

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**Национальный исследовательский
Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского**

Е.Б. Романова

ЦИТОЛОГИЯ

Учебное пособие

Рекомендовано методической комиссией Института биологии и биомедицины для студентов, обучающихся по направлениям: 06.03.01 «Биология», 05.03.06 «Экология и природопользование»; специальностям: 30.05.01 «Медицинская биохимия», 30.05.02 «Медицинская биофизика», 30.05.03 «Медицинская кибернетика», 31.05.03 «Стоматология», 31.05.01 «Лечебное дело»

Нижний Новгород
2019

УДК 576.3

ББК Е 05

Р-69

Р-69 Романова Е.Б. ЦИТОЛОГИЯ: Учебное пособие / Е.Б. Романова – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет. – 2019. –115с.

Рецензент: д.п.н., профессор **И.М. Швец**

Учебное пособие к практическим занятиям по дисциплине «Цитология» предназначено для студентов 2 курса Института биологии и биомедицины ННГУ им. Н.И. Лобачевского, обучающихся по направлениям: 06.03.01 «Биология», 05.03.06 «Экология и природопользование»; специальностям: 30.05.01 «Медицинская биохимия», 30.05.02 «Медицинская биофизика», 30.05.03 «Медицинская кибернетика», 31.05.03 «Стоматология», 31.05.01 «Лечебное дело».

Пособие состоит из четырех разделов, включающих 11 практических занятий, снабженных теоретической частью, описанием клеточных, структур, внутриклеточных процессов и микропрепаратов. В конце каждого занятия содержатся контрольные вопросы, направленные на формирование у студентов понимания особенностей строения разных типов клеток, как сложных систем. Четвертый раздел включает перечень экзаменационных вопросов, тестовые задания, выполнение и проработка которых позволит повысить уровень самостоятельной подготовки студентов при освоении дисциплины «Цитология».

Ответственный за выпуск:
председатель методической комиссии ИББМ ННГУ к.б.н. **Е.Л. Воденеева**

УДК 576.3

ББК Е 05

© Нижегородский государственный
университет им. Н. И. Лобачевского, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Раздел 1. ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ И ПРИЕМЫ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ	8
ЗАНЯТИЕ № 1. Тема: Устройство и принцип работы светового микроскопа	8
ЗАНЯТИЕ № 2. Тема: Установка освещения в микроскопе по принципу Кёлера	19
ЗАНЯТИЕ № 3. Тема: Измерение объектов под микроскопом	22
Раздел 2. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТКИ	24
ЗАНЯТИЕ № 4. Тема: Строение и функции цитоплазматической мембраны и субмембранной опорно-сократимой системы	24
ЗАНЯТИЕ № 5. Тема: Особенности строения и функции вакуолярной системы	36
ЗАНЯТИЕ № 6. Тема: Строение и функции энергообразующих органоидов	47
ЗАНЯТИЕ № 7. Тема: Строение и функции клеточного центра (центросомы)	58
ЗАНЯТИЕ № 8. Тема: Ультраструктура ядра	64
ЗАНЯТИЕ № 9. Тема: Организация генетического материала политенных хромосом в ядрах Бальбиани	70
Раздел 3. ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ КЛЕТКИ	74
ЗАНЯТИЕ № 10. Тема: Митоз (непрямое деление) эукариотических клеток	75
ЗАНЯТИЕ № 11. Тема: Включения в цитозоле эукариотических клеток	85
Раздел 4. ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ	103
4.1. ТЕМЫ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ СТУДЕНТОВ	103
4.2. ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ ПОДГОТОВКИ	106
4.3. ПРИМЕРНЫЙ ПЕРЕЧЕНЬ ВОПРОСОВ К ЭКЗАМЕНУ ПО ДИСЦИПЛИНЕ «ОБЩАЯ ЦИТОЛОГИЯ»	109
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	112
УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ И ИНФОРМАЦИОННОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ «ЦИТОЛОГИЯ»	113

ВВЕДЕНИЕ

Клетка – это ограниченная активной мембраной, упорядоченная структурированная система биополимеров (белков, нуклеиновых кислот) и их макромолекулярных комплексов, участвующих в единой совокупности метаболических и энергетических процессов, осуществляющих поддержание и воспроизведение всей системы в целом.

Цитология (от греч. *kytos* – ячейка, клетка) – наука о клетке. Из среды других биологических наук она выделилась почти сто лет назад.

Творцом первоначального понятия и названия «клетка» был английский исследователь Роберт Гук (1635-1703). В 1665г. Р.Гук первым наблюдал с помощью увеличительных линз подразделение тканей пробки на «ячейки» или «клетки». В его основном труде «*Mierographia*» клетка описана как оболочка, окружающая «ямку». Описания Р. Гука послужили толчком для появления систематических исследований анатомии растений (Мальпиги, 1671; Грю, 1671), которые подтвердили наблюдения исследователя и показали, что разнообразные части растений состоят из тесно расположенных «ячеек» или «мешочков». Позднее А. Левенгук (1680) открыл мир одноклеточных организмов и впервые увидел клетки животных (эритроциты). Позднее клетки животных были описаны Ф. Фонтана (1781); но эти и другие многочисленные исследования не привели в то время к пониманию универсальности клеточного строения.

Длительное и пристальное изучение растительных и животных клеток привело к созданию клеточной теории, имеющей огромное общеприкладное значение.

Клеточная теория – это обобщенные представления о строении клеток как единиц живого, об их размножении и роли в формировании многоклеточных организмов.

Появлению и формулированию отдельных положений клеточной теории предшествовал довольно длительный (более трехсот лет) период накопления наблюдений над строением различных одноклеточных и многоклеточных организмов растений и животных. Этот период был связан с развитием применения и усовершенствования различных оптических методов исследований. Прогресс в изучении клетки связан с развитием микроскопирования в XIXв. К этому времени изменились представления о строении клеток: главным в организации клетки стало считаться ее содержимое – протоплазма (Пуркинье, 1830). В протоплазме был открыт постоянный компонент клетки – ядро (Браун, 1833). Теодор Шванн был первым ученым, который пришел к выводу и установил, что клетка является микроскопическим элементом, из которого состоят все животные ткани. Чтобы убедиться в том, что все живые организмы состоят из клеток, Шванн пригласил к сотрудничеству своего друга немецкого ботаника Матиаса Шлейдена. Ученые чрезвычайно долго с помощью микроскопа проверяли правильность своих предположений. Когда все сомнения были устранены, Шванн в 1839 г. опубликовал труд «Микроскопические исследования о соответствии в структуре и росте

животных и растений». Так была разработана одна из самых важных биологических теорий, получившая название клеточной теории. «Заслуга Теодора Шванна заключалась не в том, что он открыл клетки как таковые, а в том, что он научил исследователей понимать их значение» (Вальдейер, 1909). Дальнейшее развитие клеточная теория получила в работах Рудольфа Вирхова (1821-1902). Свои убеждения Вирхов (1858) высказал в виде следующей истины: «*Omnis cellula e cellula* - всякая клетка происходит всегда от другой клетки». Впервые обобщенные сведения о строении клеток были собраны в книге Ж.-Б. Карнау «Биология клетки», вышедшей в 1884 г.

Современная цитология – это физиология клетки. За последние 50 лет цитология из описательно-морфологической превратилась в экспериментальную науку, ставящую перед собой задачи изучения физиологии клетки, ее основных жизненных функций и свойств, ее биологии. В цитологии плодотворно сочетаются как морфологические, так и молекулярно-биологические подходы, предметом изучения является клетка, имеющая свои собственные закономерности организации и функционирования.

Основные положения клеточной теории сохранили свое значение и на сегодняшний день, хотя более чем за сто пятьдесят лет были получены новые сведения о структуре, жизнедеятельности и развитии клеток. В настоящее время клеточная теория постулирует:

1. Клетка – элементарная единица живого.
2. Клетка – единая система, состоящая из множества закономерно связанных друг с другом элементов, представляющих собой определенное целостное образование, состоящее из сопряженных функциональных единиц – органелл или органоидов.
3. Клетки сходны – гомологичны – по строению и по основным свойствам.
4. Клетки увеличиваются в числе путем деления исходной клетки, которому предшествует воспроизведение ее генетического материала (редупликация ДНК).
5. Многоклеточный организм представляет собой новую систему, сложный ансамбль из множества клеток, объединенных и интегрированных в системы тканей и органов, связанных друг с другом с помощью химических факторов, гуморальных и нервных (молекулярная регуляция).
6. Клетки многоклеточных организмов тотипотентны, т.е. обладают генетическими потенциями всех клеток данного организма, равнозначны по генетической информации, но отличаются друг от друга разной экспрессией (работой) различных генов, что приводит к их морфологическому и функциональному разнообразию – к дифференцировке.

Создание клеточной теории стало важнейшим событием в биологии, одним из решающих доказательств единства всей живой природы.

Настоящее учебное пособие к практическим занятиям по дисциплине «Цитология» предназначено для студентов 2 курса биологического факультета, обучающихся по направлениям: 06.03.01 «Биология», 05.03.06 «Экология и

природопользование»; специальностям: 30.05.01 «Медицинская биохимия», 30.05.02 «Медицинская биофизика», 30.05.03 «Медицинская кибернетика», 31.05.03 «Стоматология», 31.05.01 «Лечебное дело».

Целью издания является ознакомление студентов с основными принципами современных методов исследования, структурно-функциональными особенностями клеток, а также восполнение отсутствия полноценного учебника и учебно-методической документации по дисциплине «Общая цитология».

Самостоятельная работа студентов при освоении дисциплины «Общая цитология» должна быть сосредоточена на изучении основных закономерностях организации и функционирования клеток. Учебное пособие состоит из четырех разделов, включающих 11 практических занятий, на которых студенты используют наиболее доступный и наглядный учебный материал: готовые микропрепараты и электронные микрофотографии. Каждая тема снабжена теоретической частью, описанием клеточных структур, внутриклеточных процессов и микропрепаратов. К занятию прилагаются контрольные вопросы и задания, выполнение которых позволит повысить уровень подготовки студентов при освоении дисциплины.

На практическом занятии студенты рассматривают под микроскопом или проводят детальное рассмотрение органоидов клетки на субмикроскопическом уровне (с помощью электронно-микроскопических фотографий, собранных в отдельном учебном пособии – Альбоме электронных фотографий), с целью лучшего усвоения, понимания и закрепления в памяти строения и взаимного положения в клетке органоидов и отдельных клеточных структур. После этого студенты делают зарисовки структуры, видимые под микроскопом, и перерисовки с определенного участка электронной микрофотографии в своем Рабочем альбоме.

Зарисовка препаратов на практических занятиях по дисциплине «Цитология» не самоцель, а метод изучения объекта, поэтому следует придерживаться ряда правил:

1. Перед началом просмотра препарата под микроскопом в Рабочем альбоме должны быть записаны тема, цель и задачи для каждого занятия.

2. Рисунки должны быть большими, чтобы хорошо различались детали. На одной странице формата А4 размещается не более двух-трех рисунков, если объекты просты в выполнении, и только один рисунок, если объект сложный и крупный.

3. Основное требование к рисунку – правильное отображение формы, соотношения объема и размеров.

4. Вокруг рисунка недопустимы контуры поля зрения микроскопа.

5. К отдельным частям рисунка должны быть сделаны обозначения.

6. После выполнения занятия студент формулирует в рабочем альбоме вывод (итог занятия), отражающей достижения поставленной перед началом цели.

7. Рисунки, не отвечающие требованиям преподавателя, необходимо переделать.

Рабочий альбом сдается преподавателю для проверки и является документом, подтверждающим выполнение всех практических занятий, предусмотренных учебным планом. Обязательным условием допуска студента к итоговому контролю качества знаний (экзамену) является удовлетворительное ведение Рабочего альбома в течение семестра и его наличие во время проведения экзамена. Студенты делают зарисовки структуры, видимые под микроскопом, и перерисовки с определенного участка электронной микрофотографии в своем рабочем альбоме. Рабочий альбом сдается преподавателю для проверки.

Учебное пособие не заменяет материала лекций и учебника, его можно рассматривать, как один из вариантов систематизации современных основ цитологических знаний для облегчения усвоения материала и оптимизации учебного процесса.

Автор

Раздел 1. ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ И ПРИЕМЫ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ЗАНЯТИЕ № I

ТЕМА: Устройство и принцип работы светового микроскопа

Цель: 1. Ознакомиться с устройством, принципом работы и основными техническими характеристиками светового микроскопа.
2. Приобрести навыки работы со световым микроскопом.

Задачи:

1. Усвоить правила обращения с микроскопом.
2. Изучить механическую и оптическую части микроскопа.
3. Усвоить правила работы с микроскопом.

Материалы и оборудование

Микроскопы Meiji Techno серии MT 4000, руководство пользователя.

Теоретическая часть

Световая микроскопия, это основной метод исследования клеток и тканей, осуществляемый с помощью световых микроскопов разных конструкций, в которых для освещения объекта используются лучи видимого спектра.

Биологический микроскоп – главный прибор биологии, предназначенный для изучения микроскопических биологических объектов и для видеомикроскопии высокого разрешения. Микроскоп представляет собой оптическую систему, состоящую из конденсора, объектива и окуляра, строго центрированную и закреплённую на механической части (станине со штативом). Пучок света от источника освещения собирается в конденсоре и направляется на объект. Пройдя через объект, лучи света попадают в систему линз объектива; где строится первичное изображение. С помощью линз окуляров изображение увеличивается.

Объекты исследования световой микроскопии – препараты, которые можно рассматривать в проходящем свете.

Рассмотрим основные компоненты микроскопа (*рис. 1*).

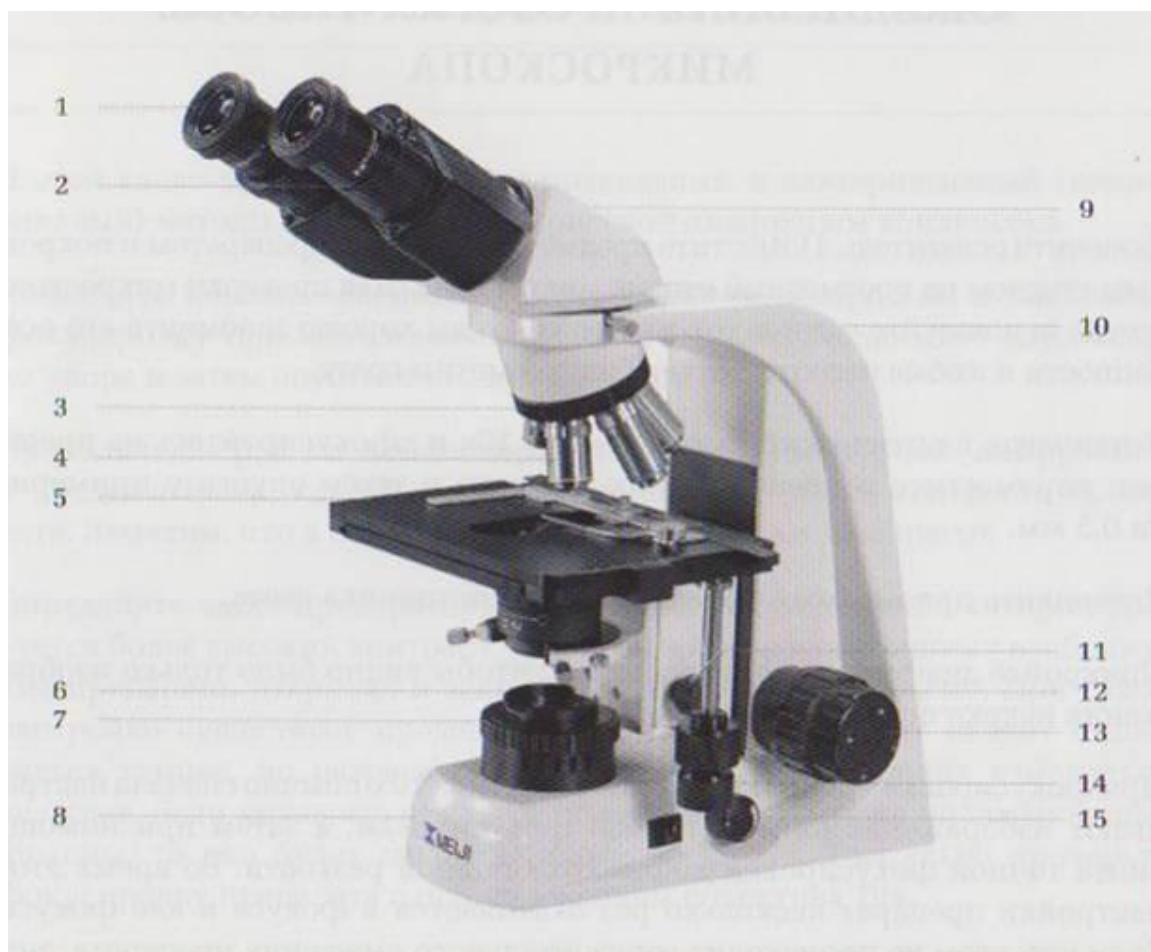


Рис. 1. Основные части биологического микроскопа:

1 – окуляр; 2 – диоптрийное устройство; 3 – револьвер; 4 – объективы; 5 – предметный столик; 6 – осветитель; 7 – полевая диафрагма осветителя; 8 – станина микроскопа; 9 – бинокулярная насадка; 10 – штатив микроскопа; 11 – регулятор перемещения конденсора; 12 – винт грубой фокусировки; 13 – винт точной фокусировки; 14 – коаксиальные рукоятки перемещения столика; 15 – регулятор яркости; 16 – конденсор; 17 – центровочные винты конденсора; 18 – апертурная диафрагма конденсора; 19 – держатель светофильтров

Основная часть микроскопа – его оптический узел. Он состоит из осветительной системы (конденсора и осветителя), объективов, расположенных в револьвере тубуса, и окуляров. Все части оптического узла строго центрированы.

Осветитель. Находится в основании микроскопа и имеет коллекторную линзу, которая направляет свет на конденсор. В осветителе находится ирисовая *полевая диафрагма*, она служит для настройки размера освещенного поля и регулирует контраст изображения. Лампа снабжена трансформатором, имеет регулятор яркости для ограничения освещенности. После окончания работы с микроскопом регулятор яркости следует перевести в положение «ноль».

Конденсор. Это многолинзовое устройство предназначено для сбора и направления световых лучей от источника света на препарат. Конденсор имеет ирисовую *апертурную диафрагму*, которую открывают в соответствии с числовой апертурой рабочего объектива. Она предназначена для настройки контраста препарата. Конденсор перемещают вверх или вниз, с помощью регулятора высоты конденсора, обеспечивая его фокусировку. Отметим, что высота перемещения конденсора изменяется в небольшом диапазоне (не более 1 мм). Если конденсор опущен слишком низко, снижается разрешение микроскопа, детали препарата становятся размытыми, а края смазанными. Это объясняется тем, что при опускании конденсора плоскость, на которую фокусируется свет, оказывается ниже, свет рассеивается сильнее, проходя через препарат под разными углами, что затеняет края поля зрения. Правильное положение конденсора – 0,5 мм ниже максимально возможного верхнего положения.

К конденсору прикреплен выдвижной держатель светофильтра. Светофильтры подразделяются на цветные, белые, матовые и прозрачные. В зависимости от типа лампы накаливания используют разные светофильтры. Для повышения контрастности исследуемого препарата также применяют светофильтры дополнительного цвета к окраске изучаемой структуры, которая вследствие этого выглядит черной. Например, для красных структур используют зеленый фильтр, для синих – желтый. При работе с малыми увеличениями можно применять матовые светофильтры.

Отметим, что любой дополнительный элемент в оптическом ходе лучей поглощает свет, поэтому светофильтры используют только тогда, когда в них есть насущная необходимость.

Конденсор снабжен двумя центровочными винтами («ласточкин хвост»), позволяющими выводить изображение при настройке света в центр поля зрения. Центровочные винты следует поворачивать очень медленно и осторожно, они крайне чувствительны к вращению. Рядом с центровочными винтами имеет винт фиксации конденсора в микроскопе.

Объективы. Объектив – многолинзовая система, главная составная часть оптического узла микроскопа, определяющая его основные возможности.

