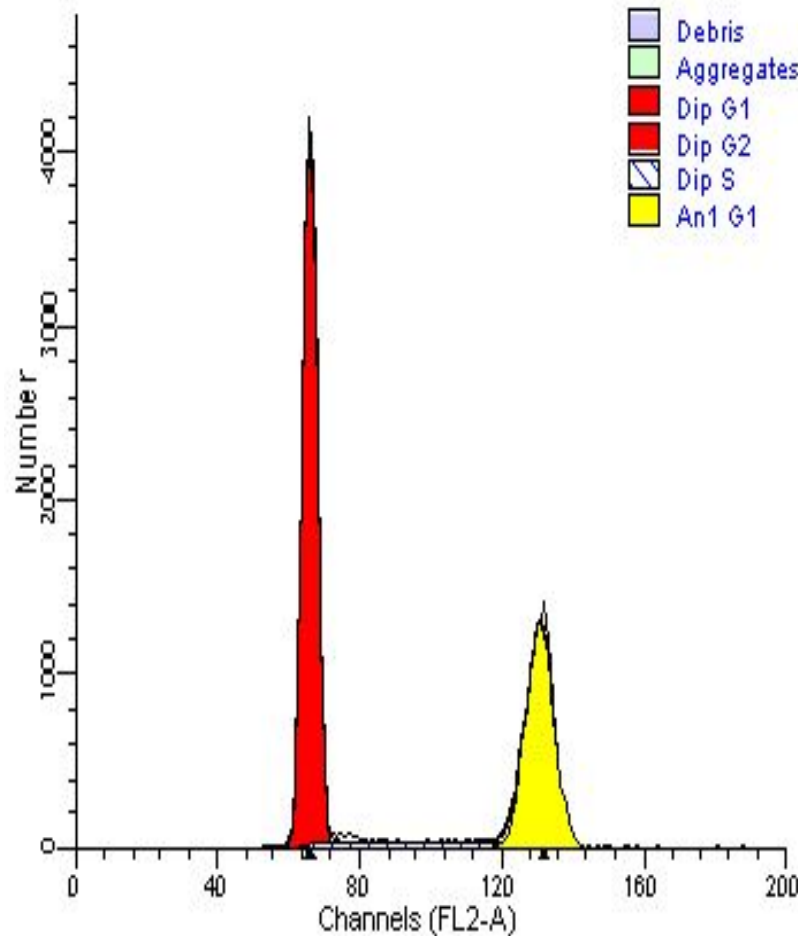
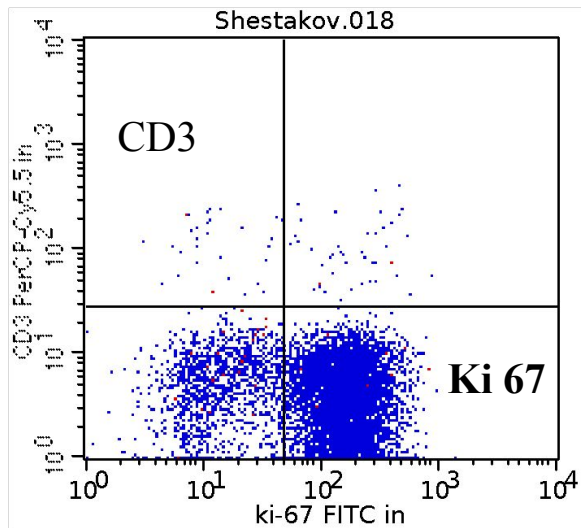
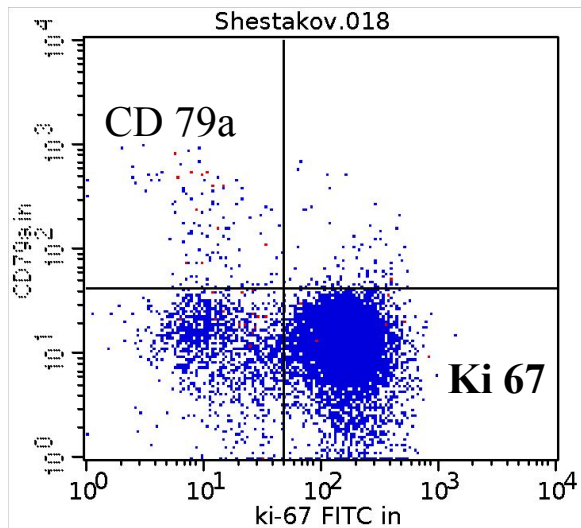
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	8765	76.83	11.64
UR	681	5.97	0.90
LL	105	0.92	0.14
LR	1857	16.28	2.47

**Заключение:** Данный иммунофенотип в наибольшей степени соответствует плазмноклеточной пролиферации.

Иммунофенотип опухолевых клеток: CD138+, CD38+, CD56+, CD13+, CD71+, Ki-67+, CD45+.



# Клинический случай 3



File analyzed: shestakov.004  
 Date analyzed: 4-May-2007  
 Model: 2DA0n\_DS\_n\_TSD  
 Analysis type: Automatic analysis

Diploid: 69.14 %  
 Dip G1: 80.30 % at 66.13  
 Dip G2: 8.00 % at 130.84  
 Dip S: 11.70 % G2/G1: 1.98  
 %CV: 2.80

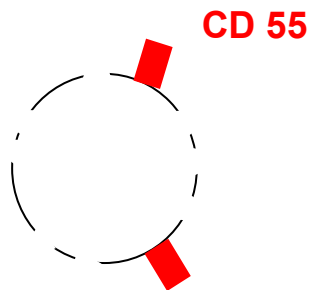
Tetraploid: 30.86 %  
 An1 G1: 100.00 % at 130.84  
 An1 G2: % at  
 An1 S: 0.00 % G2/G1:  
 %CV: 2.98 Di: 1.98

Total Aneuploid S-Phase: 0.00 %  
 Total S-Phase: 8.09 %  
 Total B.A.D.: 0.02 %

Debris: 0.07 %  
 Aggregates: 0.04 %  
 Modeled events: 34665  
 All cycle events: 34625  
 Cycle events per channel: 516  
 RCS: 3.399

# Комбинация флудара + ритуксимаб

---



**Снижение экспрессии CD55  
Усиление апоптоза**

**CD 55 мешает действию ритуксимаба  
Флударабин ингибирует CD55**

1. Wierda W, et al. *J Clin Oncol* 2005; 98:3383–3389;
2. Chow KU, et al. *Haematologica* 2002; 87:33–43.
3. Byrd J, et al. *Blood* 2002; 99:1038–1043.
4. Alas S, et al. *Clin Cancer Res* 2001; 7:709–723.
5. Di Gaetano N, et al. *Br J Haematol* 2001; 114:800–809.



# Совместное российское исследование



**Спасибо, что не  
вздремнули!**



# ЛИТЕРАТУРА

- Кассирский И.А. и Алексеев Г.А. Клиническая гематология. М., 1970; Максимов А.А. Основы гистологии, ч. 1—2, Л., 1925;
- Руководство по гематологии, под ред. А. И. Воробьева, М., 2002;
- Чертков И.Л. и Воробьев А.И. Современная схема кроветворения, Пробл. гематол и перелив. крови, 1973, т. 18, №10, с, 3, библиогр.;
- Чертков И.Л. и Фриденштейн А.Я. Клеточные основы кроветворения, М., 1977, библиогр.
- Д.М. Фаллер, Д. Шилдс Молекулярная биология клетки. М., Бином-пресс, 2006, 260 с.
- Е.Б.Владимирская Биологические основы противоопухолевой терапии.-М.,2001.-110 с.



