

Лабораторне заняття № 3

Тема: РОЗМНОЖЕННЯ НА КЛІТИННОМУ РІВНІ. ЖИТТЄВИЙ ЦИКЛ КЛІТИНИ. МІТОЗ

Мета заняття: Ознайомитися з життєвим циклом клітин. Навчитися аналізувати зміни клітин та їх структур під час життєвого циклу та значення порушення мітозу

Теоретичні питання для самопідготовки та обговорення на занятті:

1. Структура інтерфазного ядра. Рівні упакування генетичного матеріалу.
3. Організація клітини у часі. Клітинний цикл.
4. Мітоз, фази мітозу, характеристика.
5. Біологічне значення мітозу.
6. Регулювання клітинного циклу, контрольні точки і залучені компоненти
7. Поняття про мітотичну активність тканин. Фактори, які впливають на мітотичну активність.
8. Проліферація та диференціювання клітин.

Теоретичний матеріал:

В еукаріотичних клітинах весь генетичний матеріал знаходиться у ядрі. Інтерфазне ядро складається з ядерної оболонки, каріоплазми, ядерця. **Ядерна оболонка** складається з двох мембран, між якими знаходиться перинуклеарний простір. Перинуклеарний простір через канали ЕПС зв'язує каріоплазму і цитоплазму. Оболонка ядра пронизана багаточисельними порами, які можуть змінювати свій розмір. **Каріоплазма** містить воду, хроматин, білки-ферменти, р-РНК, т-РНК, і-РНК, ядерні білки. **Ядерце** містить велику кількість р-РНК, білки. Тут утворюються субодиночі рибосом. Ядерця утворюються на вторинних перетяжках хромосом (ядерцеві організатори). **Функції ядра:**

1. Збереження спадкової інформації в молекулах ДНК.
2. Реалізація спадкової інформації шляхом синтезу білків, що забезпечують підтримання всіх життєвих процесів клітини.
3. Передача спадкової інформації шляхом реплікації ДНК, утворення хромосом та їх ділення.

Процеси, які відбуваються в ядрі: реплікація, транскрипція всіх видів РНК, процесинг, утворення рибосом. Генетичний матеріал в інтерфазному ядрі знаходиться у вигляді **хроматину** (комплекс ДНК та білків у співвідношенні 1:1). До складу хроматину входять гістонові та негістонові білки. **Гістонові білки** (основні, їх всього 5 видів) виконують структурну функцію. **Негістонові** білки-ферменти (кислі, їх більше 100 видів) беруть участь у процесах, які відбуваються на ДНК (реплікація, транскрипція, репарація). Під час поділу клітин з хроматинових ниток формуються хромосоми, які відіграють головну роль у цьому процесі, тому що вони забезпечують передачу спадкової інформації від одного покоління до другого і беруть участь в регуляції клітинного метаболізму. До складу хромосом еукаріотичних клітин входять ДНК, білки, невелика кількість РНК та іони Mg^{2+} і Ca^{2+} . Хромосоми можуть знаходитися у 2-х структурно-функціональних станах:

- 1) **Деспіралізованому** (неконденсованому)— в клітині, яка не ділиться хромосом не видно, виявляються лише грудочки та гранули хроматину.
- 2) **Спіралізованому** (конденсованому)— на час поділу клітини хроматин конденсується і при мітозі хромосоми добре помітні.

На різних ділянках хромосоми спіралізація хроматину неоднакова. З цим пов'язана різна інтенсивність забарвлення окремих ділянок хромосоми. Більш спіралізовані та інтенсивно забарвлені ділянки (**гетерохроматин**) виконують **структурну функцію**. Менш спіралізовані та слабо забарвлені ділянки (**еухроматин**) виконують **інформативну функцію**. Хроматин клітини може знаходитись на декількох **рівнях організації або упакування**.