Объектив строит первичное, геометрически подобное объекту изображение, которое увеличивается с помощью линз окуляров. Объектив «разрешает» структуру, т.е. выявляет подробности, недоступные глазу человека. Основные параметры объективов устанавливаются общепризнанным мировым стандартом DIN (Deutsche Industrial Norman). Этот стандарт определяет длину тубуса (160 мм), высоту объектива (45мм), кодировку в виде цветной полоски вокруг объектива (желтая – х10; зеленая – х20; синяя – х40; белая – х100). Тубус – это расстояние от верхней линзы окуляра до плоскости зрачка объектива. Объективы расположены в револьвере, тубуса. Револьвер поворачивают как по часовой стрелке, так и в противоположном направлении.

Каждый объектив имеет следующие характеристики:

1. Кривизну или плоскостность поля зрения.
2. Увеличение и разрешающую способность.
3. Цветокоррекцию.

Кривизна объектива – это часть поля зрения, находящаяся в фокусе. По этой характеристике объективы делятся на ахроматические, при использовании которых в фокусе оказывается 2/3 поля зрения. Полупланообъективы – 80% поля зрения в фокусе. Планообъективы – 100% поля зрения в фокусе.

Увеличение – указано на оправе объектива. Объективы малого увеличения (х8 и х10) имеют максимальное рабочее расстояние и большое поле зрения, поэтому исследование препарата начинают с небольшого увеличения объектива. Объективы большого увеличения (х20; х40; х100) имеют меньшее фокусное расстояние.

Разрешающая способность объектива – способность давать раздельное изображение двух соседних элементов препарата или величина наименьшего диаметра видимых частиц или это наименьшее расстояние между двумя элементами препарата.

Разрешающая способность (α) зависит от числовой апертуры объектива (NA) и длины волны света, применяемого для освещения объекта (λ) и определяется по формуле:

$$\alpha = \frac{\lambda}{NA} \quad (1)$$

При боковом освещении объекта (эффект Тиндаля: в темной комнате при боковом освещении в луче света видны пылинки), разрешающая способность повышается вдвое:

$$\alpha = \frac{\lambda}{2NA} \quad (2)$$

Числовая или нумерическая апертура (NA) характеризует светособирательную способность объектива и определяется по формуле:

$$NA = n \cdot \sin \beta \quad (3)$$

где n – показатель преломления среды между фронтальной линзой объектива и покровным стеклом,

β – половина апертурного угла конуса лучей, выходящего из точки объекта и ограниченного входящим зрачком объектива. Значение числовой (нумерической) апертуры постоянно для объектива и указано на его оправе.

Поскольку показатель преломления воздуха равен 1,0, то NA у сухих объективов равно значению синуса угла β (например, $\beta = 40^\circ$, $\sin 40^\circ = 0,64$ и $NA = 0,64$). Чем выше значение NA , тем лучше разрешающая способность объектива.

Разрешающая способность объектива зависит также и от длины волны света, употребляемого для освещения объекта. Обычно в световых микроскопах используются источники освещения в видимой части спектра (0,4–0,7 мкм.) При освещении обычным светом ($\lambda=0,55$ мкм) и использовании объектива с апертурой $NA=1,4$ наименьший диаметр видимых частиц составляет 0,88 мкм. Уменьшить длину волны можно с помощью светофильтров сине-фиолетового цвета, коротковолновой части видимого спектра. При освещении через синий светофильтр ($\lambda=0,47$ мкм) можно увидеть частицы величиной 0,33 мкм.

Обычно в световых микроскопах используются источники освещения в видимой области спектра (0,35–0,75 мкм), поэтому максимальное разрешение микроскопа в этом случае может быть не выше 0,2–0,35 мкм. Световой микроскоп, как вспомогательный прибор к нашему глазу, повышает разрешающую способность его примерно в 1500–2000 раз (невооруженный глаз человека имеет разрешающую способность около 0,1 мм, что равно 100 мкм). Следовательно, при использовании видимой области света **0,2 мкм является пределом разрешения светового микроскопа.**

Цветокоррекция. Объективы могут иметь недостатки (абберации). *Хроматическая абберация* вызвана тем, что фиолетовая часть светового спектра преломляется сильнее, чем красная, поэтому изображение, созданное лучами одной длины волны, не совпадает с изображением, созданным лучами с другой длиной волны, в результате изображение получается окрашенным. По цветокоррекции (исправлению хроматической абберации) объективы подразделяются на ахроматические, полуахроматические (флюоритовые) и апохроматические. У ахроматов исправлена хроматическая абберация для двух крайних длин волн (красного и фиолетового цветов), т.е. фокус для этих лучей сводится в одну точку. Во флюоритовых объективах используется специальное

стекло, которое сводит все области спектра ближе к одному фокусу. У апохроматов – исправлена аберрация для трех основных цветов (красный, зеленый, синий), что сводит все остальные области спектра практически к одинаковому фокусу. Эти объективы имеют гораздо лучшее качество изображения.

Объективы подразделяются на «сухие» и иммерсионные.

Иммерсионные объективы имеют более высокую нумерическую апертуру (1,25–1,4), чем сухие, так как показатель преломления жидкостей больше 1,0; вода имеет показатель преломления – 1,33, иммерсионное масло – 1,52. Следует отметить, что показатель преломления иммерсионного масла близок к показателю преломления стекла ($n = 1,52$), поэтому при использовании масла создается гомогенная система, уменьшающая рассеивание лучей и увеличивающая четкость изображения. Иммерсионное масло позволяет увеличить апертуру объектива, что, в свою очередь, повышает разрешающую способность микроскопа. Масляно-иммерсионные объективы имеют буквенные обозначения (МИ, ОМ и др.) и опоясаны темной полоской.

Окуляры. Окуляры обладают увеличением, которое составляет часть общего увеличения микроскопа. Еще одна характеристика окуляра – вынос выходного зрачка: расстояние от последней поверхности окуляра до плоскости изображения, которое появляется в микроскопе (от 15мм до 24мм).

Общее увеличение микроскопа получают, умножая увеличение объектива на увеличение окуляра, с учётом увеличения, даваемого бинокулярной насадкой. Наибольшее полезное увеличение, получаемое в микроскопе, не должно превышать значения произведения ($1000 \times NA$ используемого объектива). Следовательно, при объективе $\times 90$, имеющем числовую апертуру $NA = 1,25$, максимальное полезное увеличение будет не более 1250; разделив эту величину на 90, получают увеличение для окуляра (не более 13). Применение более сильных окуляров ухудшает изображение.

Бинокулярная насадка служит для наблюдения объектов одновременно двумя глазами. Бинокулярная насадка позволяет настроить межзрачковое расстояние, в пределах от 53мм до 75 мм, для установки его по глазам наблюдателя (*рис. 2*). Для настройки разведите или сведите окулярные трубки, чтобы получить ровное поле зрения. Полученное на смотровой головке число соответствует вашему расстоянию между зрачками. Запомните его, чтобы проще проводить настройку в дальнейшем. Кроме того, бинокулярная насадка на левом окуляре снабжена диоптрийным устройством, для наводки на резкость в пределах ± 5 диоптрий (*рис. 3*). Собственное увеличение насадки (без окуляров) $\times 1,5$. При пользовании бинокулярной насадкой и определения общего

увеличения микроскопа необходимо умножить увеличение объектива на увеличение окуляра, а затем на собственное увеличение насадки (x1,5). Если на насадке нет маркировки, то по умолчанию принято, что ее увеличение равно x10.

межзрачковое расстояние

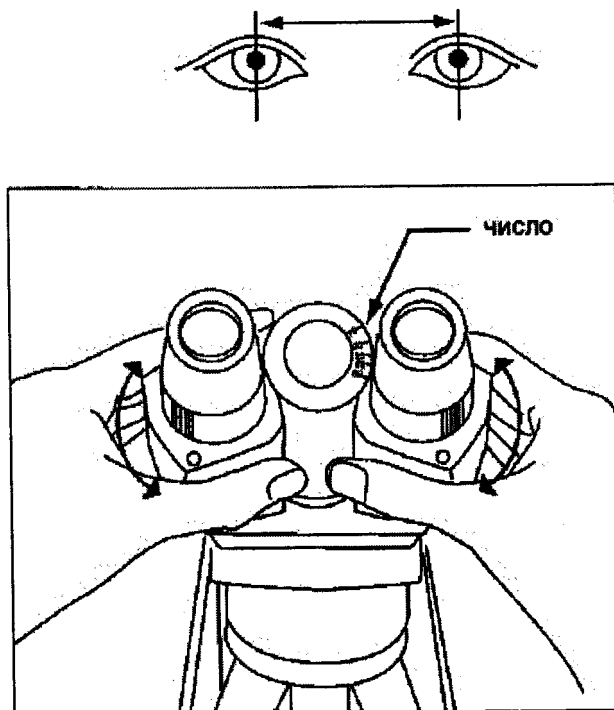


Рис. 2. Настройка межзрачкового расстояния между окулярами бинокулярной насадки по глазам наблюдателя

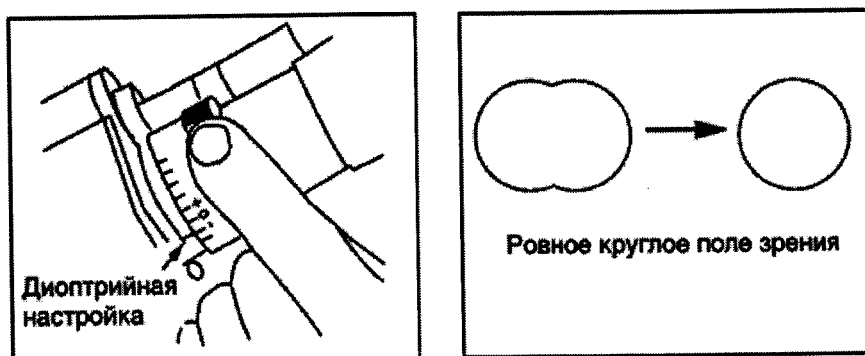


Рис. 3. Диоптрийная настройка на левом окуляре микроскопа

Предметный столик. Представляет собой устройство для установки, закрепления и перемещения препарата в любой участок плоскости поля зрения микроскопа (*рис. 4*). Фокусировка препарата осуществляется при перемещении предметного столика вверх или вниз винтом грубой настройки. Движение препарата в двух взаимно перпендикулярных направлениях (поперечное и продольное) на столике микроскопа обеспечивается специальными винтами, расположенными коаксиально (на одной оси), справа или слева. Предметный столик снабжен *координатными* шкалами, позволяющими в процессе работы устанавливать расположение отдельных деталей препарата.



Рис. 4. Предметный столик микроскопа

Неправильное использование или нарушение инструкции по работе с микроскопом может привести к получению травмы или к повреждению оборудования. Усвоим основные правила обращения с микроскопом.

Правила поведения студента в учебной лаборатории

1. К работе с микроскопом допускаются студенты, одетые в рабочие белые халаты.

2. В учебной лаборатории соблюдать порядок, тишину, внимательно слушать преподавателя, выполняя все его требования. Сотовые телефоны на время занятия следует выключать!
3. Не прикасаться к поверхности оптики! Даже следы дыхания и пальцев могут повредить линзы, фильтры и стекла.
4. Обращаться с микроскопом осторожно, избегать резких толчков, вибрации и ударов!
5. Перемещать микроскоп двумя руками, крепко взяв на штатив, **поднимая его от поверхности и переставляя на нужное место.** С внешней стороны штатива для удобства транспортировки имеется углубление для больших пальцев рук.
6. Сетевой кабель разрешается подсоединять только к заземленной розетке с разрешения преподавателя.
7. При обнаружении, каких либо неполадок в работе с микроскопом сразу же сообщить об этом преподавателю.
8. В течение занятия **в своем рабочем альбоме** студенты делают зарисовки деталей препарата, видимые в микроскоп, и перерисовки с определенного участка электронной микрофотографии Рабочий альбом оформляется в соответствии с требованиями, предъявляемыми к отчету по лабораторной работе, и сдается преподавателю для проверки.
9. Завершая занятие, студент обязан привести в порядок свое рабочее место. В соответствии с инструкцией закончить работу с микроскопом, смыть препарат, сдать выданную на время занятия учебную литературу, получить домашнее задание.

Правила работы с микроскопом

1. Перемещают микроскоп двумя руками, крепко взяв на штатив, **поднимая его от поверхности и переставляя на нужное место.**
2. Устанавливают микроскоп на рабочее место штативом к себе напротив груди.

3. Снимают чехол с микроскопа. **Сразу проверяют положение рукояток микроскопа.** Убеждаются, что регулятор яркости света (рис.1, 8) и тумблер выключения питания (рис.1, 9) находятся в выключенном положении.
4. Полевую диафрагму конденсора и апертурную диафрагму конденсора полностью открывают.
5. Объективы микроскопа используют по возрастанию увеличения (x10; x20; x40; x100). Начинают работу с малого увеличения. Перемещают объективы с помощью револьверного устройства по часовой и против часовой стрелке. При повороте револьвера должен раздаваться щелчок, сигнализирующий о том, что объектив встал на место.
6. При работе с малым увеличением объектива (x10) пользуются винтом грубой настройки, расположенным ближе к штативу микроскопа.
7. При использовании большого увеличения фокусировку препарата проводят винтом точной настройки.
8. При работе с микроскопом важно усвоить два понятия: парфокальность и центрирование. *Парфокальность* – сохранение препарата резким при переходе от одного объектива к другому. При этом винт точной фокусировки препарата поворачивают не более чем на $\frac{1}{4}$ полного оборота.
Центрирование – сохранение детали препарата в центре поля зрения микроскопа при повышении увеличения.
9. Регулятором настройки высоты конденсора поднимают его в максимальное верхнее положение.
10. Подсоединяют кабель питания одним концом к микроскопу, другим к заземленной розетке. Фиксатор оставляют на кабеле.
11. Поместить предметное стекло с препаратом на предметный столик микроскопа, слегка отведя прижимную лапку, в нижний правый угол металлической рамки препаратоводителя.
12. Приподнять винтом грубой фокусировки предметный столик на расстояние 1 см-1,5 см от объектива малого увеличения.
13. Включить тумблер питания. Плавно перевести регулятор яркости света из нулевого положение в начальное.

14. Настроить межзрачковое расстояние, разводя или сводя окулярные трубки, чтобы получить ровное круглое поле зрения.
15. Настроить фокусировку препарата при помощи винта грубой фокусировки. Глядя в окуляр правым глазом, и закрыв левый глаз, при помощи винта точной фокусировки корректируют резкость. Когда препарат будет в фокусе, открыть левый глаз и с помощью диоптрийной настройки на левом окуляре снова настроить фокусировку. Теперь микроскоп настроен для работы с конкретным пользователем.
16. Препарат убирают с предметного столика **только** из-под малого увеличения. Для этого переводят револьвер микроскопа обратно в рабочее положение объектива $\times 10$. Винтом грубой фокусировки опускают предметный столик, слегка отводят прижимную лапку и движением от себя плавно удаляют препарат, не задевая линз микроскопа. Коаксиальными винтами перемещения препарата совмещают грани столика между собой.
17. Полностью открывают апертурную диафрагму конденсора и полевою диафрагму осветителя.
18. Регулятор яркости переводят в положение выключено, выключают тумблер питания микроскопа.
19. Отсоединяют сетевой кабель, аккуратно его сворачивают и скрепляют фиксатором.
20. Закрывают микроскоп чехлом.

Контрольные вопросы

1. Как устроен оптический узел микроскопа?
2. Что представляют собой объективы, и какие функции в микроскопе они выполняют? Какие характеристики имеет объектив?
3. Что такое разрешающая способность объектива, как ее рассчитать, от чего она зависит?
4. Чем отличаются сухие и иммерсионные объективы?

5. Каково назначение окуляров?
6. Как определяется общее увеличение микроскопа?
7. Какие основные характеристики имеет микроскоп?

ЗАНЯТИЕ № 2

ТЕМА: Установка освещения в микроскопе по принципу Кёлера

Цель: Произвести настройку освещения микроскопа по принципу Кёлера, используя приготовленный препарат.

Задачи:

1. Произвести установку освещения микроскопа в соответствии с основными пунктами рациональной настройки.
2. Изучить и зарисовать несколько клеток препаратов животных клеток (печень, сердце, легкие свиньи) при 20-кратном и 40-кратном увеличении объектива.

Материалы и оборудование

Микроскопы Meiji Techno серии МТ 4000, руководство пользователя, луковица, препаровальные иглы, скальпель, предметные и покровные стекла, вода дистиллированная, фильтровальная бумага, марля, пипетки, ножницы.

Этапы настройки освещения по Кёлеру

Принцип настройки освещения по Кёлеру заключается в совпадении апертуры (действующее отверстие) полевой диафрагмы осветителя, апертурной диафрагмы конденсора и апертуры объектива, которые должны быть равны между собой.

Цель настройки рационального освещения микроскопа состоит в том, чтобы добиться такого положения оптики, при котором поток света в виде узкого пучка параллельных лучей идет на объект исследования строго перпендикулярно, не рассеиваясь. При правильной настройке получают оптимальное сочетание контраста и разрешения. Для этого:

1. Включить тумблер питания, установить регулятор яркости света в первоначальное положение, поместить на предметный столик препарат. Установить объектив малого увеличения $\times 10$. Настроить винтом грубой фокусировки резкость на препарат.

2. Поднять конденсор микроскопа в верхнее положение при помощи винта настройки высоты конденсора, находящегося под предметным столиком.



Рис. 5. Настройка освещения по Кёлеру

3. Убедиться, что полевая диафрагма осветителя и апертурная диафрагма конденсора полностью открыты.

4. Закрыть кольцо полевой диафрагмы осветителя так, чтобы в поле зрения остался небольшой светлый круг (*рис. 5*).

5. Перемещением конденсора вверх и вниз добиваются четкого изображения внутреннего края диафрагмы осветителя в поле зрения микроскопа.

6. Поворотом центрирующих винтов конденсора перемещают изображение диафрагмы в центр поля зрения.

9. Открывают диафрагму осветителя так, чтобы изображение края диафрагмы находилось за пределами поля зрения микроскопа.

10. Вынимают правый окуляр и, глядя в тубус микроскопа, закрывают отверстие апертурной диафрагмы конденсора, примерно на 1/3. **Внимание!** Правый окуляр на стол не кладут, держат в руке, не касаясь линз.

11. Помещают окуляр на место. Микроскоп настроен для использования с окуляром x10. Препарат должен оставаться в фокусе при переходе на большее увеличение, поскольку микроскоп парфокален. При необходимости для работы на больших увеличениях операции настройки повторяют для получения оптимального освещения.

Практическая часть

Рассмотреть и зарисовать препараты с настройкой рационального освещения микроскопа по принципу Келера при большом увеличении. На рисунке обозначить: цитоплазму, ядро, ядрышки, включения, митохондрии.

Контрольные вопросы

1. В чем заключается принцип рациональной настройки освещения в световом микроскопе?
2. Перечислите необходимые этапы настройки освещения в микроскопе по принципу Келера.
3. Объясните термины: парфокальность, центрирование, цветокоррекция, кривизна поля, абберация

ЗАНЯТИЕ № 3

ТЕМА: Измерение объектов под микроскопом

Цель: Определить линейные размеры растительных клеток и диаметр ядра.
Освоить основной метод документации препарата.

Задачи:

1. Приготовить препарат луковой чешуйки.
2. Определить цену деления окуляр-микрометра при малом и большом увеличениях объектива.
3. Измерить линейные размеры (длину, ширину) трех клеток на препарате.
Измерить диаметр ядра.

Материалы и объекты

Микроскопы Meiji Techno серии МТ 4000, руководство пользователя, объект-микрометр, окуляр-микрометр, предметные стекла, покровные стекла, вода дистиллированная, скальпель, ножницы, препаровальные иглы, фильтровальная бумага, марля, луковица.

Практическая часть

Окулярная шкала калибруется под каждый объектив с помощью объект микрометра, помещаемого на предметный столик микроскопа вместо препарата. Объект-микрометр – это шкала, нанесенная на стекло, каждое деление которой равно 0,01 мм (10 мкм). В окуляр микроскопа вставляется окуляр-микрометр, который представляет собой округлую стеклянную пластинку с нанесенной шкалой делений. На столик микроскопа помещают объект-микрометр - линейку, и, передвигая объект-микрометр винтами предметного столика, добиваются совпадения одного из штрихов шкалы объект-микрометра со штрихом окуляр-микрометра (*рис. 6*).

После этого определяют, какое число делений объект-микрометра (m) укладывается в число делений окуляр-микрометра (N). Затем по формуле:

$$\frac{m}{N} \cdot 10 \text{ мкм}, \quad (4)$$

определяют цену деления окуляр-микрометра.

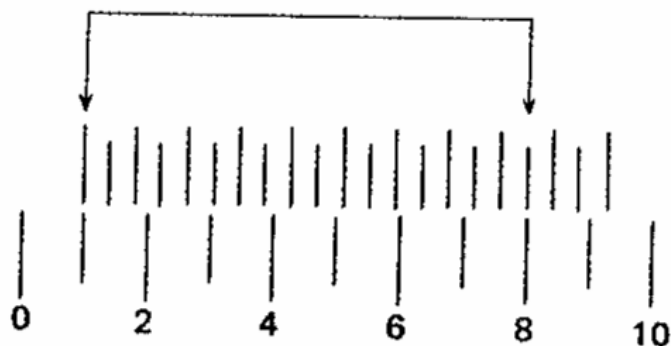


Рис. 6. Совпадение делений окуляр-микрометра и объект-микрометра

Полученные при разных оптических комбинациях данные заносят в таблицу (табл. 3.1).

Таблица 3.1

Цена деления окуляр-микрометра при разных оптических комбинациях

Увеличение объектива	Число делений		Цена деления (мкм)
	Окуляр-микрометра (N)	Объект-микрометра (m)	
x8			
x10			
x20			
x40			

На готовых препаратах проводят измерение длины, и ширины клеток в различных участках препарата. Для этой цели полученную величину объектов в делениях шкалы окуляр-микрометра умножают на числовое значение цены деления и получают величину объекта в мкм. Каждый результат проверяют и записывают в рабочем альбоме. Измеряют параметры трех-четырех клеток и диаметр клеточного ядра при большом увеличении микроскопа. В альбоме делают зарисовки препарата с линейкой окуляр-микрометра.

Контрольные вопросы

1. Как измеряется объект под микроскопом?
2. Как определяется цена деления окуляр-микрометра?

Раздел 2. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТКИ

Клетка состоит из ряда относительно независимых структурных и функциональных компонентов, выполняющих специфические функции. Эукариотические клетки принято разделять на ядро (систему хранения, воспроизведения и реализации генетической информации) и цитоплазму. В цитоплазме, в свою очередь выделяют основную плазму клетки - гиалоплазму (систему основного промежуточного обмена) и целый ряд структур – органоидов мембранного и немембранного строения. К одномембранным органоидам относится вакуолярная система, представленная эндоплазматический ретикулумом, комплексом Гольджи, эндо- и экзоцитозными вакуолями, лизосомами, пероксисомами. Это система синтеза и внутриклеточного транспорта белковых биополимеров и генезиса многих клеточных мембран. Двумембранные органоиды: митохондрии – органоиды энергообеспечения клетки за счет синтеза АТФ; и пластиды растительных клеток – система синтеза АТФ и фотосинтеза. К немембранным органоидам относятся рибосомы (элементарные клеточные машины синтеза белка), система цитоскелета (опорно-двигательная система клетки), ядрышко и включения. Поверхность клетки покрыта цитоплазматической мембраной - барьерно-рецепторно-транспортной системой, функционально связанной с вакуолярной системой, с элементами цитоскелета и с гиалоплазмой.

Все подсистемы клетки образуют сопряженное единство и находятся во взаимозависимости.

ЗАНЯТИЕ № 4

ТЕМА: Строение и функции цитоплазматической мембраны и субмембранной опорно-сократимой системы

Цель: Изучить строение плазматической мембраны и субмембранной опорно-сократимой системы.

Задачи:

1. С помощью альбома электронных фотографий рассмотреть и зарисовать строение микротрубочек и промежуточных филаментов (альбом электронных микрофотографий, рис.1)

2. Изучить строение органелл движения: ресничек и жгутиков с помощью альбома электронных микрофотографий (альбом электронных микрофотографий, рис. 2, 3) и готового микропрепарата: «Ресничный эпителий мантии беззубки».

Материалы и оборудование

Микроскопы Meiji Techno серии МТ 4000, руководство пользователя, альбом электронных микрофотографий, готовые микропрепараты.

Теоретическая часть

Цитоплазматическая мембрана. Основу структурной организации клетки составляют биологические мембраны. Цитоплазматическая мембрана – **плазмалемма** – это биологическая мембрана, окружающая цитозоль живой клетки, имеющая толщину 7,5 нм.

Согласно «жидко-мозаичной» модели (Николсон, Сингер, 1971) клеточные мембраны построены по общему принципу: это тонкие липопротеидные пленки, состоящие из двойного слоя липидных молекул, в который включены молекулы белка. В весовом отношении в зависимости от типа мембран на долю липидов приходится 25-60%, на долю белков 40-75%. В состав многих мембран входят углеводы, количество которых может достигать 2-10%.

К липидам относится большая группа органических веществ, обладающих плохой растворимостью в воде (гидрофобностью) и хорошей растворимостью в органических растворителях (липофильностью). Липиды, входящие в состав мембраны, делятся на структурные и регуляторные. Характерными представителями липидов, встречающихся в клеточных мембранах, являются фосфолипиды (глицерофосфатиды или глицеролипиды), сфингомиелины и из стероидных липидов – холестерин (*рис. 7*).

Больше всего в мембране фосфолипидов, в головках которых содержатся остатки фосфорной кислоты. Фосфолипиды представляют собой сложные эфиры трехатомного спирта глицерина с двумя жирными кислотами и с фосфорной кислотой, которая в свою очередь может быть связана с различными химическими группами (холином, серином, этаноламином и др.). Другая группа мембранных липидов называется сфингомиелиновой, в ней глицерин замещен аминокислотой сфингозином. Из липидов, относящихся к стероидам, больше всего в мембранах холестерина. В растительных клетках холестерин заменяют фитостерины. У бактерий стеринны отсутствуют.

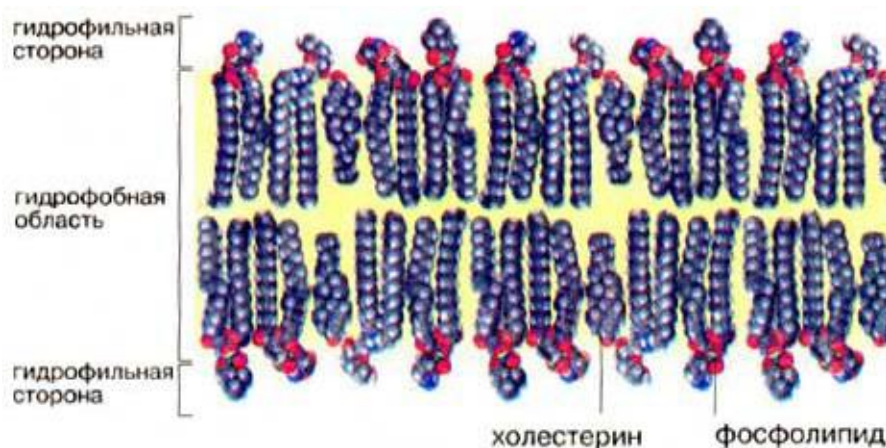


Рис. 7. Организация молекул липидов в бислое клеточной мембраны[7]

Характерной особенностью липидов мембран является разделение их молекулы на две функционально различные части: неполярные (гидрофобные), не несущие зарядов хвосты, состоящие из жирных кислот и заряженные (гидрофильные) полярные головки. Полярные головки несут на себе отрицательные заряды или могут быть нейтральными (в случае, если они имеют одновременно положительные и отрицательные заряды). Наличие неполярных хвостов липидов объясняет их хорошую растворимость в жирах и органических растворителях. Благодаря такой структуре липиды способны самопроизвольно образовывать мембраны, в которых периферические зоны слоя, смотрящие в водную фазу, будут содержать исключительно полярные головки, а незаряженные хвосты будут образовывать общую центральную гидрофобную зону. Мембраны всегда замкнуты сами на себя, образуя полые вакуоли, пузырьки или везикулы.

Белки, входящие в состав мембраны подразделяют на интегральные (трансмембранные), полуинтегральные и периферические. Большая часть белков взаимодействует с липидами в составе мембран на основе гидрофобных связей. Многие мембранные белки состоят как бы из двух частей: из участков, богатых полярными (несущими заряд) аминокислотами, и участков, обогащенных неполярными аминокислотами (глицином, аланином, валином, лейцином и др.). Такие белки в липидных слоях мембран располагаются так, что их неполярные участки как бы погружены в гидрофобную зону липидов. Полярная (гидрофильная) же часть таких белков взаимодействует с головками липидов и обращена в сторону водной фазы. Молекулы липидов постоянно перемещаются со скоростью, приблизительно 2 мкм/с. Липидные молекулы способны двигаться вдоль липидного слоя, вращаться вокруг своей оси, а также переходить из слоя в слой. Белки также обладают латеральной, продольной подвижностью, но скорость их перемещения в десятки и сотни раз ниже.

Интегральные белки пронизывают мембраны насквозь, их размер в среднем равен 8 нм. Обычно это асимметрично локализованные в мембране белки. С цитоплазматической стороны мембраны интегральные белки связаны с периферическими белками, которые располагаются на поверхности билипидного слоя. Полуинтегральные белки лишь частично погружены за счет гидрофобных свойств отдельных участков в липидный слой (*рис. 8*).

Состав липидов и белков по обе стороны мембраны различен, что определяет асимметричность строения мембраны.

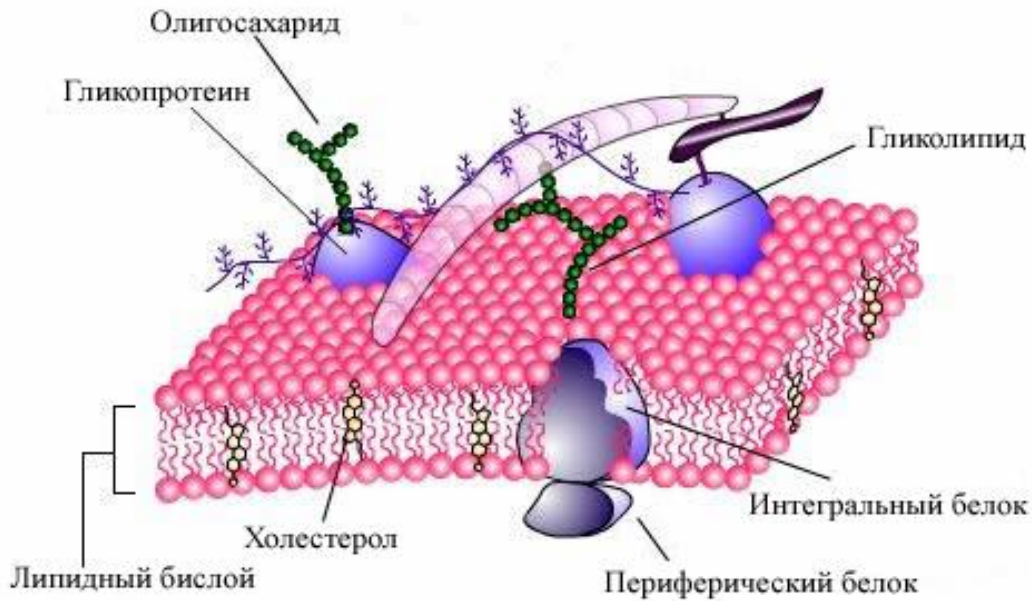


Рис. 8. Строение биологической мембраны [15]:

1 – молекула липида; 2 – липидный бислой; 3 – интегральные белки; 4 – периферические белки; 5 – полуинтегральные белки

Углеводный компонент в составе клеточных мембран выражен в различной степени (от 2 до 10%), представлен главным образом гликопротеинами. В клетках животных он относительно тонок, представлен полисахаридами, которые окружают клеточную мембрану снаружи, формируя надмембранный поверхностный слой клетки – *гликокаликс*. Гликокаликс служит «ярлыком», необходимым животной клетке для связи с окружающей средой, он участвует в формировании различного рода специфических выпячиваний цитоплазмы: микроворсинок, ресничек, жгутиков. В клетках грибов, растений и бактерий нет гликокаликса, их клеточная мембрана окружена плотной оболочкой – *клеточной стенкой*.

Клеточная мембрана выполняет множество важных функций, от которых зависит жизнедеятельность клеток. Она обладает избирательной проницаемостью, обеспечивает постоянство внутренней среды – *гомеостаз* клетки, участвует в образовании барьера между внутренним содержимым клетки и внешней средой, обеспечивает обмен веществ между цитоплазмой и внешней средой, осуществляя избирательный транспорт веществ.

Субмембранная опорно-сократимая система (цитоскелет). Цитоскелет объединяет три подсистемы: систему микрофиламентов; систему микротрубочек и систему промежуточных филаментов.

Само понятие о цитоскелете было высказано Н.К. Кольцовым, выдающимся русским цитологом в начале XX века. Степень выраженности цитоскелета в разных клетках различна. Белковые компоненты цитоскелета характеризуются способностью к полимеризации и деполимеризации. Такая нестабильность приводит, например, к изменению формы клетки. Некоторые компоненты цитоскелета при участии специальных дополнительных белков могут стабилизироваться или образовывать сложные фибриллярные ансамбли.

При взаимодействии с другими специальными белками-транслокаторами (или моторными белками) они участвуют в разнообразных клеточных движениях.

Микрофибриллярная система (система микрофиламентов). Основным белком микрофиламентов является *актин* – неоднородный белок, в различных клетках могут быть разные его варианты или изоформы, каждая из которых кодируется своим геном. Актин (М – 42 тыс.) в мономерной форме имеет вид глобулы (G-актин), содержащей в своем составе молекулу АТФ. При его полимеризации образуется тонкая фибрилла (F-актин) толщиной 8 нм, представляющая собой пологую спиральную ленту. Актиновые микрофиламенты полярны по своим свойствам. Это динамичные структуры, которые могут собираться и разбираться в зависимости от наличия глобулярного актина (*рис. 9*). В клетках неустойчивая фибриллярная система, стабилизируется массой специфических белков, ассоциирующих с F-актином. Так, белок тропомиозин, взаимодействуя с микрофиламентами, придает им необходимую жесткость. Целый ряд белков, например филамин и \square -актинин образуют поперечные скрепки между нитями F-актина, что приводит к образованию сложной трехмерной сети, придающей гелеобразное состояние цитоплазме. Особую роль при взаимодействии с актином играют белки миозинового типа, которые образуют вместе с актином комплекс, способный к сокращению при расщеплении АТФ.

Миозины представляют собой семейство сходных белков. Существуют три основных типа миозинов. Миозин I представляет собой мономерную молекулу. Миозин II и миозин V являются димерами, у которых \square -спиральный участок хвоста образует сверхспиральный палочковидный участок. Две молекулы миозина II могут ассоциировать друг с другом, образуя толстую биполярную фибриллу, обеспечивающую мышечное сокращение и деление животной клетки. Миозины I и V типа участвуют во взаимодействиях между элементами цитоскелета и мембранами при транспорте везикул.

Согласно модели скользящих нитей (Г. Хаксли) миофибриллы представляет собой нить (толщиной 1-2 мкм) с чередующимися темными и светлыми участками. Единицей их строения является саркомер (размером 1,8-2,8 мкм). - участок между двумя Z- дисками. Вдоль саркомера располагаются три участка протофибрилл: тонкие, связанные с Z -диском, затем толстые и снова тонкие, связанные со следующим Z -диском. Тонкие нити состоят в основном из белка актина, а толстые – из белка миозина II. Z -диски имеют в своем составе белок \square - актинин и десмин. В тонких нитях кроме актина находятся белки тропомиозин и тропонин.

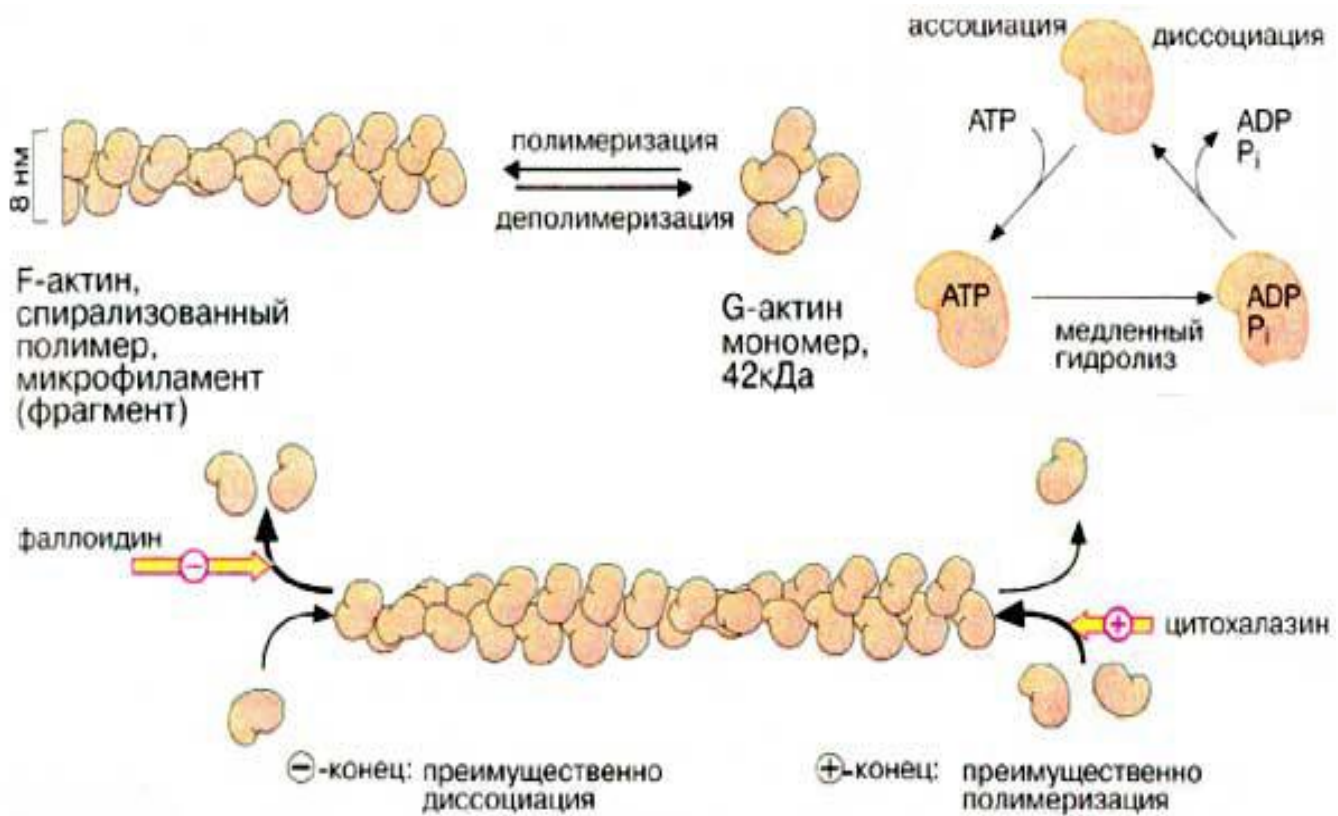


Рис. 9. Схема полимеризации и деполимеризации основного белка микрофибриллярной системы – актина [7]

Миозин, входящий в состав толстых нитей, - очень крупный белок (M–500 тыс.), состоящий из шести цепей: двух длинных, спирально обвивающихся одна вокруг другой (тяжелые цепи), и четырех коротких (легкие цепи), которые связываются с глобулярными головками длинных цепей. За счет связи головок миозина с актином возникают актино-миозиновые комплексы, активность которых в сотни раз выше, чем АТФ-азная активность одних миозинов.