Нуклеосомний. Тонка нитка нуклеопротеїда складається з нуклеосом. Нуклеосома – це частина, що містить диски з 8 молекул білків-гістонів (H2, H2A, H3, H4), на яку накручується ділянка ДНК, що складається з 140 пар нуклеотидів. Між дисками знаходиться ДНК, що складається з 60-100 пар нуклеотидів. **Нуклеомерний.** Відбувається подальше вкорочення ДНК за рахунок зближення 8-10 нуклеосом. Утворюються **нуклеомери**. Довжина ДНК зменшується в 6 разів. **Хромомерний (хромонемний, петлеподібний).** Нуклеомери збираються в групи, утворюючи хромомери. Довжина ДНК зменшується в 10-30 разів та утворюються хромонеми. **Метафазний.** Щільно упакована хромонема у вигляді дисків утворює метафазну хроматиду. Довжина хромосоми зменшується ще в 10 разів. У хромосомах розрізняють первинну **перетяжку** (центромеру), яка ділить хромосому на 2 **плеча**. Кінці плечей називаються **теломерами**. Вони не дозволяють з'єднатися хромосомі з іншими хромосомами. Деякі хромосоми мають вторинні перетяжки, які відокремлюють ділянки хромосом (**супутники**) **Центромера** може мати різне розташування, від цього залежить форма хромосом. Розрізняють:

- **Метацентричні** – мають рівні чи майже рівні плечі;
- **Субметацентричні** – мають плечі різної довжини;
- **Акроцентричні** – мають паличкоподібну форму, з дуже коротким другим плечем.

Деякі хромосоми мають вторинну перетяжку, яка відокремлює від плеча супутник. Хромосомні набори еукаріот підлягають таким **правилам**:

1. Правило постійності кількості хромосом (число хромосом та характерні особливості їх будови – видова ознака).

2. Правило парності хромосом (хромосоми, які відносяться до одної пари, називаються гомологічними: вони мають однаковий розмір і будову).

3. Правило індивідуальності хромосом (кожна пара характеризується своїми особливостями).

4. Правило неперервності хромосом (хромосоми, здатні до авторепродукції під час поділу клітини).

В ядрах клітин тіла (соматичних клітинах) міститься повний, подвійний набір хромосом. Такий набір називається **диплоїдним** і позначається **2n**. В ядрах статевих клітин з кожної пари гомологічних хромосом присутня лише одна. Такий набір називається **гаплоїдним** і позначається **n**. Диплоїдний набір хромосом клітини, який характеризується їх числом, розмірами та формою, називається **каріотипом**. **Ідіограма** – це систематизований каріотип, коли хромосоми розташовуються у порядку зменшення їх довжини. Нормальний каріотип людини – 46 хромосом, або 23 пари. З них 22 пари – хромосоми однакові у чоловіків і жінок (**аутосоми**) і одна пара – статеві хромосоми (**гетерохромосоми**). **Життєвий цикл клітини** – це період онтогенезу від народження клітини (ділення) до загибелі або наступного поділу. **Клітинний (мітотичний) цикл** – це період життя клітини від одного поділу до другого. Цей цикл складається з трьох головних стадій:

- Інтерфаза.
- Мітоз (каріокінез).
- Цитокінез.

Інтерфаза – це період між поділами клітини. Він включає три етапи:

1) Пресинтетичний (G1) – відбувається синтез РНК і структурних білків. За їх рахунок відновлюються і диференціюються органоїди клітини після мітозу. Клітина росте. Хромосоми складаються з однієї хроматиди. Набір генетичного матеріалу **2n2c**, де **n** – кількість хромосом, **c** – кількість ДНК.

2) Синтетичний (S) – відбувається редуплікація ДНК, синтез ядерних білків (гістонів). Тепер кожна хромосома складається з двох хроматид, **2n4c**.

3) **Постсинтетичний (G2)** – йде синтез АТФ, РНК, білків веретена поділу. Діляться мітохондрії та хлоропласти. Центріолі подвоюються, починає утворюватись веретено поділу **2n4c**.