Сокращение происходит за счет уменьшения расстояния между Z-дисками, т.е. за счет уменьшения длины саркомеров примерно на 20%. Механизм мышечного сокращения заключается в кооперативном укорачивании всех саркомеров по всей длине миофибриллы. Г.Хаксли показал, что в основе сокращения лежит перемещение относительно друг друга тонких и толстых нитей. При этом толстые миозиновые нити как бы входят в пространства между актиновыми нитями, приближая, друг к другу Z-диски.

Функции микрофиламентов:

1. Образование сократительного аппарата клетки, обеспечивающего подвижность
2. Формирование скелетных структур, способных к собственному движению за счет процессов полимеризации и деполимеризации актина.
3. Механомеханические: перемещение, эндо - и экзоцитоз, цитотомия.

Тубулиновая система или система микротрубочек. У тубулиновой системы много общего с системой микрофиламентов, во-первых, способность к полимеризации и деполимеризации; во-вторых, наличие полярности у белковых нитей и, в-третьих, большое количество вспомогательных белков. Основным белком микротрубочек тубулин. Молекула тубулина представляет собой гетеродимер, состоящий из α -тубулина и β -тубулина, которые при ассоциации образуют собственно белок тубулин. При полимеризации молекулы тубулина объединяются формируя 13 продольных протофиламентов, которые скручиваются в полую трубку. В морфологическом отношении микротрубочки представляют собой длинные полые цилиндры с внешним диаметром 25 нм (рис. 10). Микротрубочки являются очень динамичными структурами, которые могут достаточно быстро возникать и разбираться.

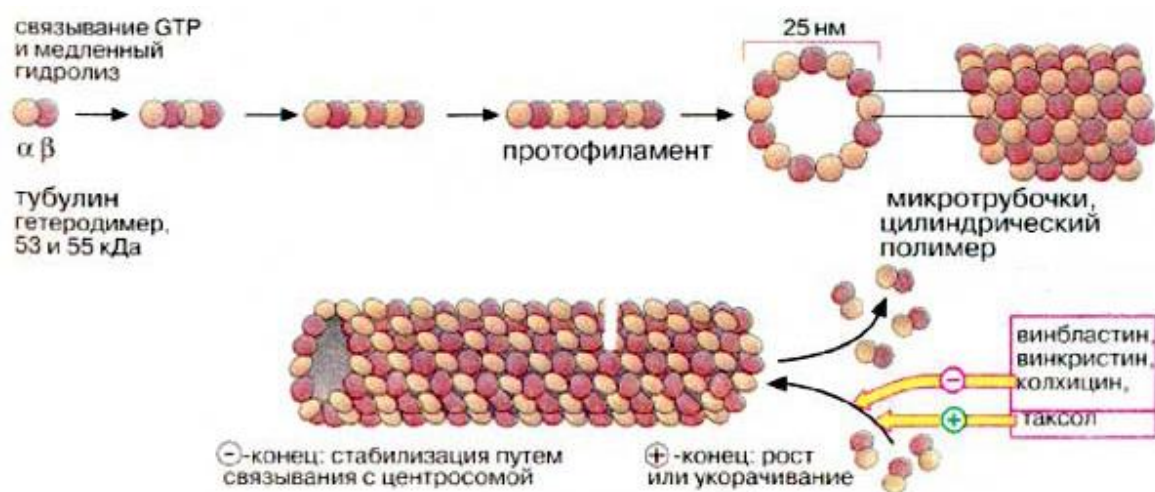


Рис. 10. Схема строения микротрубочки [7]

Среднее время жизни цитоплазматических микротрубочек составляет всего лишь 5 минут. Микротрубочки в составе веретена деления функционируют около 15-20 сек. Считается, что динамическая нестабильность цитоплазматических микротрубочек связана с задержкой гидролиза ГТФ. Микротрубочки цитоплазмы в ассоциации со специфическими ассоциированными моторными белками образуют АТФ-азные комплексы, способные приводить в движение клеточные компоненты. Микротрубочки начинают свой рост от специальных участков в клетке, от центров организации микротрубочек (ЦОМТ). Рост микротрубочек цитоплазмы происходит полярно: наращивается (+) – конец микротрубочки. В качестве ЦОМТ в клетках животных участвуют главным образом клеточные центры. Микротрубочки

обращены своими (-)-концами к ЦОМТам, где заблокированы специальными белками, предотвращающими или ограничивающими деполимеризацию тубулинов.

Функции микротрубочек:

1. Входят в состав центриолей, ресничек и жгутиков. Обуславливают движение ресничек и биение жгутика.
2. Составляют нити веретена деления клетки при митозе.
3. Осуществляют транспорт внутри клетки, например, транспорт мембранных пузырьков от ЭПР к комплексу Гольджи, перемещение митохондрий.
4. Являются цитоскелетом клетки и поддерживают ее форму.

Промежуточные филаменты. Промежуточные филаменты строятся из фибриллярных мономеров. Основная конструкция промежуточных филаментов напоминает канат, имеющий толщину около 8-10 нм. В состав промежуточных филаментов входит четыре типа белков. Первый – кислые и нейтральные кератины, встречающиеся в эпителиальных клетках. Молекулярный вес кератинов колеблется от 40 до 70 тыс.

Второй тип белков промежуточных филаментов включает в себя три вида белков, имеющих сходную молекулярную массу (45-53 тыс.). Это – виментин, характерный для клеток мезенхимного происхождения, входящий в состав цитоскелета клеток соединительной ткани, эндотелия, клеток крови. Десмин – характерен для мышечных клеток, как гладких, так и исчерченных. Глиальный фибриллярный белок входит в состав филаментов некоторых клеток глиальной ткани.

Третий тип – белки нейрофиламентов (М– от 60 до 130 тыс.) встречается в аксонах нервных клеток.

Четвертый тип – белки ядерной ламины. Имеют ядерную локализацию, сходны по строению и свойствам с белками промежуточных филаментов.

Все белки промежуточных филаментов характеризуются сходной аминокислотной последовательностью: состоят из 130 остатков в центральной части фибриллярной молекулы, имеющей α -спиральным строением. Наличие протяженных α -спиральных участков позволяет двум молекулам образовывать двойную спираль, подобно тому, что приводит к образованию палочковидного димера, длиной около 48 нм. Два димера, объединяясь бок о бок, образуют короткий протофиламент, тетрамер, толщиной около 3 нм. Такие протофиламенты объединяются в более толстые и длинные фибриллы, формируя полный филамент, состоящий из 8 продольных протофиламентов (*рис. 11*).

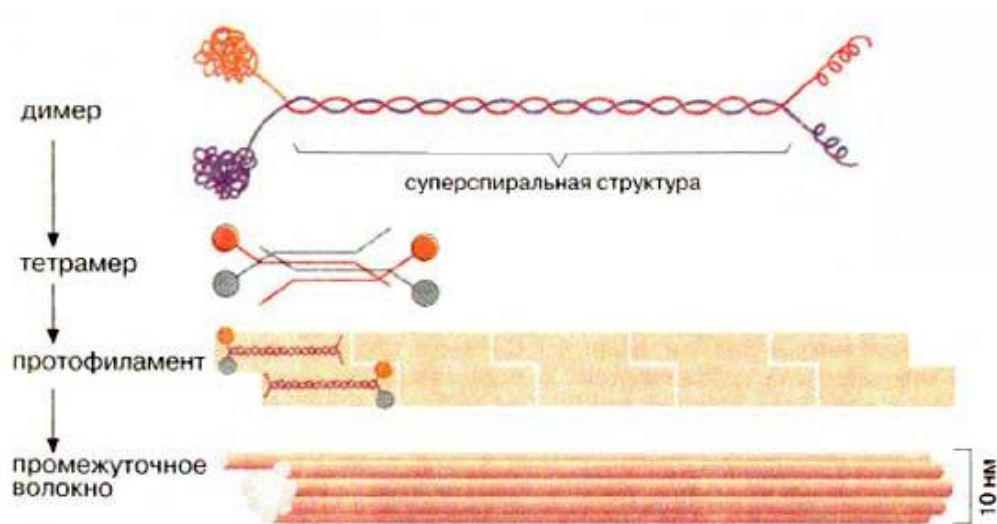


Рис. 11. Схема организации белков промежуточных волокон цитоскелета [7]

Цитоплазматические промежуточные филаменты относятся к самым стабильным и долгоживущим элементам цитоскелета. Они служат истинно опорной системой в клетках подвергающихся значительным физическим нагрузкам. В клетках кожного эпидермиса промежуточные филаменты образуют пучки (тонофиламенты), связанные с десмосомами, и создают жесткую внутриклеточную сеть. Топографически в клетке расположение промежуточных филаментов повторяет расположение микротрубочек, они как бы дублируют друг друга.

Функции промежуточных филаментов:

1. Структурная функция, связанная с противодействием растягивающим силам.
2. Интеграция трех основных систем клетки: поверхностного аппарата, цитозоля и ядра.

Таким образом, по своим свойствам и функциям элементы цитоскелета можно разделить на две группы: только каркасные фибриллы – промежуточные филаменты, и опорно-двигательные – как, например, актиновые микрофиламенты, взаимодействующие с моторными белками – миозинами, и тубулиновые микротрубочки, взаимодействующие с моторными белками динеинами и кинезинами.

Микрофиламенты и микротрубочки могут реализовать два принципиально различных способа движения. Первый из них основан на способности основного белка микрофиламентов – актина и основного белка микротрубочек – тубулина к полимеризации и деполимеризации, что может при связи этих белков с плазматической мембраной вызывать ее морфологические изменения в виде образования выростов (псевдоподий) на краю клетки для перемещения клетки по субстрату.

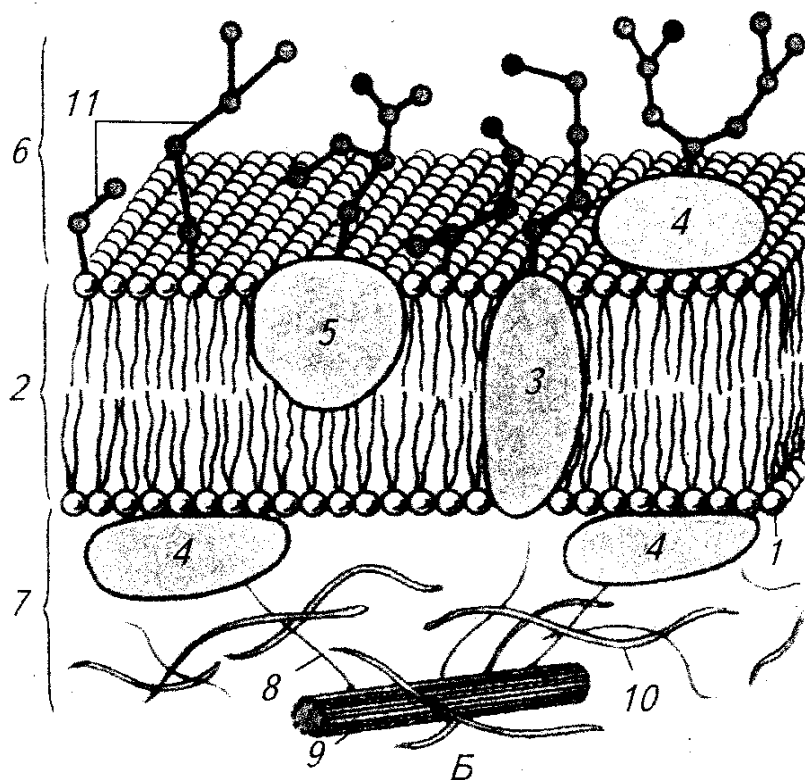


Рис. 12. Поверхностный аппарат клетки [12]:

1 – молекула липида; 2 – липидный бислой; 3 – интегральные белки; 4 – периферические белки; 5 – полуинтегральные белки; 6 – гликокаликс; 7 – субмембранная опорно-сократимая система; 8 – актиновые микрофиламенты; 9 – микротрубочки; 10 – промежуточные филаменты; 11 – гликолипиды

При втором способе передвижения фибриллы актина (микрофиламенты) или тубулина (микротрубочки) являются направляющими структурами, по которым перемещаются специальные подвижные белки - моторы. Последние могут связываться с мембранными или фибриллярными компонентами клетки и тем самым участвовать в их перемещении.

Плазматическая мембрана, субмембранная опорно-сократимая система и надмембранные структуры формируют взаимосвязанную систему – поверхностный аппарат клетки, обеспечивающий реализацию жизненных функций клетки (*рис. 12*).

Практическая часть

1. Вначале работы с помощью альбома электронных фотографий необходимо рассмотреть и зарисовать строение микротрубочек и промежуточных филаментов (альбом электронных микрофотографий, рис.1)

2. Изучить строение органелл движения: ресничек и жгутиков с помощью альбома электронных микрофотографий (альбом электронных микрофотографий, рис. 2 и 3).

3. Рассмотреть и зарисовать при малом и большом увеличениях микроскопа готовый микропрепарат: «*Ресничный эпителий мантии беззубки*» (*рис. 13*).



Рис. 13. Ресничный эпителий мантии беззубки. Цифровое изображение препарата выполнено камерой Vision CAM для тринокулярного микроскопа Meiji Techno с использованием интегрированного адаптера и разъема C-mount (ув. x 3000)

Описание микропрепарата. Однослойный эпителий, выстилающий мантию, состоит из высоких цилиндрических клеток (*рис. 14*). Ядра в этих клетках располагаются на разных уровнях, но всегда в базальных частях клеток. Базальная часть клеток примыкает к базальной мембране, апикальная - обращена в мантийную полость и покрыта ресничками. Ядра имеют овальную, иногда очень сильно вытянутую вдоль длинной оси клетки форму. В них четко видны глыбки хроматина и ядрышки. Свободная (апикальная) поверхность клеток покрыта близко расположенными друг к другу ресничками. Синхронное движение ресничек и создает непрерывный ток воды.

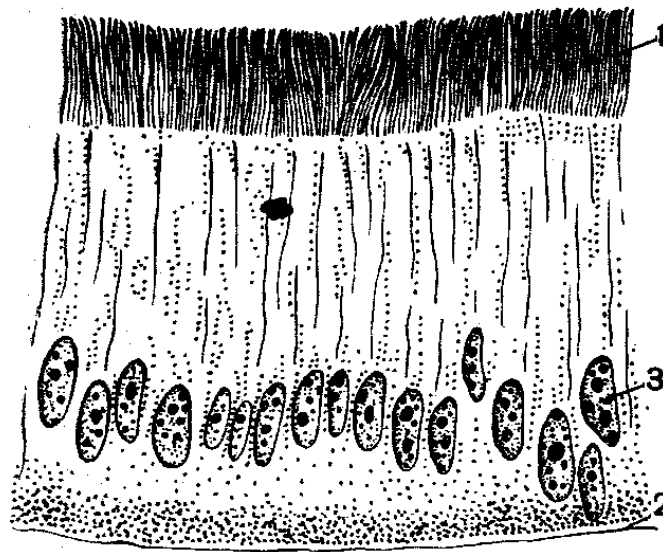


Рис. 14. Ресничный эпителий мантии беззубки [9]:
1 – ресничка; 2 – базальная мембрана; 3 – ядра клеток

При изучении апикальных частей эпителиальных клеток видно, что у основания ресничек располагается прерывистая линия. Она состоит из близко расположенных друг к другу базальных телец, от каждого из которых отходит ресничка.

В рабочем альбоме сделать рисунок препарата, обозначить все видимые структуры.

Контрольные вопросы

1. Современные представления о строении и функции цитоплазматической мембраны.
2. Опишите строение, состав и функции липидного бислоя плазматических мембран.
3. Надмембранные структуры эукариотических клеток: гликокаликс и клеточная стенка.
4. Раскройте механизм мембранного транспорта макромолекул и частиц.
5. Опишите строение и функции микрофибриллярной системы или системы микрофиламентов (актин-миозиновой системы).
6. Опишите строение и функции системы микротрубочек (тубулин-динеиновой системы).
7. Опишите строение и функции микрофиламентов.
8. Строение и функции системы промежуточных филаментов.
9. Единство субсистем поверхностного аппарата клетки в реализации основных функций клетки.

ЗАНЯТИЕ № 5

ТЕМА: Особенности строения и функции вакуолярной системы

Цель: Изучить строение и функции основных компартментов вакуолярной системы: эндоплазматического ретикулума, комплекса Гольджи, лизосом.

Задачи:

1. С помощью альбома электронных микрофотографий рассмотреть и зарисовать строение шероховатого (альбом электронных микрофотографий, рис. 6) и гладкого (альбом электронных микрофотографий, рис. 7) эндоплазматического ретикулума.

2. Рассмотреть и зарисовать готовый микропрепарат: «Аппарат Гольджи в нервных клетках спинального ганглия котёнка» (ув. x10, ув. x40).

3. С помощью альбома электронных микрофотографий рассмотреть и зарисовать строение комплекса Гольджи (альбом электронных микрофотографий, рис. 8, рис. 9), первичных, вторичных лизосом и аутолизосом (альбом электронных микрофотографий, рис. 10).

Материалы и оборудование

Микроскопы Meiji Techno серии МТ 4000, руководство пользователя, альбом электронных микрофотографий, готовые микропрепараты.

Теоретическая часть

Гиалоплазма заполнена сложной трехмерной мембранной сетью, которая называется вакуолярной. Она состоит из одномембранных разнообразных по строению и функциям органоидов (эндоплазматического ретикулума, комплекса Гольджи, лизосом, эндосом, пероксисом и секреторных вакуолей).

Функции вакуолярной системы:

1. Механическая. Разделяя гиалоплазму клетки на отсеки, вакуолярная система служит добавочным механическим остовом для коллоидной структуры цитоплазмы.

2. Регуляторная. Мембраны вакуолярной системы могут регулировать обмен веществ между внутренним и наружным компартаментами клетки, и участвуют в процессах диффузии и активного переноса веществ.

3. Синтетическая. Вакуолярная система выполняет общую функцию синтеза, перестройки (модификации), сортировки и выведения (экспорта) из клетки биополимеров, главным образом белков-гликопротеидов.

Для всей вакуолярной системы характерна кооперативность ее функционирования, взаимосвязь и последовательность этапов образования, перестройки, транспорта и экспорта синтезированных продуктов.

Эндоплазматический ретикулум. Открыт в 1945г. К. Портером. Мембрана эндоплазматического ретикулума (ЭПР) состоит на 2/3 из белка и на 1/3 – из липидов. Различают два типа ЭПР: гранулярный (шероховатый) и гладкий (*рис. 15*). **Гранулярный (шероховатый) ЭПР** представлен замкнутыми мембранами, которые образуют на сечениях вытянутые мешки, цистерны или же имеют вид узких каналов. Ширина полостей цистерн может очень варьировать в зависимости от функциональной активности клетки. Отличительной чертой этих мембран является то, что они со стороны гиалоплазмы покрыты рибосомами. Рибосомы участвуют в синтезе «экспортируемых» белков.

Информационная РНК, кодирующая секреторный белок, соединяется с рибосомой ЭПР и начинается синтез белковой цепи. Вначале синтезируется “сигнальная последовательность” белка, богатая гидрофобными аминокислотами. В нее входит 16-30 аминокислот. Эта “сигнальная последовательность” в цитозоле узнается и связывается с “узнающей сигнал частицей” рибосомы (SRP-частица), состоящей из одной молекулы 7S РНК и 6 различных полипептидных цепей. На поверхности же мембраны ЭПР, обращенной к гиалоплазме расположены интегральные рецепторные белки (рибофорины), связывающиеся с SRP-частицами. В результате SRP-частица связывается со своим рецептором и одновременно связывает данную рибосому с мембраной ЭР.

Такая “заякоренная” рибосома с SRP-частицей, блокирующей дальнейший рост полипептидной цепи, взаимодействует с большим белковым комплексом, расположенным на мембране ЭПР, **транслоконом**. После связывания рибосомы с транслоконом происходит отделение SRP-частицы и синтезированный первичный пептид входит в канал диаметром около 2 нм, который образует транслокон. После этого возобновляется синтез полипептида, он удлиняется и его сигнальная последовательность, вместе с растущей цепочкой оказывается внутри полости цистерны ЭПР. Таким образом, синтезируемый белок проходит сквозь мембрану ЭПР во время его синтеза (**котрансляционно**), одновременно с его трансляцией. Внутри полости ЭР с помощью фермента сигнальная последовательность отщепляется. После окончания синтеза вся белковая молекула оказывается в полости ЭПР и в это время рибосома отделяется от транслокона и диссоциирует. После этого в транслоконе канал закрывается.

Внутри цистернального пространства ЭПР белки подвергаются различным модификациям.

Наиболее характерной из них для ЭПР является **первичное гликозилирование** - ковалентное связывание белковой цепи со сложным олигосахаридом. При этом на белковую молекулу переносится готовый блок олигосахаридов, который связывается с аспарагиновыми остатками белковой молекулы. Этот олигосахаридный комплекс содержит 2 молекулы N-

ацетилгликозамина, 9 молекул маннозы и 3 молекулы глюкозы и связан со специальным липидом долихолом на внутренней поверхности мембраны ЭПР, смотрящей в просвет вакуоли ЭПР. По мере транслокации белковой цепи во время ее синтеза, каждый аспарагиновый остаток связывается с олигосахаридным комплексом, с помощью фермента, являющегося интегральным белком мембран ЭПР. В результате этого синтезирующийся белок становится гликопротеидом.

Кроме того, в полости цистерн ЭПР белки претерпевают ряд дополнительных изменений: образуются дисульфидные связи, происходит их правильное сворачивание, происходит сборка четвертичной структуры белков. Эти процессы происходят при участии белков-шаперонов. Шапероны принадлежат к белкам трех семейств: белкам теплового шока (hsp 60, hsp 70, hsp 90). Свое название эти белки получили потому, что их синтез возрастает при повышении температуры. Шапероны обладают сродством к гидрофобным участкам полипептидной цепи и выполняют функцию защиты белков от денатурации. Связывание с шаперонами защищает несвернутую полипептидную цепь от контактов с другими белками и создает условия для нормального сворачивания растущего пептида.

Функции шероховатого ЭПР:

1. Гранулярный ЭПР осуществляет котрансляционный синтез белков, их первичную модификацию, соединение с олигосахаридами – гликозилирование синтезированных белков, образование гликопротеидов; синтез мембранных липидов и их встраивание в мембрану – “сборка мембран”.
2. Транспорт синтезированных веществ в комплекс Гольджи.
3. Деление клетки на компартменты.

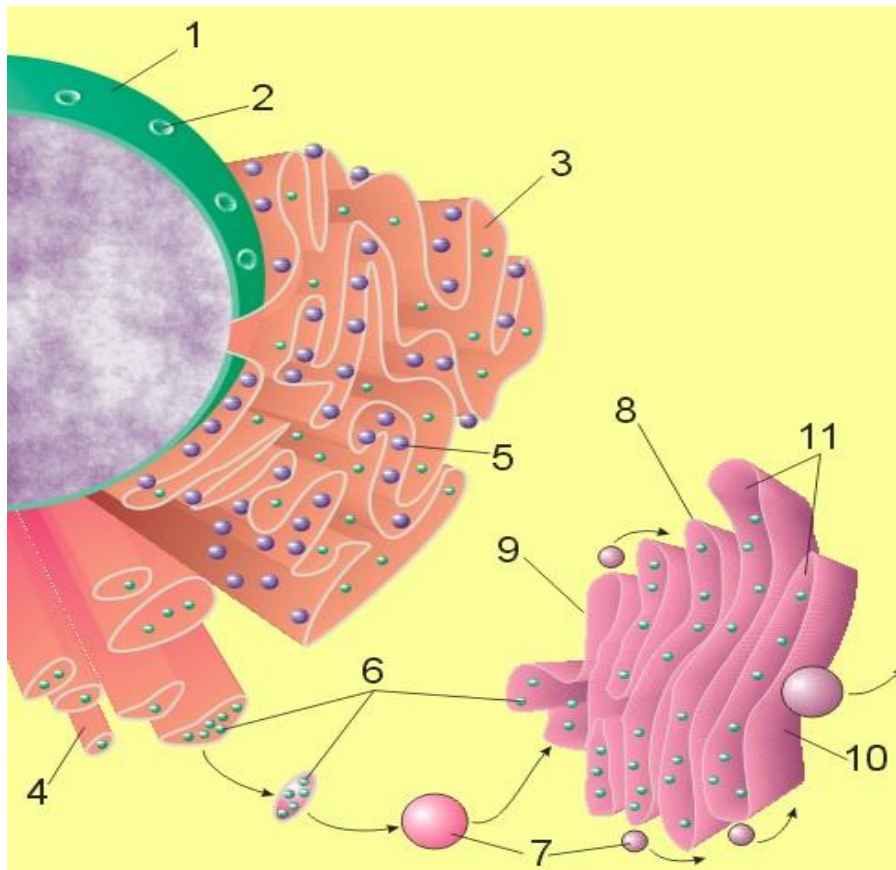


Рис. 15. Эндоплазматический ретикулум эукариотической клетки [16]:
 1 – ядро; 2 – ядерные поры; 3 – гранулярный ЭПР; 4 – агранулярный ЭПР; 5 – рибосомы; 6 – макромолекулы; 7 – секреторные пузырьки; 8 – комплекс Гольджи; 9 – цис-полюс; 10 – транс-полюс; 11 – цистерны

Гладкий эндоплазматический ретикулум. Гладкий ЭПР представляет собой часть мембранной вакуолярной системы. В морфологическом отношении он также представлен мембранами, образующими мелкие вакуоли и трубки, каналцы, которые могут ветвиться, сливаться друг с другом. В отличие от гранулярного на мембранах гладкого ЭР нет рибосом. Диаметр вакуолей и каналцев гладкого ЭР обычно около 50-100 нм (*рис. 16*). Выраженность сети из этих мембранных элементов может быть неодинаковой как для различных клеток, так и внутри одной клетки. Большей частью такие гладкие каналцы образуют скопления, или зоны.

Функции гладкого ЭПР:

1. Синтез и метаболизм липидов и углеводов.

2. Участие гладкого ЭПР в клетках печени в процессах обезвреживания ядовитых веществ. В клетках печени в гладком ЭПР происходят процессы деградации различных вредных веществ, процессы метаболической дезактивации, которые осуществляются целым рядом окислительных ферментов, из которых наиболее известен белок, называемый цитохром Р450. Этот белок участвует в присоединении гидроксильной группы к различным, потенциально опасным водонерастворимым углеводородам или к липофильным ядовитым веществам (например, четыреххлористый углерод), попадающим в

мембранный бислой. Здесь же другие ферменты добавляют к этим гидроксильным группам отрицательно заряженные молекулы (сульфат, глюконовая кислота), что делает метаболиты или вредные липофильные вещества растворимыми в воде, из-за чего они могут выводиться из организма вместе с мочой.

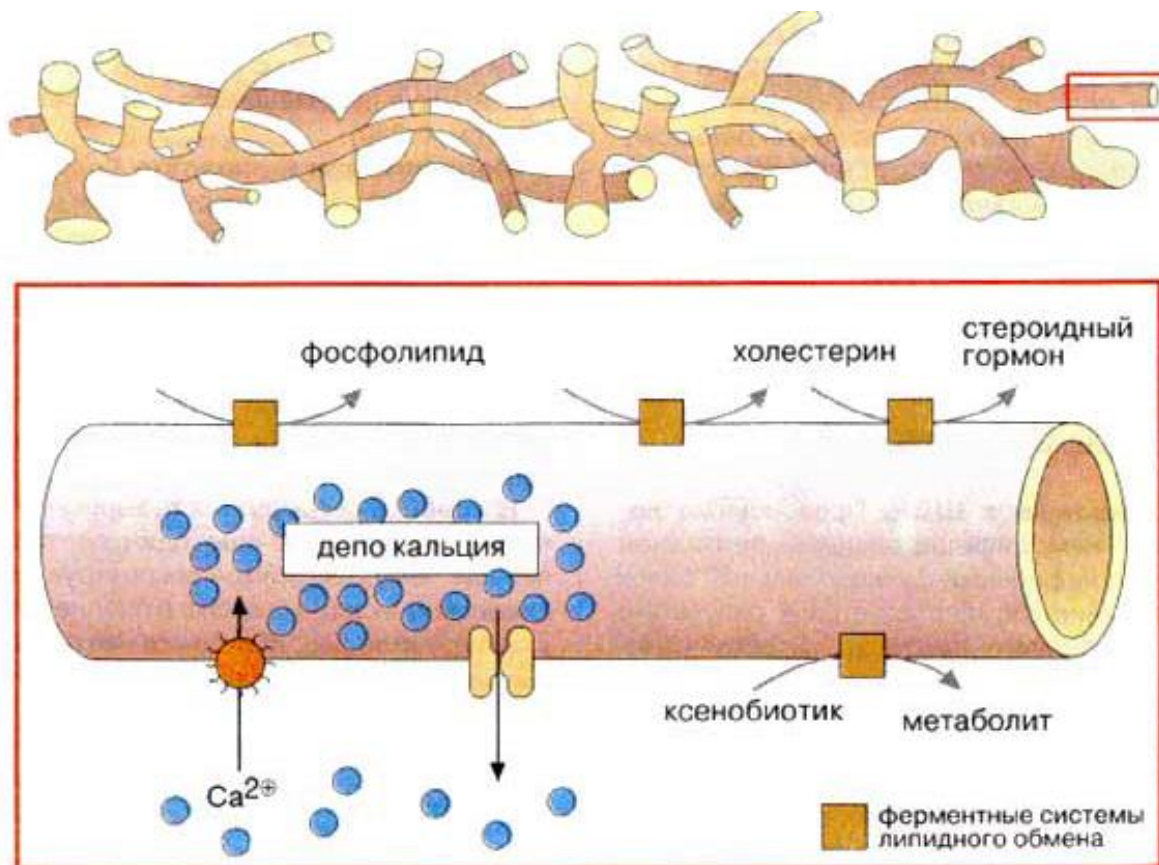


Рис. 16. Схема организации и функционирования гладкого эндоплазматического ретикулума [7]

Выполнение гладким ЭПР в мышечных клетках роли депо для ионов Ca^{2+} , необходимых для мышечных сокращений. Гладкий ЭПР (саркоплазматический ретикулум) выполняет специальную функцию депонирования ионов кальция. В присутствии АТФ он может активно поглощать и накапливать ионы кальция, что приводит к расслаблению мышечного волокна. Белки кальциевого насоса являются интегральными белками мембран саркоплазматического ретикулума.

Комплекс Гольджи. Открыт в 1898 г. итальянским ученым Камилло Гольджи. Встречается во всех эукариотических клетках. Участки комплекса Гольджи, имеют либо вид сложных сетей, где ячейки связаны друг с другом или вид отдельных палочек, зерен, вогнутых дисков и т.д. Комплекс Гольджи представлен мембранными структурами, собранными вместе в небольшой зоне. Отдельная зона скопления этих мембран является **диктиосомой**. В диктиосоме плотно друг к другу (на расстоянии 20-25 нм) расположены в виде стопки

плоские мембранные мешки, или цистерны, между которыми располагаются тонкие прослойки гиалоплазмы. Каждая отдельная цистерна имеет диаметр около 1 мкм и переменную толщину; в центре ее мембраны могут быть сближены (25 нм), а на периферии иметь расширения, ампулы, ширина которых непостоянна. Количество таких мешков в стопке обычно не превышает 5-10. У некоторых одноклеточных их число может достигать 20 штук. Принято различать в зоне диктиосомы – *цис* – полюс и зрелый – *транс* – полюс. Между ними располагается средний участок или медиальная зона комплекса Гольджи (*рис. 17*).

Через комплекс Гольджи проходит три потока белков. Во-первых, гидролитические ферменты, направляющиеся в компартмент лизосом. Известно, что только белки-предшественники лизосомных гидролаз имеют специфическую олигосахаридную, а именно маннозную группу. В *цис*-цистернах эти группировки фосфорилируются и дальше вместе с другими белками переносятся от цистерны к цистерне, через среднюю зону в *транс* – полюс. Мембраны *транс* – полюса содержат трансмембранный белок – рецептор (манноза-6-фосфатный рецептор), который узнает фосфорилированные маннозные группировки олигосахаридной цепи лизосомных ферментов и связывается с ними. Это связывание происходит при нейтральных значениях pH внутри цистерн транс-полюса. На мембранах эти маннозо-6-фосфатные-рецепторы образуют группы, которые концентрируются в окаймленных клатрином пузырьках. Оторвавшись от *транс* – полюса, эти пузырьки теряют клатрин, сливаются с эндосомами, перенося свои лизосомные ферменты, связанные с мембранными рецепторами, в эту вакуоль. Внутри эндосом из-за активности протонного переносчика происходит закисление среды. Начиная с pH 6, лизосомные ферменты диссоциируют от маннозо-6-фосфатных-рецепторов, активируются и начинают работать в полости эндолизосомы. Участки же мембран вместе с маннозо-6-фосфатными-рецепторами возвращаются путем рециклизации мембранных пузырьков обратно в *транс*-сеть аппарата Гольджи.

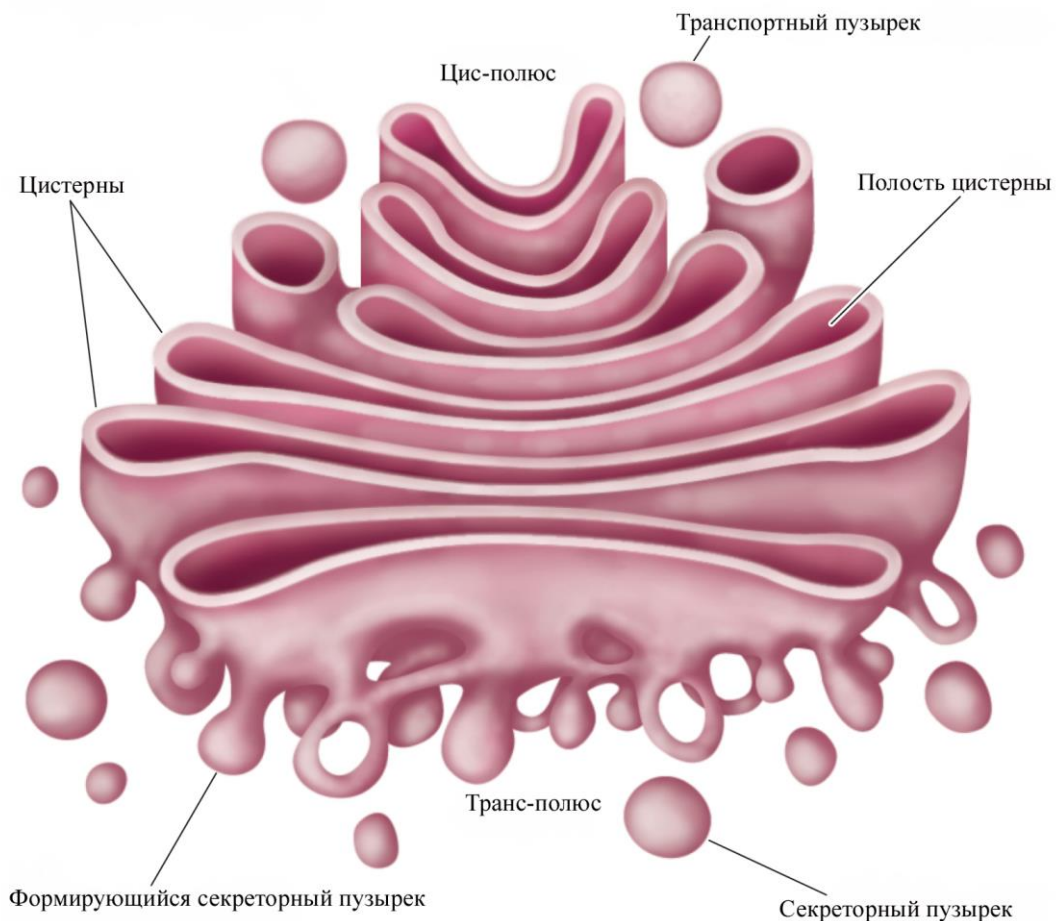


Рис. 17. Организация комплекса Гольджи [15]

Во-вторых, белки, которые накапливаются в секреторных вакуолях, и выделяются из клетки только при получении специальных сигналов. Эти секреторные белки попадают сначала в мелкие вакуоли тоже одетые клатрином, которые затем сливаются друг с другом. В секреторных вакуолях часто происходит агрегация накопленных белков в виде плотных секреторных гранул. Это приводит к повышению концентрации белка в этих вакуолях примерно в 200 раз, по сравнению с его концентрацией в аппарате Гольджи. Затем эти белки по мере накопления в секреторных вакуолях выбрасываются из клетки путем экзоцитоза, после получения клеткой соответствующего сигнала. В-третьих, секреторные белки, постоянно выделяемые клеткой, формирующие путь конститутивной секреции. Например, многие клетки постоянно выделяют белки, способствующие связыванию их с субстратами, при этом постоянно идет поток мембранных пузырьков к поверхности клетки, несущие элементы гликокаликса и мембранных гликопротеидов. Этот поток выделяемых клеткой компонентов не подлежит сортировке в рецепторной *транс* – зоне комплекса Гольджи. Первичные вакуоли этого потока также отщепляются от мембран и относятся по своей структуре к окаймленным вакуолям, содержащим клатрин.

В *цис*- и средних зонах диктиосом все эти белки идут вместе без разделения, они только раздельно модифицируются в зависимости от их

олигосахаридных маркеров. Собственно разделение белков, их сортировка, происходит в *транс*-полюсе комплекса Гольджи, где имеется специальный механизм пространственного разделения разных белков и их путей следования.

В комплексе Гольджи растительных клеток происходит синтез полисахаридов матрикса клеточной стенки (гемицеллюлозы, пектины). Кроме того, диктиосомы растительных клеток участвуют в синтезе и выделении слизи и муцинов, в состав которых входят также полисахариды. Синтез же основного каркасного полисахарида растительных клеточных стенок, целлюлозы, происходит на поверхности плазматической мембраны.

В аппарате Гольджи клеток животных происходит синтез длинных неразветвленных полисахаридных цепей гликозаминогликанов и их сульфатирование.

Функции комплекса Гольджи:

1. Участие в сегрегации и накоплении продуктов, синтезированных в ЭПР.
2. Участие в их химических перестройках, созревании.
3. Синтез полисахаридов, их взаимосвязь с белками, приводящая к образованию мукопротеидов.
4. Выведения готовых секретов за пределы клетки.
5. Формирование клеточных лизосом.

Лизосомы. Лизосомы как мембранные внутриклеточные частицы были открыты французским биохимиком (Де Дюв, 1955). Фракция лизосом состоит из пузырьков размером 0,2-0,4 мкм, ограниченных одиночной мембраной (толщина ее около 7 нм), с кислыми гидролитическими ферментами (гидролазами), расщепляющими белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды и липиды. Выделяют около 40 видов гидролаз: протеиназы, нуклеазы, гликозидазы, фосфорилазы, фосфатазы, сульфатазы и др., оптимум действия которых осуществляется при pH 5,0. Мембранные элементы лизосом защищены от действия своих же гидролаз олигосахаридными участками, которые либо не узнаются лизосомными ферментами, либо просто мешают гидролазам взаимодействовать с ними.

Лизосомы обладают особенностями, которые позволяют им быстро переходить в активное состояние:

1. Развитым рецепторным аппаратом;
2. Способностью активно перемещаться в клетке за счет микротрубочек;
3. Способностью к локальному разрушению мембраны при контакте с фагосомами.