Мітоз складається з 4-х фаз:

1) **Профаза** – хромосоми скручуються, вкорочуються, потовщуються. Хроматиди відштовхуються і поєднані лише в області центромери. Ядерця та ядерна мембрана руйнуються. Хромосоми потрапляють у цитоплазму. В цей же час центріолі розходяться до полюсів клітини. Навколо кожної центріолі утворюється веретено поділу (зірка). В клітинах вищих рослин немає центріолей. Веретено поділу будується від полюсів клітини. **2n4c**

2) **Метафаза** – хромосоми прикріплюються своїми центромерами до ниток веретена поділу. Вони вишиковуються на екваторі в одну лінію, їх добре видно і в них Х-подібна форма, **2n4c**. **Метафазну пластинку** використовують для вивчення каріотипу.

3) **Анафаза** – кожна центромера розщеплюється на дві, хроматиди відходять одна від одної. Нитки веретена поділу розтягують дочірні хромосоми до протилежних полюсів, **4n4c**.

4) **Телофаза** – хромосоми переміщуються до полюсів клітини, деспіралізуються, подовжуються та їх вже не видно. Нитки веретена руйнуються. У кожного полюса навколо хромосом утворюється ядерна оболонка, з'являється ядерце, **2n2c**.

Цитокінез – це поділ цитоплазми між двома дочірніми клітинами. Набір генетичного матеріалу в кожній клітині – **2n2c**. Поділ цитоплазми у клітинах тварин відбувається шляхом вгинання мембрани від периферії до центру. У рослинних клітинах поділ цитоплазми розпочинається з

середини материнської клітини (вгинанню з боків заважає клітинна стінка). Клітинна мембрана утворюється з дрібних пухирців ендоплазматичної сітки, а потім кожна клітина будує свою клітинну стінку. **Значення мітозу:**

1) **Генетична стабільність**. В результаті мітозу утворюються дві дочірні клітини, які містять стільки ж хромосом, скільки їх було в батьківській клітині.

2) **Ріст**. У результаті мітозів кількість клітин в організмі збільшується.

3) **Лежить в основі безстатевого розмноження, регенерації та заміщення клітин.**

Амітоз або прямий поділ клітин відбувається шляхом поділу ядра перетяжкою без утворення веретена поділу. Амітоз характерний для одноклітинних організмів, а також для клітин із зниженою мітотичною активністю (клітини, що старіють або патологічні). **Ендомітоз** – збільшення кількості хромосом. Виникає в результаті того, що після поділу хромосом, поділ ядра не відбувається. Так утворюються поліплоїдні ядра. При ендомітозі клітини продовжують свою життєдіяльність. **Політенія** – збільшення кількості хромосом. Утворюються гігантські хромосоми (виявлені у слинних залозах личинок двокрилих). У складних багатоклітинних організмах рослин і тварин клітини окремих органів і тканин характеризуються різною **мітотичною активністю**. Дослідження клітинного поділу засобами радіоавтографії дало можливість розділити всі тканини на три категорії клітинних комплексів:

- **стабільні** – практично не діляться (нервові тканини);
- **що ростуть** – частина клітин здатна до мітозу (м'язи);
- **що оновлюються** – всі клітини діляться. Кількість знов утворених клітин дорівнює кількості відмерлих (епітелій шкіри).

Мітотична активність залежить від виду тканини та її функції, віку та стадії розвитку організму.