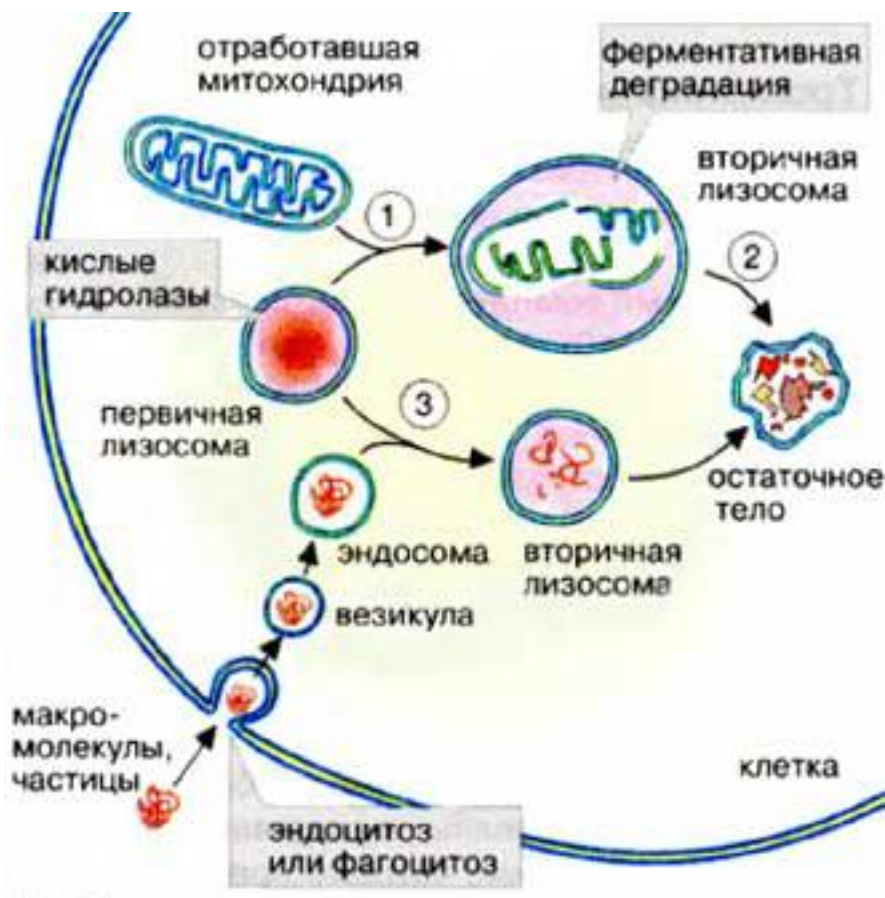


Рис. 18. Схема гетерофагического и аутофагического цикла в эукариотической клетке [7]

Выделяют, по крайней мере, четыре вида лизосом: первичные, вторичные, телолизосомы и аутофагосомы. *Первичная лизосома* - образуется на трансполюсе комплекса Гольджи, ещё не встретившая субстрата для расщепления.

Вторичная лизосома - имеет гетерогенную внутреннюю структуру, сливается с фагосомой и является внутриклеточной пищеварительной вакуолью.

Телолизосома или остаточное тельце - вторичная лизосома с накопленными неперевааренными продуктами, имеет плотное содержимое, содержит небольшое количество гидролитических ферментов.

Аутофагосома - лизосома, выполняющая внутриклеточное переваривание отдельных органоидов, участков цитоплазмы, молекул, утративших своё значение в результате гибели или старения.

Функции лизосом:

1. Выполнение внутриклеточного переваривания (*рис. 18*).

Вакуоли растительных клеток. Центральные вакуоли отделены от цитоплазмы мембраной, сходной по толщине с плазмалеммой, – тонопластом. Полость вакуоли заполнена клеточным соком. Это водный раствор, в который входят различные неорганические соли, сахара, органические кислоты и их соли, и другие низкомолекулярные соединения, а также некоторые высокомолекулярные вещества (например, белки).

Функции центральной вакуоли:

1. Поддержание тургорного давления клеток. Соответствующая молекулярная концентрация сока вакуолей и полупроницаемые свойства как ее мембраны, тонопласта, так и плазмалеммы способствуют тому, что вакуоль функционирует в качестве осмометра и придает клетке необходимую прочность и напряженность.

2. Осуществление процесса экскреции. Тонопласт, как плазматическая мембрана, обладает свойством полупроницаемости и через него осуществляется активный транспорт водорастворимых метаболитов. Нерастворимые в воде органические компоненты могут превращаться в растворимые глюкозиды, соединяясь с молекулами сахаров. В вакуоли накапливаются алкалоиды, полифенолы, глюкозиды, фосфаты калия, натрия, кальция, могут накапливаться соли органических кислот (оксалаты, цитраты и др.). Это придает вакуолярному соку отчетливую кислую реакцию (рН от 2 до 5).

3. Запас питательных веществ. Сахара в вакуолях содержатся в виде растворов, встречаются и резервные полисахариды типа инулина. В вакуолях происходит запасание белков, что характерно для семян.

4. Участие в гидролизе некоторых клеточных компонентов. Например, лизосомными свойствами обладают вакуоли дрожжей, в которых содержатся гидролитические ферменты.

Сферосомы. Это мембранные пузырьки, встречающиеся в клетках растений, образуются из элементов ЭПР. Рост сферосом и перестройка их содержимого связаны с накоплением в них липидов. Кроме жиров в составе сферосом содержатся белки и среди них фермент липаза, расщепляющая липиды.

Пероксисомы (микротельца). Открыты в начале 60-х г 20 века Де Дювом. Это небольшие вакуоли (0,3-1,5 мкм), имеющие одинарную мембрану. У млекопитающих обнаружены две формы пероксисом – универсальные мелкие (0,15-0,25 мкм) и более крупные, характерными в основном для клеток печени и почек, (0,5 мкм) пузырьки. Мембрана пероксисом образуется из мембран гладкого ЭПР. В пероксисомах обнаруживаются следующие ферменты: (оксидазы, уратоксидаза, оксидаза d-аминокислот) окислительного дезаминирования аминокислот, при работе которых образуется перекись водорода (H₂O₂) и каталаза, разрушающая ее. В пероксисомах печени каталаза составляет до 40% всех ферментов. За счет наличия уникальной

ферментативной системы пероксисомы регулируют окислительно-восстановительное равновесие внутри клетки и концентрацию активных форм кислорода. У животных и некоторых растений (проростки клеверины) пероксисомы играют важную роль при превращении жиров в углеводы.

Их относят к саморепродуцирующимся органоидам, хотя они не содержат никаких нуклеиновых кислот и все белки, из которых они состоят, кодируются ядерными генами. Перед делением в пероксисоме происходит накопление специфических белков и липидов, которые синтезируются в цитозоле, благодаря чему происходит ее общий рост, а затем деление на две.

Функции пероксисом:

1. Разрушение перекиси водорода, чрезвычайно токсичного для клетки соединения.
2. Участие в метаболизме жиров.

Практическая часть

1. С помощью альбома электронных микрофотографий рассмотреть и зарисовать строение шероховатого (рис. 6) и гладкого (рис. 7) эндоплазматического ретикулума.

2. Рассмотреть и зарисовать готовый микропрепарат: *²Аппарат Гольджи в нервных клетках спинального ганглия котёнка²* (рис. 19).

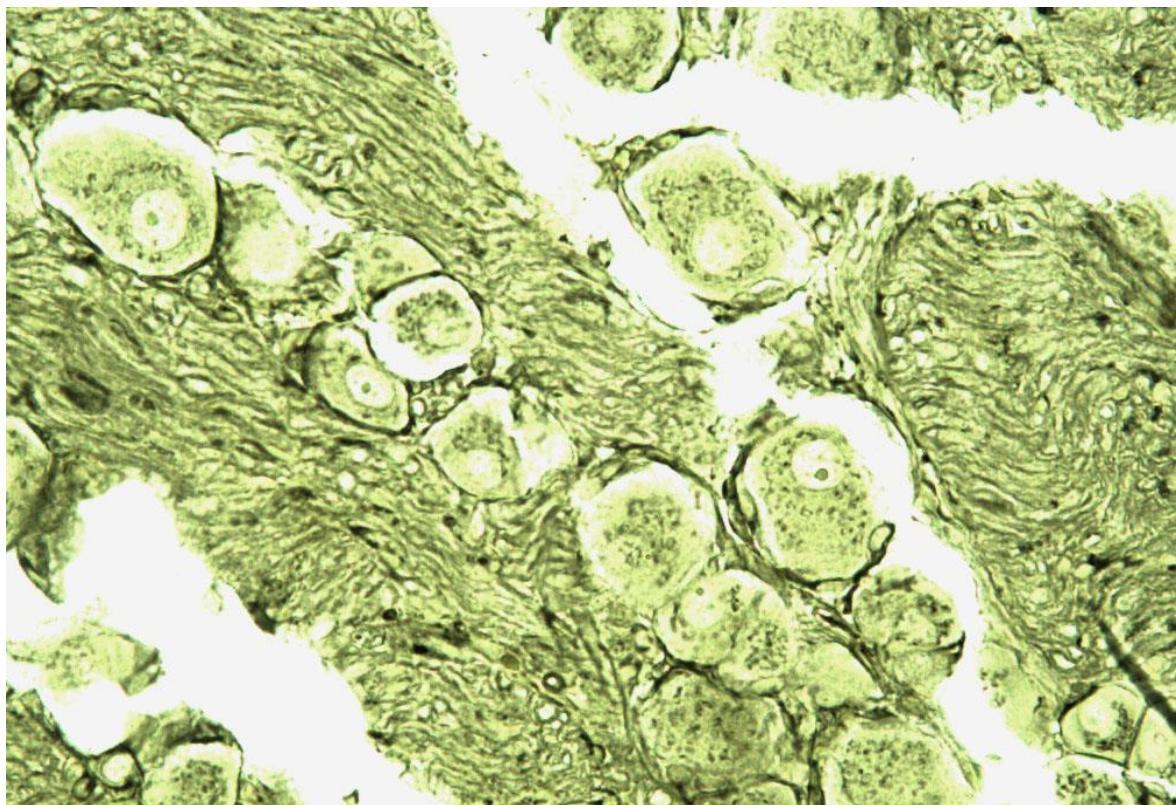


Рис. 19. Комплекс Гольджи в нервных клетках спинального ганглия котенка. Цифровое изображение препарата выполнено камерой Vision CAM для

тринокулярного микроскопа Meiji Techno с использованием интегрированного адаптера и разъема C-mount (ув. x300)

Описание микропрепарата. В спинальных ганглиях локализуются чувствительные нервные клетки. В результате фиксации и импрегнации осмиевой кислотой при малом увеличении микроскопа видно, что нервные клетки выглядят по-разному. Надо найти такие нейроны, в которых уже при малом увеличении хорошо видны и ядро, и светлая цитоплазма, не обращая внимания на скопления мелких округлых образований, которые представляют собой поперечные срезы аксонов. В некоторых клетках на светлом фоне цитоплазмы выделяется тёмная петлистая сеть, локализуемая вблизи ядра. Она состоит из изогнутых, сливающихся друг с другом нитей - это комплекс Гольджи. В других клетках комплекс Гольджи не образует сплошной сети, а состоит из отдельных палочек, фрагментов разнообразной формы, не связанных друг с другом. Такие отдельные тёмные структуры бывают разбросаны по всей цитоплазме клеток. Обратите внимание на форму клеток, светлые, почти бесструктурные ядра, на фоне которых чётко выделяются ядрышки серо-жёлтого цвета.

Рассмотреть и зарисовать препарат при увеличении x 10 и x 40.

3. С помощью альбома электронных микрофотографий рассмотреть и зарисовать строение комплекса Гольджи (рис. 8, рис. 9), первичных, вторичных лизосом и аутолизосом (рис. 10).

Контрольные вопросы

1. Раскройте особенности строения и функции ЭПР.
2. В чём заключается биологическая роль комплекса Гольджи в жизнедеятельности клетки?
3. Какова биологическая роль лизосом в жизнедеятельности клетки?
4. Структурная и функциональная взаимосвязь всех компартментов вакуолярной системы.

ЗАНЯТИЕ №6

ТЕМА: Строение и функции энергообразующих органоидов

Цель: Изучить строение и функции митохондрий и хлоропластов.

Задачи:

1. На готовых микропрепаратах: «Хондриосомы в клетках печени амфибий», «Хондриосомы в клетках канальцев почки амфибий» изучить строение и место локализации митохондрий в клетках.

2. С помощью альбома электронных микрофотографий изучить и зарисовать внутреннее строение митохондрий (альбом электронных

микрофотографий, рис. 4) и строение грибовидного тельца (альбом электронных микрофотографий, рис. 5).

Материалы и оборудование

Микроскопы Meiji Techno серии МТ 4000, руководство пользователя, альбом электронных микрофотографий, готовые микропрепараты.

Теоретическая часть

Энергетический обмен (катаболизм, диссимиляция) – совокупность реакций расщепления высокомолекулярных веществ, протекающих с выделением энергии. Выделяющаяся энергия фиксируется в макроэргических связях в молекулах АТФ, которые являются универсальным источником энергии.

Органоидами энергетического обмена в животных клетках являются *митохондрии*, в растительных – *пластиды* (хлоропласты), в фотосинтезирующих и аэробных бактериях – *сопрягающие мембраны*.

Митохондрии (греч. *mitos*–нить и *chondros* - зерно) – внутриклеточные органеллы, оболочка которых состоит из двух мембран. Открыты Альтманом в 1848 г. Независимо от их величины или формы имеют гладкую наружную мембрану, отделяющую митохондрию от гиалоплазмы; межмембранное пространство шириной около 10-20 нм; внутреннюю мембрану (толщиной около 7 нм) ограничивающую собственно внутреннее содержимое митохондрии – матрикс.

Характерной чертой внутренней мембраны митохондрий является их способность образовывать многочисленные впячивания внутрь митохондрий – кристы (**рис. 20**). Часто кристы могут ветвиться или образовывать пальцевидные отростки, изгибаться и не иметь выраженной ориентации. У простейших, одноклеточных водорослей, в некоторых клетках высших растений и животных выросты внутренней мембраны имеют вид трубок (трубчатые кристы). Матрикс митохондрий имеет гомогенное строение, в нем располагаются кольцевые молекулы ДНК, митохондриальные рибосомы, крупные (20-40 нм) плотные гранулы солей магния и кальция.

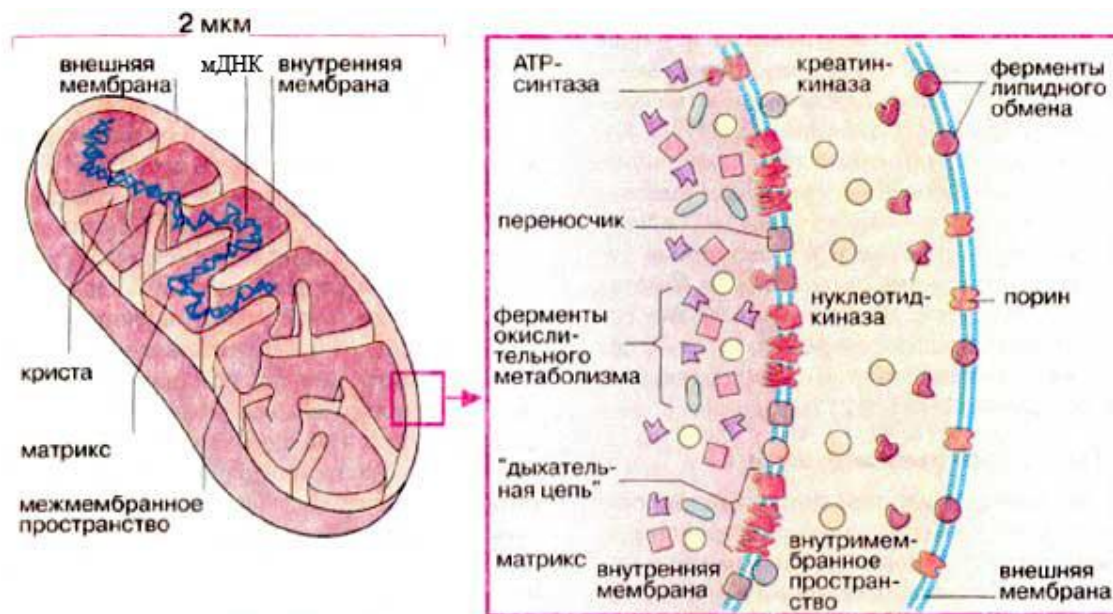


Рис. 20. Схема ультраструктуры митохондрии [7]

В глюкозе количество потенциальной энергии, заключенной в связях между атомами С, Н и О, составляет около 680 ккал на 1 моль (т.е. на 180 г глюкозы); эта энергия освобождается при полном окислении глюкозы. Освобождение энергии идет в виде ступенчатого процесса, управляемого целым рядом окислительных ферментов, и связано с переходом энергии в макроэнергетическую связь в молекуле АТФ (табл. 5.1).

Таблица 5.1

Этапы энергетического обмена

Этапы	Особенности протекания этапа	Энергетическая ценность
Подготовительный	Молекулы сложных органических соединений расщепляются под действием ферментов на более мелкие: белки – до аминокислот, углеводы – до моносахаридов, нуклеиновые кислоты – до нуклеотидов, жиры – на глицерин и жирные кислоты.	Небольшое количество энергии, рассеивающееся в виде тепла.

<p>Бескислородный, анаэробное дыхание (неполное окисление)</p>	<p>Многоступенчатый процесс превращения глюкозы ($C_6H_{12}O_6$) в две трёхуглеродные молекулы пировиноградной кислоты (ПВК, пируват, $C_3H_4O_3$): $C_6H_{12}O_6 + 2ADP + 2H_3PO_4 \rightarrow 2C_3H_4O_3 + 4H^+ + 2ATP + 2H_2O$ У дрожжей или в клетках растений при недостатке кислорода в дальнейшем происходит спиртовое брожение – ПВК восстанавливается до этилового спирта: $CH_3COCOON \rightarrow CO_2 + CH_3CONH$, уксусный альдегид $CH_3CONH + НАД \cdot H \rightarrow C_2H_5OH + НАД^+$ Суммарная реакция спиртового брожения: $C_6H_{12}O_6 + 2H_3PO_4 + 2ADP \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 2ATP + 2H_2O$ этанол В клетках животных, испытывающих недостаток кислорода, или у некоторых бактерий происходит молочнокислое брожение, при котором пируват восстанавливается до молочной кислоты: $CH_3COCOON + НАД \cdot H \rightarrow C_3H_6O_3 + НАД^+$ Суммарная реакция молочнокислого брожения: $C_6H_{12}O_6 + 2H_3PO_4 + 2ADP \rightarrow 2C_3H_6O_3 + 2ATP + 2H_2O$</p>	<p>Выделяется 200 кДж/моль. 60% этой энергии рассеивается в виде теплоты, остальные 40% используются на синтез АТФ.</p>
<p>Кислородный, аэробный (полное окисление), клеточное дыхание</p>	<p>Цепь реакций, контролируемых ферментами внутренней мембраны и матрикса митохондрий. В матриксе митохондрий ПВК взаимодействует с ферментами и образует: 1) Диоксид углерода, который выводится из клетки; 2) Атомы водорода, которые в составе переносчиков направляются к внутренней мембране; 3) Ацетил кофермент А (ацетил – коА), который вовлекается в цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса). Суммарная реакция гликолиза и цикла Кребса: $C_6H_{12}O_6 + 6H_2O \rightarrow 6CO_2 + 4ATP + 12(НАД \cdot H_2 + ФАД \cdot H_2)$</p> <p>На внутренней мембране митохондрий локализуется электронно-транспортная (дыхательная) цепь переноса электронов. В результате деятельности ферментов внутренняя мембрана изнутри заряжается отрицательно (за счёт O_2^-), а снаружи – положительно (за счёт H^+). Во внутреннюю мембрану встроены молекулы фермента АТФ-синтетазы, в ножке которых располагается протонный канал. При разности потенциалов в 200 мВ H^+ проходят через канал АТФ-синтетазы в матрикс, при этом энергия транспортирующихся ионов H^+ используется для фосфорилирования АТФ из АДФ: $12H_2 + 6O_2 \xrightarrow{\text{дыхат-я цепь}} 12H_2O + 34ATP$</p> <p>Синтез АТФ в процессе клеточного дыхания тесно сопряжён с транспортом ионов по цепи переноса, и весь процесс носит</p>	<p>В ходе цикла Кребса из одной молекулы ацетил – коА образуется одна молекула АТФ. Энергетический выход окисления одной молекулы глюкозы в цикле Кребса – 2 молекулы АТФ.</p> <p>Энергетический выход окисления одной молекулы глюкозы в дыхательной цепи – 34 молекулы</p>

	<p>название <i>окислительное фосфорилирование</i>.</p> <p>Суммарная реакция полного окисления глюкозы: $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O + 38ATP$</p>	<p>АТФ.</p> <p>При полном окислении одной молекулы глюкозы образуется 38 молекул АТФ.</p> <p>КПД окислительного фосфорилирования – 55%.</p>
--	--	---

В процессе гликолиза происходит неполное окисление субстрата. Образовавшиеся в результате гликолиза триозы, и в первую очередь пировиноградная кислота ($C_3H_4O_3$), вовлекаются в дальнейшее окисление, происходящее уже в матриксе митохондрий (цикл Кребса или цикл трикарбоновых кислот). В цикле идет окисление молекул, перенос электронов на акцепторы и выделение CO_2 . Остальные события, связанные с дальнейшим переносом электронов и синтезом АТФ связаны с внутренней сопрягающей митохондриальной мембраной. Во внутренних мембранах митохондрий локализованы ферменты как дыхательной цепи, так и ферменты синтеза АТФ. Дыхательная цепь представляет собой ряд белковых комплексов, встроенных во внутреннюю митохондриальную мембрану. Существуют три главных ферментных комплекса. Первый, НАДН-дегидрогеназный комплекс принимает электроны от НАДН и переносит их во второй комплекс, комплекс в-с₁, который в свою очередь, переносит их на цитохромоксидазный комплекс, а он их передает на кислород, в результате чего образуется вода. На этом окисление заканчивается.