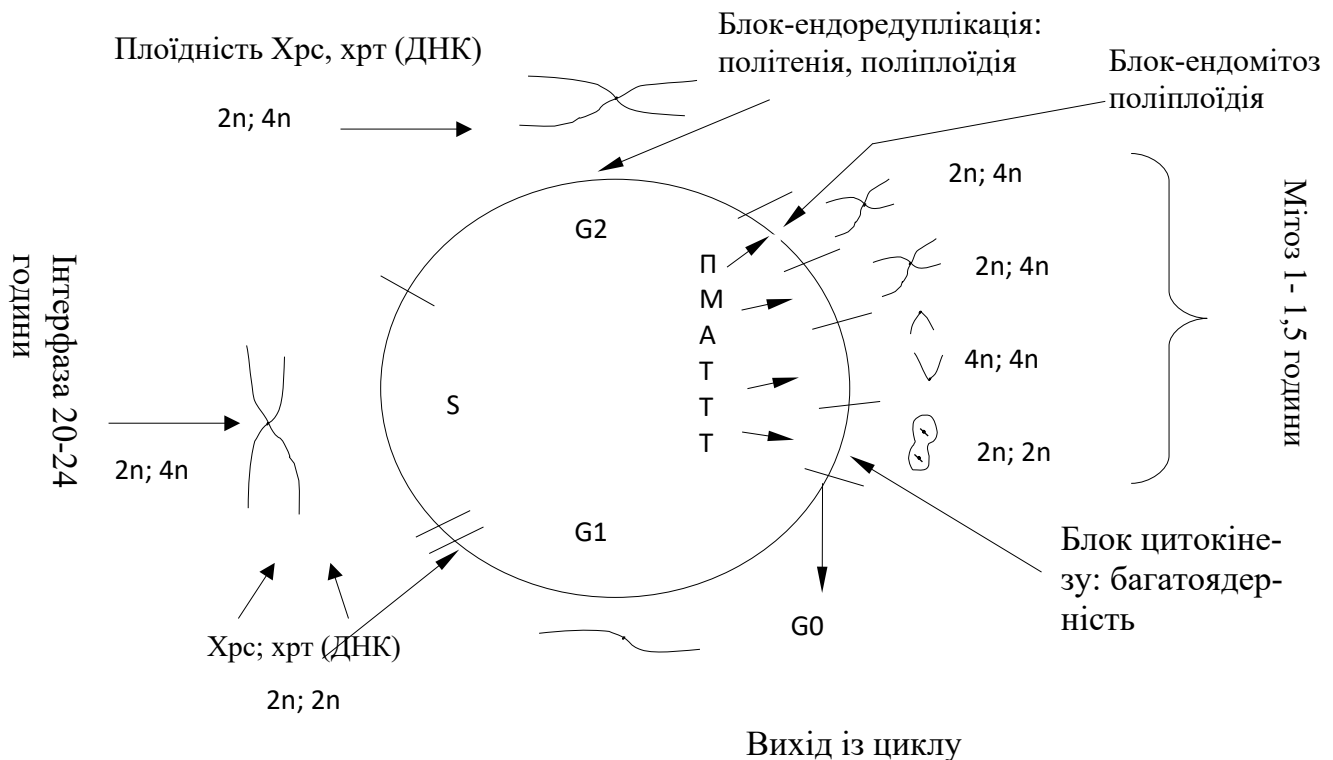
Порушення мітозу призводять до утворення клітин з різними каріотипами. Порушення будови веретена поділу призводить до некротного збільшення або зменшення числа хромосом у соматичних клітинах. Це викликає різні захворювання.

Навчальні завдання:

Завдання 1. Схема мітотичного циклу.

Використовуючи малюнки таблиці, кодограм, описів фаз мітозу в підручнику і практикумі, складіть схему мітотичного циклу, подібну до приведеної в методичних рекомендаціях.

У мітотичному циклі відбувається характерна динаміка хромосом. У G_0 вони складаються з однієї хроматиди (однієї молекули ДНК), у S-періоді вони подвоюються і складаються вже з двох хроматид (2-х молекул ДНК). У такому стані вони існують до анафази, коли дочірні хроматиди стають самостійними. Після анафази будова хромосом повертається до вихідного стану – вони складаються з однієї хроматиди. З будовою хромосом пов'язана і їх плоїдність. У G_1 періоді плоїдність хромосом і ДНК співпадають по $2n$, тому що хромосома – це одна молекула ДНК. У S-періоді кількість молекул ДНК подвоюється, але вони утримуються разом в одній хромосомі. Тому плоїдність хромосом залишається $2n$, а плоїдність молекул ДНК – $4n$. Такий стан плоїдності зберігається до анафази. Після поділу хроматид (молекул ДНК) плоїдність у клітині стає для хромосом $4n$, як і для молекул ДНК – $4n$. Після цитокінезу, у телофазі, що роз'єднує 2 набори молекул ДНК на полюсах, плоїдність хромосом і ДНК повертається до вихідної: $2n$ хромосом, $2n$ ДНК у кожній дочірній клітині.



Примітка: Хрс – хромосома; хрт (молекула ДНК) – хроматида.

У ході звичайного мітозу можуть бути модифікації: одна з них – вихід клітин із мітотичного циклу в G періоді, ця стадія клітини позначається G_0 . Менша частина клітин у G_0 періоді залишається стовбуровими клітинами, більша частина клітин вступає у фазу диференціювання. Модифікація мітозу також може йти по типу блоку однієї з його стадій: 1) блок каріокінезу в G_2 -періоді до мітотичної конденсації хромосом – називається **ендоредуплікацією**, що призводить до політенії (у двокрилих) або до поліплоїдії; 2) блок каріокінезу в профазі після мітотичної конденсації хромосом називається **ендомітозом** і призводить до поліплоїдії; 3) блок цитокінезу в телофазі призводить до **багаторядності**. Політенія, поліплоїдія та багаторядність мають місце при нормальному гістогенезі тканин.

Завдання 2. Вивчіть клітинний цикл, користуючись таблицею. Запишіть визначення клітинного циклу та головні процеси, що відбуваються у клітині:

Життєвий цикл – _____

Клітинний цикл – _____

Інтерфаза – _____

пресинтетичний, G_1 _____

синтетичний, S _____

постсинтетичний, G_2 _____

Завдання 3. Охарактеризуйте способи поділу клітин:

<i>Спосіб поділу</i>	<i>Характеристика</i>
Мітоз	
Амітоз	
Ендомітоз	
Політенія	
Мейоз	

Завдання 4. Розгляньте на фіксованих препаратах та схемах клітини в період інтерфази, профазі, анафазі та телофазі мітозу і зобразіть ці етапи на рисунку.

Фаза	Рисунок	Короткий опис
Інтерфаз		

а		
Мітоз		
Профаза		
Метафаза		
Анафаза		
Телофаза		

Завдання 5. Мітоз у клітинах корінця цибулі.

При малому збільшенні мікроскопа можна розрізнити в корінці 3 зони: 1) кінцеву частину – чохлик, 2) зона поділу – меристема, 3) зона росту або розтягу. Ділення клітин відбувається тільки в другій зоні. При великому збільшенні мікроскопу в ній можна знайти інтерфазні клітини (які не діляться) і клітини на всіх стадіях мітозу. **Визначте також ці стадії на малюнку.** В інтерфазі клітини прямокутні, ядро овальне, з 1-2 ядерцями та дрібними глібками хроматину. У профазі помітні тонкі нитки конденсованого хроматину, зібраного в клубки. В метафазі хромосоми тісно концентруються на екваторі (екваторіальна пластинка). В анафазі йде розходження хроматид до полюсів, хромосоми у вигляді шпильок. В телофазі хромосоми, що відійшли, формують полярні шапки, починається цитокінез утворенням двох дочірніх клітин.