Во внутренних митохондриальных мембранах на поверхности мембран, смотрящих в матрикс, располагаются крупные белковые комплексы (диаметром 8-9 нм), состоящие из 9 субъединиц, АТФ-синтетазы, так называемые “грибовидные” тельца. Выделяющаяся при транспорте электронов энергия запасается в виде градиента протонов на мембране. При этом на внешней поверхности внутренней мембраны митохондрий возникает повышенная концентрация положительно заряженных ионов водорода. При достижении определенной разности потенциалов (200 мВ) белковый комплекс АТФ-синтетазы начинает транспортировать протоны обратно в матрикс, при этом превращает одну форму энергии в другую: образует АТФ из АДФ и неорганического фосфата.

Дыхательная цепь – это главная система превращения энергии в митохондриях. Здесь происходит последовательное окисление и восстановление элементов дыхательной цепи, в результате чего высвобождается небольшими

порциями энергия. За счет этой энергии из АДФ и фосфата образуется АТФ. Поэтому говорят, что окисление (перенос электронов) сопряжено с фосфорилированием ($\text{АДФ} + \text{Фн} \rightarrow \text{АТФ}$). Пока происходит окисление субстратов, пока происходит перекачка протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану – идет сопряженный с этим синтез АТФ, т.е. происходит окислительное фосфорилирование.

Функции митохондрий:

1. Синтез АТФ, происходящий в результате процессов окисления органических субстратов и фосфорилирования АДФ.

2. Депо ионов Ca^{+2} .

Пластиды – мембранные органоиды, встречающиеся у фотосинтезирующих эукариотических организмов (высшие растения, низшие водоросли, некоторые одноклеточные организмы). Подобно митохондриям, пластиды окружены двумя мембранами, в их матриксе имеется собственная геномная система, функции пластид связаны с энергообеспечением клетки, идущим на нужды фотосинтеза. У высших растений найден целый набор различных пластид (хлоропласт, лейкопласт, амилопласт, хромопласт), представляющих собой ряд взаимных превращений одного вида пластиды в другой. Основной структурой, которая осуществляет фотосинтетические процессы, является хлоропласт. Это зелёные пластинки диаметром 3-4 мкм овальной формы. Хлоропласты представляют собой структуры, ограниченные двумя мембранами – внутренней и внешней. Внешняя мембрана, как и внутренняя, имеет толщину около 7 мкм, они отделены друг от друга межмембранным пространством около 20-30 нм. Внутренняя мембрана хлоропластов отделяет строму пластиды, аналогичную матриксу митохондрий. В строме зрелого хлоропласта высших растений видны два типа внутренних мембран. Это – мембраны, образующие плоские, протяженные ламеллы и мембраны тилакоидов (*рис. 21*).

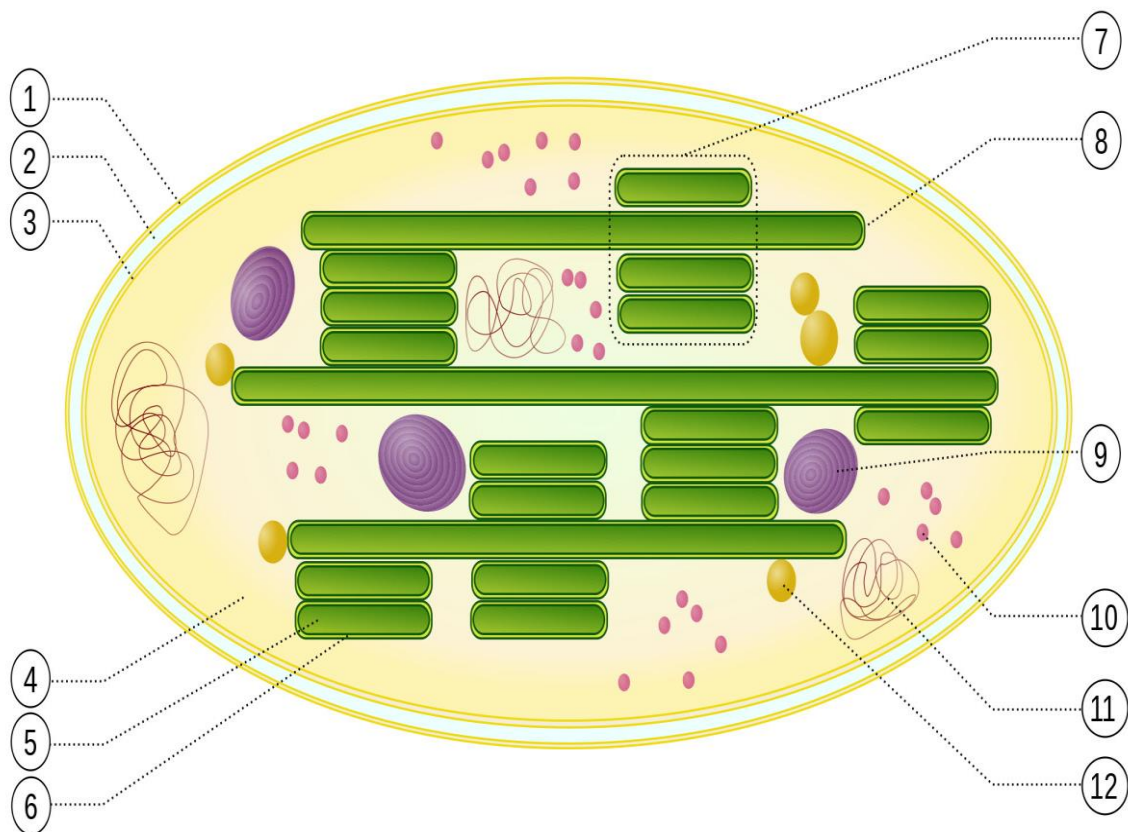


Рис. 21. Строение хлоропласта [16]:

1 – наружная мембрана; 2 – межмембранное пространство; 3 – внутренняя мембрана; 4 – строма; 5 – тилакоидное пространство (люмен); 6 – тилакоидная мембрана; 7 – грана; 8 – ламелла; 9 – крахмальные зерна; 10 – рибосомы; 11 – ДНК хлоропласта; 12 – осмиофильные гранулы (капли жира)

Ламеллы стромы (толщиной около 20 мкм) представляют собой плоские полые мешки или же имеют вид сети из разветвленных и связанных друг с другом каналов, располагающихся в одной плоскости. Обычно ламеллы стромы внутри хлоропласта лежат параллельно друг другу и не образуют связей между собой.

Мембраны тилакоидов представляют собой плоские замкнутые мембранные мешки, имеющие форму диска. Величина межмембранного пространства у них также около 20-30 нм. Тилакоиды образуют стопки, называемые гранами. Тилакоиды в гране сближены друг с другом так, что внешние слои их мембран тесно соединяются; в месте соединения мембран тилакоидов образуется плотный слой толщиной около 2 нм. В состав граны кроме замкнутых камер тилакоидов обычно входят и участки ламелл, которые в местах контакта их мембран с мембранами тилакоидов тоже образуют плотные 2-нм слои. В матриксе (строме) хлоропластов обнаруживаются молекулы ДНК, рибосомы; там же происходит первичное отложение запасного полисахарида, крахмала, в виде крахмальных зерен.

При помощи хлорофилла зеленые растения поглощают энергию солнечного света и превращают ее в химическую энергию. Поглощение света с определенной длиной волны приводит к изменению в структуре молекулы

хлорофилла, она переходит при этом в возбужденное, активированное состояние. Освобождающаяся энергия активированного хлорофилла через ряд промежуточных этапов передается определенным синтетическим процессам, приводящим к синтезу АТФ и к восстановлению акцептора электронов НАДФ (никотинамидадениндинуклеотид фосфат) до НАДФ-Н, которые тратятся на реакции связывания CO_2 и синтез сахаров.

Суммарная реакция фотосинтеза:



Биохимические исследования показали, что процесс фотосинтеза представляет собой сложную цепь событий, заключающую в себе две фазы: световую и темновую. Первая, протекающая только на свету, связана с поглощением света хлорофиллами и с проведением фотохимической реакции (реакция Хилла). Во второй фазе, которая может идти в темноте, происходит фиксация и восстановление CO_2 , приводящие к синтезу углеводов.

В результате световой фазы происходит фотофосфорилирование, синтез АТФ из АДФ и фосфата с использованием цепи переноса электронов, а также восстановление кофермента НАДФ в НАДФ-Н, происходящего при гидролизе и ионизации воды. В этой фазе фотосинтеза энергия солнечного света возбуждает электроны в молекулах хлорофилла, которые расположены в мембранах тилакоидов. Эти возбужденные электроны переносятся по компонентам окислительной цепи в тилакоидной мембране, подобно тому, как электроны транспортируются по дыхательной цепи в мембране митохондрий. Энергия, освобождающаяся при таком переносе электронов, используется для перекачивания протонов через тилакоидную мембрану внутрь тилакоидов, что приводит к возрастанию разности потенциалов между стромой и пространством внутри тилакоида. Также как и в мембранах крист митохондрий, в мембраны тилакоидов встроены молекулярные комплексы АТФ-синтетазы, через ножки которых протоны транспортируются обратно в строму хлоропласта, а в головке синтезируется АТФ.

Таким образом, в результате световой фазы происходит синтез АТФ и восстановление НАДФ.

В темновой (независящей от потока фотонов) стадии фотосинтеза за счет восстановленного НАДФ и энергии АТФ происходит связывание атмосферного CO_2 , что приводит к образованию углеводов. Этот процесс фиксации CO_2 и образования углеводов состоит из многих этапов, в которых участвует большое число ферментов (цикл Кальвина). Процесс восстановления CO_2 начинается с его присоединения к рибулозодифосфату, углеводу, состоящему из 5 атомов углерода, с образованием короткоживущего C_6 -соединения, которое сразу распадается на два C_3 -соединения, на две молекулы глицерид-3-фосфата.

Дальнейшие реакции превращения глицерид-3-фосфата приводят к синтезу различных гексоз и пентоз, к регенерации рибулозодифосфата и к его новому вовлечению в цикл реакций связывания CO_2 . В конечном счете в хлоропласте из шести молекул CO_2 образуется одна молекула гексозы, для этого

процесса требуется 12 молекул НАДФ•Н₂ и 18 молекул АТФ, поступающих из световых реакций фотосинтеза. Образовавшийся в результате темновой реакции фруктоза-6-фосфат дает начало сахарам, полисахаридам (крахмал) и липидам. В строме хлоропластов, кроме того, из части глицерид-3-фосфата образуются жирные кислоты, аминокислоты и крахмал. Синтез сахарозы завершается в цитоплазме.

В строме хлоропластов происходит восстановление нитритов до аммиака, за счет энергии электронов, активированных светом; в растениях этот аммиак служит источником азота при синтезе аминокислот и нуклеотидов.

Наличие в хлоропластах третьего внутреннего компартмента – люмена (тилакоидного пространства) на первый взгляд сильно отличает их от митохондрий. Однако, геометрия перемещения протонов в этих двух органеллах удивительно сходна. В хлоропластах протоны перекачиваются из стромы (рН 8,0) в люмен (рН 5,0), создавая градиент в 3,0 – 3,5 единицы рН. Это создаёт на тилакоидной мембране протондвижущую силу в 200 мВ, почти целиком, обусловленную градиентом рН, а не мембранным потенциалом (как это имеет место в митохондриях), за счёт которой АТФ-синтетаза осуществляет синтез АТФ. Головка грибовидного тела, где располагается АТФ-синтетаза, находится в митохондриях в матриксе, а в хлоропластах в строме, где рН 8,0.

По сравнению с дыхательной цепью митохондрий, в тилакоидной мембране электроны (e⁻) движутся в противоположном направлении. В дыхательной цепи митохондрий электроны переносятся с НАД•Н на кислород с образованием Н₂О и выделением энергии, а при фотосинтезе электроны переносятся с Н₂О на НАДФ⁺ с затратами энергии.

Функции хлоропластов:

1. Фотосинтетические процессы.

Практическая часть

1. На готовом микропрепарате: «Хондриосомы в клетках печени амфибий» при малом и большом увеличениях «Хондриосомы в клетках канальцев почки амфибий» изучить строение и место локализации митохондрий в клетках.

Описание микропрепарата: «Хондриосомы в клетках печени амфибий» (рис. 22).

При малом увеличении микроскопа в печени видны крупные клетки, имеющие многоугольную форму и располагающиеся не очень чётко выраженными рядами. В каждой клетке имеется 1–2 ядра. Между рядами печёночных клеток встречаются кровеносные капилляры с тонкими стенками, выстланными одним рядом веретёновидных клеток. В цитоплазме на желтоватом фоне видны красно-розовые митохондрии, имеющие круглую форму. Митохондрии располагаются вокруг ядра, на некотором расстоянии от

него, так что остаётся узкая прослойка, не заполненная митохондриями. В отдельных местах цитоплазмы митохондрии располагаются неравномерно, нередко образуя скопления или выстраиваясь в короткие цепочки из нескольких штук.

Рассмотреть и зарисовать препарат на малом и большом увеличениях в рабочем альбоме, на рисунке сделать обозначения.

2. На готовом микропрепарате: «Хондриосомы в клетках канальцев почки амфибий» при малом и большом увеличениях изучить строение и место локализации митохондрий в клетках.

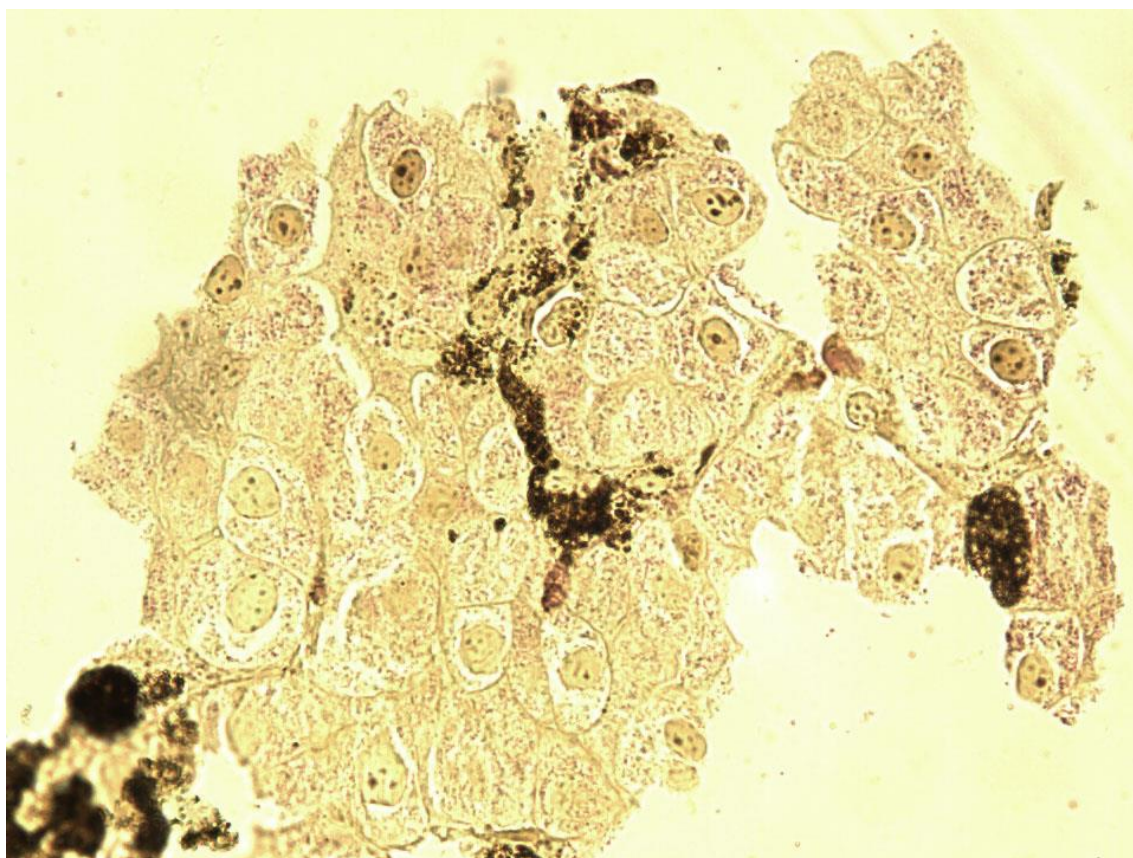


Рис. 22. Скопление митохондрий в клетках печени амфибий. Цифровое изображение препарата выполнено камерой Vision CAM для тринокулярного микроскопа Meiji Techno с использованием интегрированного адаптера и разъема C-mount (ув. x 600)

Описание микропрепарата: «Хондриосомы в клетках канальцев почек амфибий» (рис. 23).

На препарате при малом увеличении следует разобраться в основных структурных элементах и найти клетки канальца. Базальная часть цитоплазмы клеток канальцев почки содержит митохондрии. Они заполняют внутреннее содержимое, ориентируясь вдоль длинной оси клеток. В апикальной зоне цитоплазмы клеток митохондрий меньше, они не имеют чёткой ориентации.

Рассмотреть и зарисовать препарат в рабочем альбоме, на рисунке сделать обозначения.

2. С помощью альбома электронных микрофотографий изучить и зарисовать внутреннее строение митохондрий (рис. 4) и строение грибовидного тельца (рис. 5). Обозначить: наружную мембрану, протонный резервуар, митохондриальный матрикс, кристы, гранулы, рибосомы, головку и ножку грибовидного тельца.