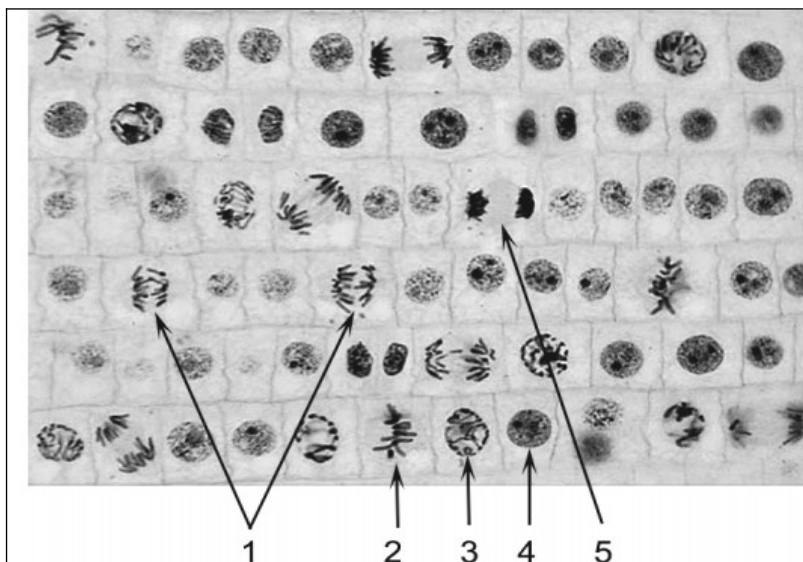


Рис. 1. Мітоз і цитокінез у клітинах конуса наростання кореня цибулі:

- 1 - _____
 2 - _____
 3 - _____
 4 - _____
 5 - _____

Завдання 6. Регуляція клітинного циклу. Вивчіть, яким чином відбувається регуляція клітинного циклу. Дайте визначення *контрольних точок клітинного циклу* та *факторів росту*.

1. Контрольні точки клітинного циклу.

Контрольні точки клітинного циклу – _____

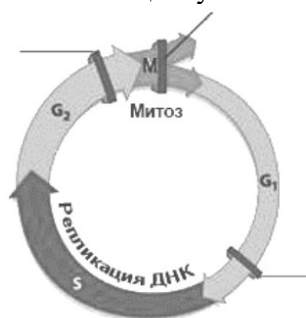
Наявність контрольних точок в клітинному циклі є необхідною для визначення завершення кожної його фази.

Клітинний цикл контролюється шляхом взаємодії *трьох типів регуляторних білків*:

1. циклінзалежні кінрази (*Cdk*);
2. цикліни — цитоплазматичні білки, що взаємодіють з *Cdk* із утворенням комплексів;
3. інгібітори комплексів *Cdk*-циклін.

Регуляція клітинного циклу здійснюється за допомогою оборотного фосфорилювання / дефосфорилювання регуляторних білків.

Існує три контрольні точки регуляції клітинного циклу. Позначте їх на схемі.



Контрольні точки клітинного циклу

Контрольна точка	Період, що контролюється	Що відбувається
G1 контрольна точка, Старт	Завершення G1 фази, G1/S перехід	Запобігає подвоєнню пошкодженої ДНК. За умов, не відповідних для реплікації (напр., пошкоджена ДНК), клітина не вступає у фазу S, а замість цього вступає у фазу G0.
G2 контрольна точка	Закінчення G2/M переходу	Перевірка завершення реплікації. Не дозволяє вступити пошкодженій клітині у мітоз. При пошкодженні ДНК, поділ клітини буде припинено до закінчення репарації ДНК.
M контрольна	Перехід від	Якщо хромосоми вишукані по екватору клітини і,

точка, контрольна точка збирання веретена поділу	метафази до анафази мітозу	відповідно, готові до поділу, клітина переходить від метафази до анафази, під час якої відбувається поділ генетичного матеріалу. Щоб уникнути неправильного розподілу хромосом, клітини затримуються в метафазі до тих пір, поки всі кінетохори не будуть прикріплені до мікротрубочок
--	----------------------------	---

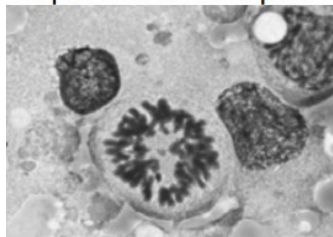
2. Фактори росту клітин

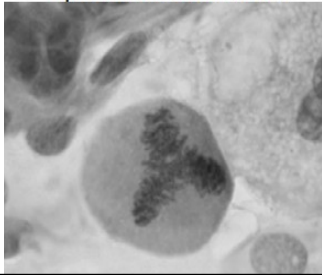
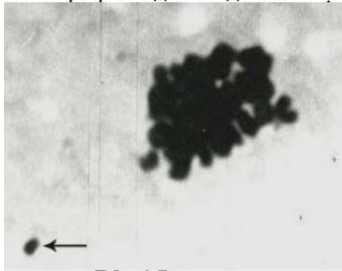
Фактори росту - _____

№	Фактори росту	Вплив на клітинний цикл	Приклади
1	Інсуліноподібні фактори росту		
2	Бомбезіни		
3	Фактори росту фібробластів		
4	Тромбоцитарні фактори росту		
5	Епідермальні фактори росту		
6	Трансформуючі фактори росту		
7	Цитокіни		

Клінічне значення

1. У процесі трансформації нормальної клітини у пухлинну вона втрачає здатність відповідати на сигнали, що регулюють клітинний цикл.
2. Основний спосіб онкотерапії — пригнічення клітинного поділу. Нормальні клітини людини поділяються повільніше за пухлинні, тому хіміотерапевтичні препарати, що перешкоджають розмноженню клітин, впливають на пухлину набагато сильніше, ніж на прилеглі тканини.
3. В онкотерапії використовуються лікарські речовини, що отримують з барвінку (вид *Vinca rosea*) — т.з. *Vinca* алкалоїди (вінбластін, вінкрестин і віндезін). Вони порушують збирання мікротрубочок веретена поділу, клітина не може пройти контрольну точку **M**, і поділ блокується у метафазі мітозу.
4. Речовини, які блокують синтез пуринів і піримідинів, зупиняють клітинний цикл на S- стадії.

Захворювання	Морфологічний прояв
Рак лімфатичної тканини (лімфома)	Порожниста метафаза 

Рак шкіри (плоскоклітинна карцинома)	Трьохполюсний мітоз 
Вірусна інфекція	Відставання однієї хромосоми при розходженні до полюсів 

Завдання 7. Закінчить визначення та наведіть приклади. Вивчіть розбіжності некрозу й апоптозу

1. Загибель клітин і тканин у живому організмі під впливом патогенних факторів екзо- або ендогенного походження називається

Приклади: _____

2. Запрограмована клітинна смерть, процес самоліквідації на клітинному рівні, що регулюється, називається

Приклади: _____

Порівняльна характеристика некрозу й апоптозу

Ознака	Апоптоз	Некроз
Розповсюдженість	Окрема клітина	Група клітин
Індукція	Активується фізіологічними або патологічними стимулами	Різна залежно від пошкоджуючого фактору
Біохімічні зміни	Енергозалежна фрагментація ДНК ендогенними ендонуклеазами. Лізосоми не пошкоджені	Порушення або припинення іонного обміну. З лізосом вивільняються ферменти
Розпад ДНК	Внутрішньоядерна конденсація з розщепленням на фрагменти	Дифузна локалізація у некротизованій клітині
Цілісність клітинної мембрани	Збережена	Порушена
Морфологія	Зморщування клітин і фрагментація	Набрякання та лізис клітин
Запальна відповідь	Немає	Зазвичай є
Видалення загиблих	Поглинання (фагоцитоз)	Поглинання (фагоцитоз)

клітин	сусідніми клітинами	нейтрофілами макрофагами	й
--------	---------------------	-----------------------------	---

Питання для самоконтролю:

1. Назвіть особливості структури інтерфазного ядра.
2. Чи відрізняється поняття клітинний та життєвий цикл?
3. Вкажіть біологічне значення мітозу.
4. Охарактеризуйте фази мітозу.
5. Як здійснюється регулювання клітинного циклу?
6. Назвіть контрольні точки клітинного циклу і залучені компоненти.
7. Дайте визначення поняття проліферація та диференціювання клітин.

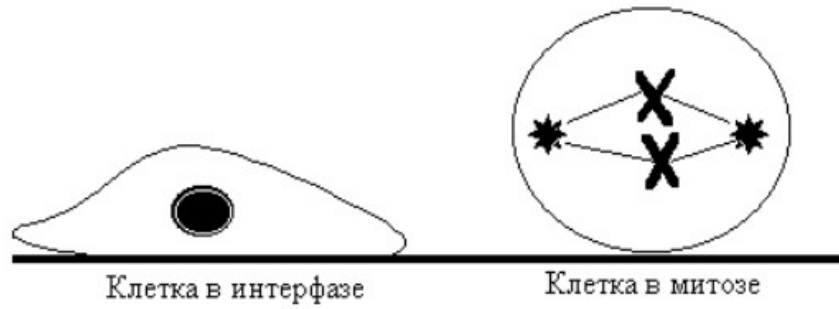
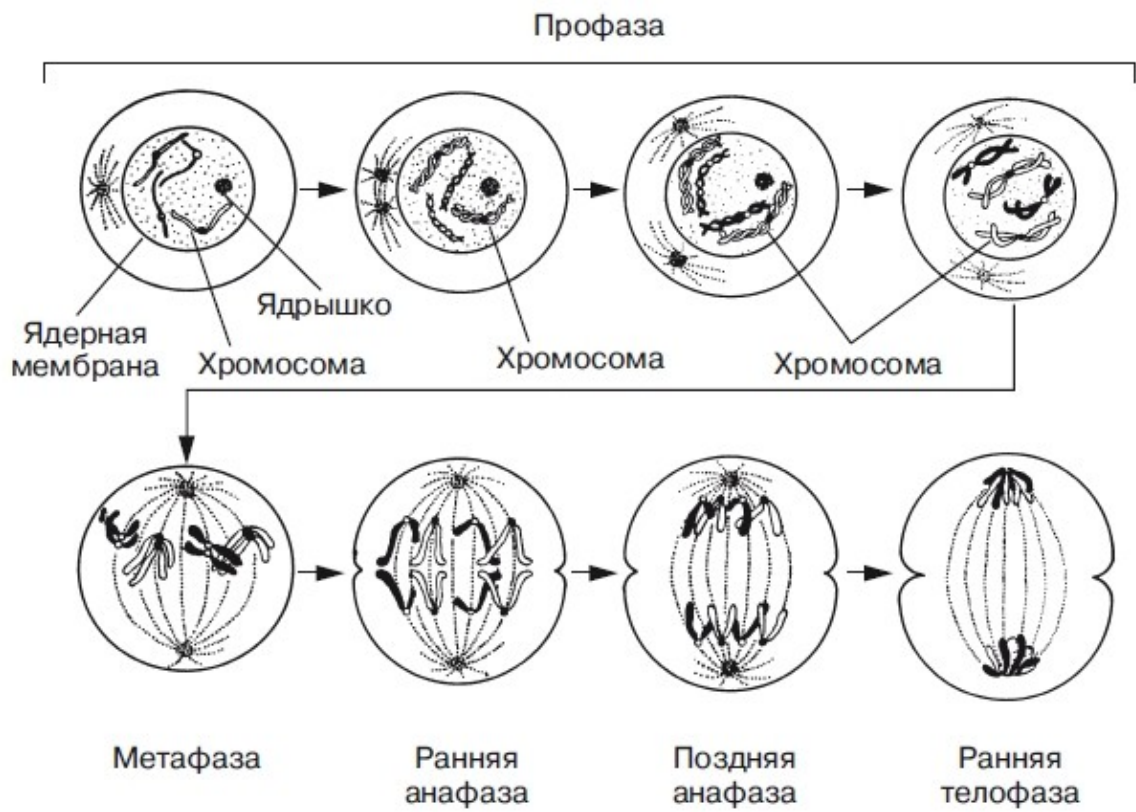


Рис. 13.6. Конфигурация клеток на разных этапах клеточного цикла



Стадії мітозу