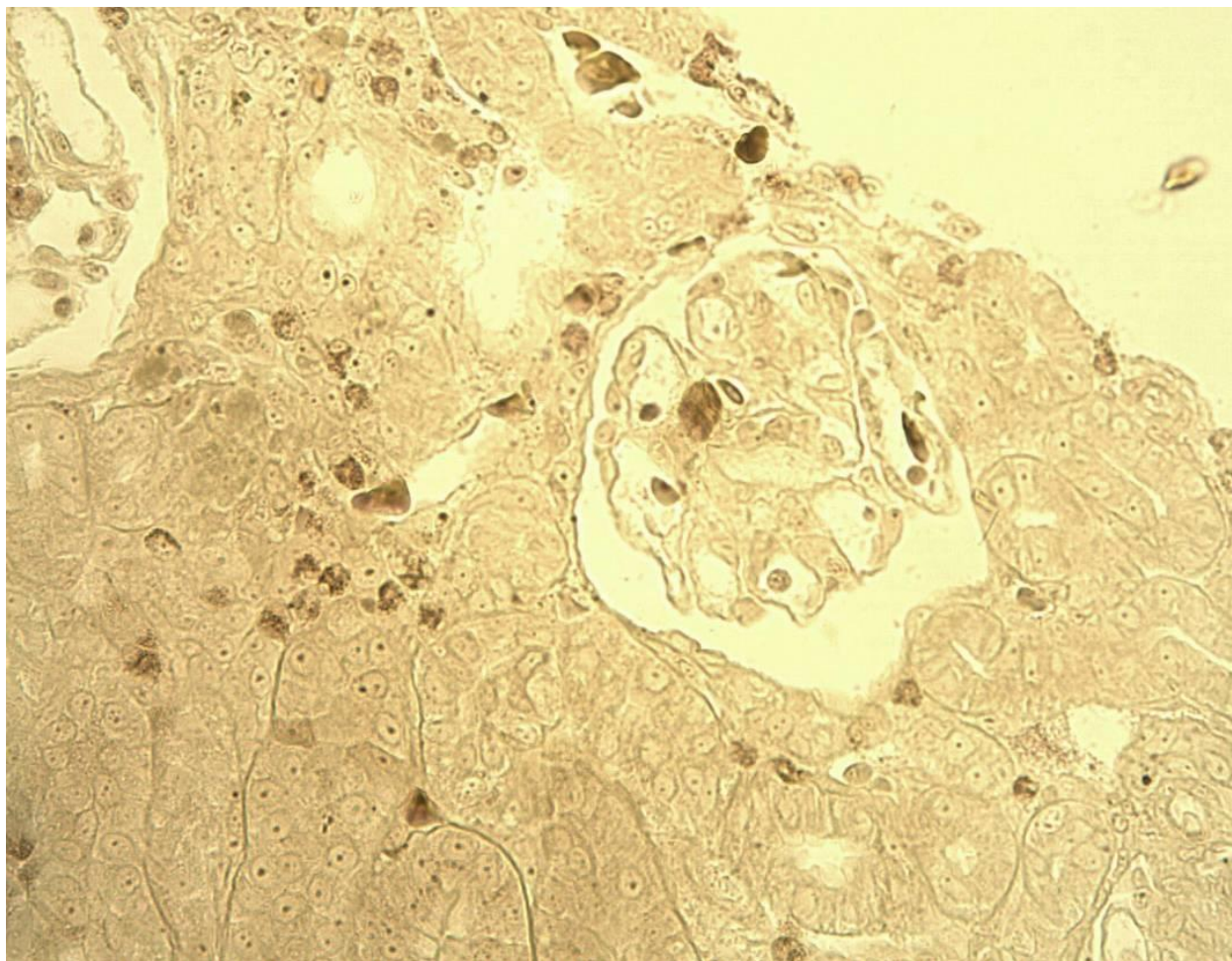


Рис. 23. Хондриосомы в канальцах почки амфибий. Цифровое изображение препарата выполнено камерой Vision CAM для тринокулярного микроскопа Meiji Techno с использованием интегрированного адаптера и разъема C-mount (ув. x 600)

Контрольные вопросы

1. Морфология, локализация и структура митохондрий.
2. Локализация в мембранах митохондрий основных звеньев окислительного фосфорилирования.
3. Митохондрия как полуавтономный органоид.
4. Хлоропласты как энергообразующие органоиды растительных клеток.
5. Локализация в тилакоидных мембранах хлоропластов ферментных систем фотоокислительного фосфорилирования.

ЗАНЯТИЕ № 7

ТЕМА: Строение и функции клеточного центра (центросомы)

Цель: Изучить строение и функции центриоли, диплосомы и центросомы в животных эукариотических клетках

Задачи:

1. С помощью альбома электронных микрофотографий рассмотреть и зарисовать строение центриоли (альбом электронных микрофотографий, рис. 12), диплосомы (альбом электронных микрофотографий, рис.11) в животных клетках.
2. Изучить строение центросомы и на готовом микропрепарате: «Центросомы и ахроматиновое веретено митоза яйцеклетки аскариды», зарисовать препарат.

Материалы и оборудование

Микроскопы Meiji Techno серии МТ 4000, руководство пользователя, альбом электронных микрофотографий, готовые микропрепараты.

Теоретическая часть

Центросома (клеточный центр) был обнаружен и описан Флемингом (1875) и Бенеденом (1876). Он располагается в геометрическом центре клетки. Центросомы характерны и обязательны для клеток животных, их нет у высших растений, у низших грибов и некоторых простейших. В состав центросомы входит пара центриолей, окруженных перичентриолярным материалом. Центриоли в паре не одинаковы, одна них (зрелая, или материнская), в отличие от второй (незрелой, или дочерней), несет на себе дополнительные структуры.

Основу строения центриолей составляют расположенные по окружности девять триплетов микротрубочек, образующие таким образом полый цилиндр (*рис. 24*). Его ширина около 0,15 мкм, а длина такого цилиндра 0,3-0,5 мкм. Первая микротрубочка триплета (А-микротрубочка) имеет диаметр около 25 нм и толщину стенки 5 нм, которая состоит из 13 глобулярных субъединиц. Вторая и третья (В и С) микротрубочки отличаются от А-микротрубочки тем, что они являются неполными, содержат 11 субъединиц и вплотную примыкают к своим

соседям. Каждый триплет располагается к радиусу такого цилиндра под углом около 40° . Кроме микротрубочек в состав центриоли входит ряд дополнительных структур. От А-микротрубочки отходят выросты, образованные белком динеином один из которых (внешний) направлен к С-микротрубочке соседнего триплета, а другой (внутренний) – к центру цилиндра. От каждого триплета к центру центриоли располагаются радиальные структуры, состоящие из белка нексина. Систему микротрубочек центриоли обычно описывают формулой $(9 + 0)$, или $(9 \times 3) + 0$, подчеркивая отсутствие микротрубочек в её центральной части.

Обычно в интерфазных клетках всегда присутствуют две центриоли, располагающиеся рядом друг с другом, образуя дуплет центриолей или диплосому (от греч. *diploos* – двойной, *soma* – тело) (термин предложил Монтгомери, 1904). В диплосоме материнская и дочерняя центриоли располагаются под прямым углом по отношению друг к другу. В дистальном участке материнской центриоли располагается аморфный материал в виде выростов или шпор – это придатки. Их нет на дочерней центриоли. Центральная часть цилиндра дочерней центриоли имеет центральную “втулку” диаметром около 25 нм и 9 спиц, направленных по одной к А-микротрубочке каждого из триплетов. Такие структуры внутри центриоли расположены в одном из её концов, проксимальном (обращенном внутрь клетки), что делает строение цилиндра центриоли полярным. На дистальном (обращенном к внешней поверхности клетки) конце, центриоли внутри её нет таких структур. Объем, занимаемый внутри центриоли втулкой со спицами, может составлять у разных клеток от $3/4$ до $1/5$ длины центриоли. У некоторых видов втулка отсутствует или заменена скоплением аморфного материала. Торцы центриолярного цилиндра, кроме системы втулки и спиц на проксимальном конце, ничем не закрыты. Созревание центриоли занимает более одного клеточного цикла; в течение первого цикла формирующийся цилиндр, называемый в это время процентриолью («ось со спицами» или «тележное колесо») дорастает до нормального размера. Процентриоль всегда образуется ближе к проксимальному концу.

Вокруг каждой центриоли расположен бесструктурный, или тонковолокнистый матрикс. Часто около центриолей и в связи с ним можно обнаружить несколько дополнительных структур: сателлиты, фокусы схождения микротрубочек, исчерченные волокнистые корешки, дополнительные микротрубочки, образующие особую зону – центросферу вокруг центриоли.

Микротрубочки (также полярные биополимеры) в составе центриолярных триплетов всегда ориентированы одинаково — их минус конец находится на проксимальном конце центриолярного цилиндра, а плюс конец — на дистальном.

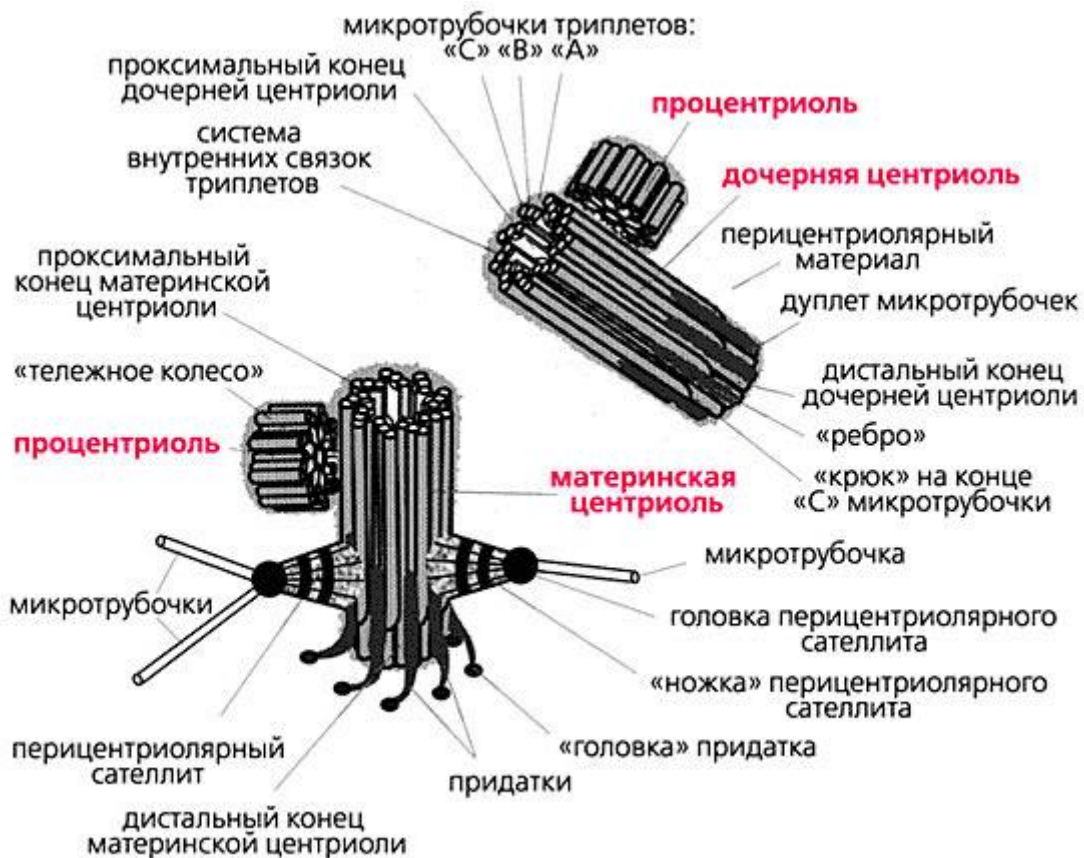


Рис. 24. Упрощенная схема строения centrosомы в интерфазных клетках млекопитающих в середине S-фазы клеточного цикла [13]

С поверхностью материнской центриоли связаны структуры двух типов. Во-первых, это перичентриолярные сателлиты, состоящие из конической ножки длиной около 0.1 мкм, на вершине которой находится округлая головка. Число их варьирует в норме от одной до четырех на центриоль, но может достигать девяти и более, либо они вообще отсутствуют в клетках некоторых типов. С головками перичентриолярных сателлитов часто связаны отходящие от centrosомы микротрубочки, причем от сателлитов их может отходить значительно больше, чем от стенки центриоли. Перичентриолярные сателлиты — структуры, характерные исключительно для интерфазной centrosомы. За несколько часов до митоза они исчезают, и их материал включается в состав так называемого митотического гало — аморфной тонкофибриллярной структуры диаметром около 1 мкм, окружающей centrosому в митозе.

Второй тип выростов на поверхности центриолярных цилиндров — придатки, они расположены на дистальном конце каждого триплета, а потому их количество всегда равно девяти. В отличие от перичентриолярных

сателлитов, придатки не исчезают при переходе клетки из интерфазы в митоз, и по их наличию всегда можно определить более зрелую материнскую центриоль.

У материнской центриоли есть еще одна особенность: она способна формировать рудиментарную (первичную) ресничку — структуру, которая выступает над поверхностью клетки. Первичные реснички появляются в клетках вскоре после завершения деления и исчезают перед митозом или в самом его начале.

Строение и активность centrosом меняются в зависимости от периода клеточного цикла. В митозе в обоих клеточных центрах находится по диплосоме. Материнская центриоль на всех стадиях митоза окружена довольно широкой (до 0,3 мкм) зоной тонких фибрилл – центриольным фибриллярным гало. От него радиально отходят микротрубочки. У дочерних центриолей нет ни гало, ни отходящих от центриолей микротрубочек. Зоны перицентриольного матрикса клеточных центров, являются центрами организации (полимеризации) микротрубочек – это первая форма активности клеточного центра.

К концу телофазы, после разделение клетки надвое и образования новых интерфазных ядер, происходит разрушение веретена деления, его микротрубочки деполимеризуются. Клеточные центры при этом меняют свою структуру. Материнская и дочерняя центриоли теряют взаимно перпендикулярное расположение и отходят друг от друга на небольшое (0,5-2 мкм) расстояние. Позднее в интерфазных клетках проявляется вторая форма активности клеточного центра – образование цитоплазматических микротрубочек. В интерфаза в начале G₁-периода на поверхности материнской центриоли возникают сателлиты, имеющие ножку и головку, от которой радиально отходят микротрубочки, которые начинают расти в длину и заполнять собой цитоплазму. Если клеткам запретить переходить в S-период, они могут существовать в фазе клеточного покоя (G₀-период). В это время материнская центриоль продолжает функционировать, как центр образования микротрубочек цитоскелета. Но одновременно она может проявить еще одну форму активности – образовать **ресничку**, вырост плазматической мембраны, заполненный аксонемой (осевой нитью), состоящей из девяти дуплетов микротрубочек. Эти микротрубочки отрастают, как от затравок, от А- и В-микротрубочек триплетов материнской центриоли в дистальной ее части (**рис. 25**). Это – третья форма активности центриолей как центров организации микротрубочек.

При наступлении S-периода (или в середине его) клеточный центр приступает к четвертой форме своей активности: происходит удвоение числа центриолей. В это время около каждой из разошедшихся в конце телофазы центриолей, материнской и дочерней, происходит закладка новых центриольных цилиндров – процентриолей. В районе проксимальных концов каждой центриоли перпендикулярно длинной оси закладывается сначала девять синглетов (одиночных) микротрубочек, затем они преобразуются в девять

дуплетов, а потом – в девять триплетов растущих микротрубочек новых центриольных цилиндров.

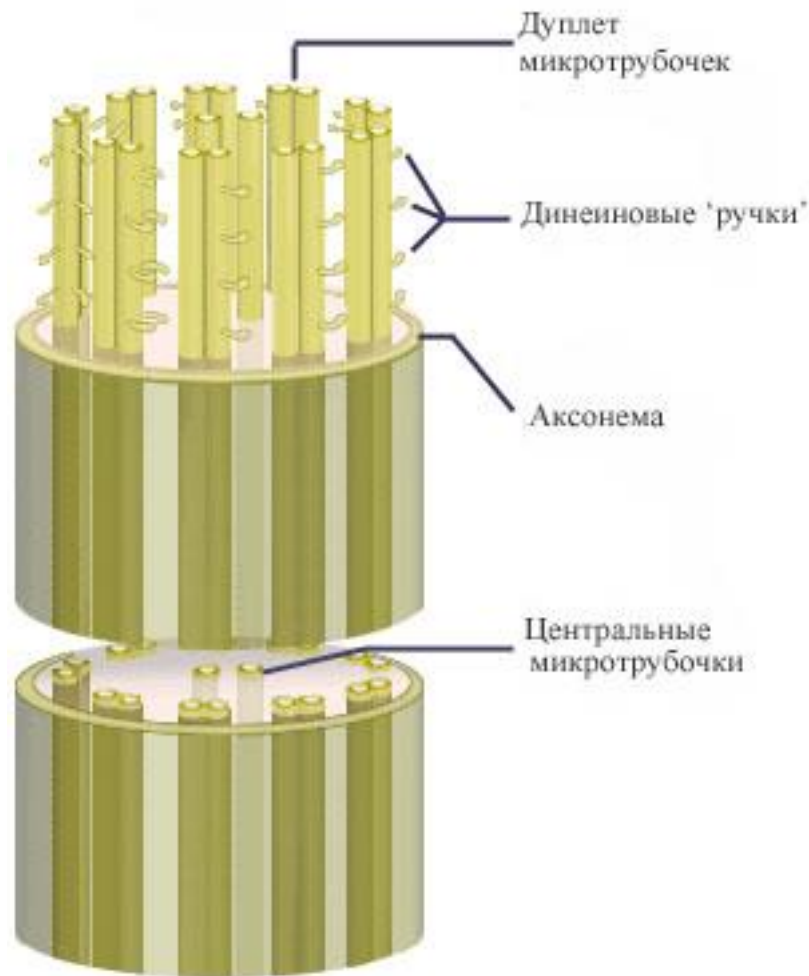


Рис. 25. Строение реснички [16]

Благодаря такому росту структур образуется сначала короткая дочерняя центриоль, которая затем дорастает до размера материнской. Этот способ увеличения числа центриолей был назван дубликацией. В S-периоде во время удвоения (дубликации) центриолей материнская продолжает проявлять вторую форму активности: она продолжает быть центром образования цитоплазматических микротрубочек.

После этого наступает следующий период клеточного цикла, постсинтетический (G_2 -период), когда в клетке начинается подготовка к очередному делению. В это время исчезают сателлиты на материнской диплосоме (так можно назвать старую материнскую центриоль с новой дочерней), а обе материнские центриоли в обеих диплосомах покрываются фибриллярным гало, от которого в профазе начинают отрастать митотические микротрубочки. Параллельно этому в цитоплазме происходит исчезновение микротрубочек, и клетка стремится приобрести шаровидную форму. Вся такая

последовательность событий повторяется от цикла к циклу у клеток, способных к длительному размножению. В большинстве случаев клетки организма находятся в G_0 -периоде, поэтому у них центриоль участвует в полимеризации цитоплазматических микротрубочек и в образовании аппарата движения – ресничек.

Практическая часть

1. С помощью альбома электронных микрофотографий рассмотреть и зарисовать строение центриоли (рис. 12), диплосомы (рис. 11) в животных клетках. На рисунках сделать обозначения.

2. Изучить строение centrosомы и на готовом микропрепарате: *«Centrosомы и ахроматиновое веретено митоза яйцеклетки аскариды» (рис. 26).*

Описание микропрепарата. На препарате при малом увеличении видны яйцевые клетки, лежащие в полости матки. Яйцеклетки окружены толстой оболочкой. Дробление blastомеров происходит внутри оболочки. Яйцеклетки находятся на разных стадиях развития. Рассматривают стадии двух, трех и четырех blastомеров.

Для наблюдения centrosом нужно выбрать такую яйцеклетку, где деление blastомеров находится на стадии метафазы, т.е. хромосомы располагаются в экваториальной плоскости и к каждой хромосоме (их две) прикрепляется нить ахроматинового веретена. Найдя такую яйцеклетку нужно перевести микроскоп на большое увеличение и рассмотреть внимательнее. Если blastомер повернут к наблюдателю одним из полюсов, то в центре его будет находиться centrosфера, включающая две центриоли (материнскую и дочернюю) с отходящей сферой ахроматиновых волокон. Если blastомер наблюдается с экватора, то в поле зрения будут находиться два клеточных центра (у полюсов клетки) и хромосомы, располагающиеся в экваториальной плоскости. Видно, что к хромосомам подходят тонкие нити веретена, благодаря которым, на следующей стадии деления (анафазе) дочерние хроматиды будут разведены к разным полюсам клетки. Между яйцеклетками видны многочисленные овальные тела синего цвета – это спермии, участвовавшие в оплодотворении яйцеклеток.

В метафазе хорошо сформировано веретено, образующее митотический аппарат вместе с участком близлежащей миксоплазмы. Митотический аппарат прокрашивается более темно, чем миксоплазма клетки. Нити веретена находятся у полюсов, веретено имеет ромбовидную форму. Хромосомы расположены на экваторе так, что их концы направлены к периферии клетки, а centrosомы к центру. К centrosомам (кинетохорам) прикрепляются нити веретена. Все кинетохоры лежат в одной плоскости. Хромосомы не сливаются. Между ними проходят нити ахроматического веретена, не прикрепляющиеся к хромосомам и идущие от полюса к полюсу.

Препарат рассмотреть при малом и большом увеличении микроскопа, зарисовать в рабочем альбоме, сделать на рисунке четкие обозначения.

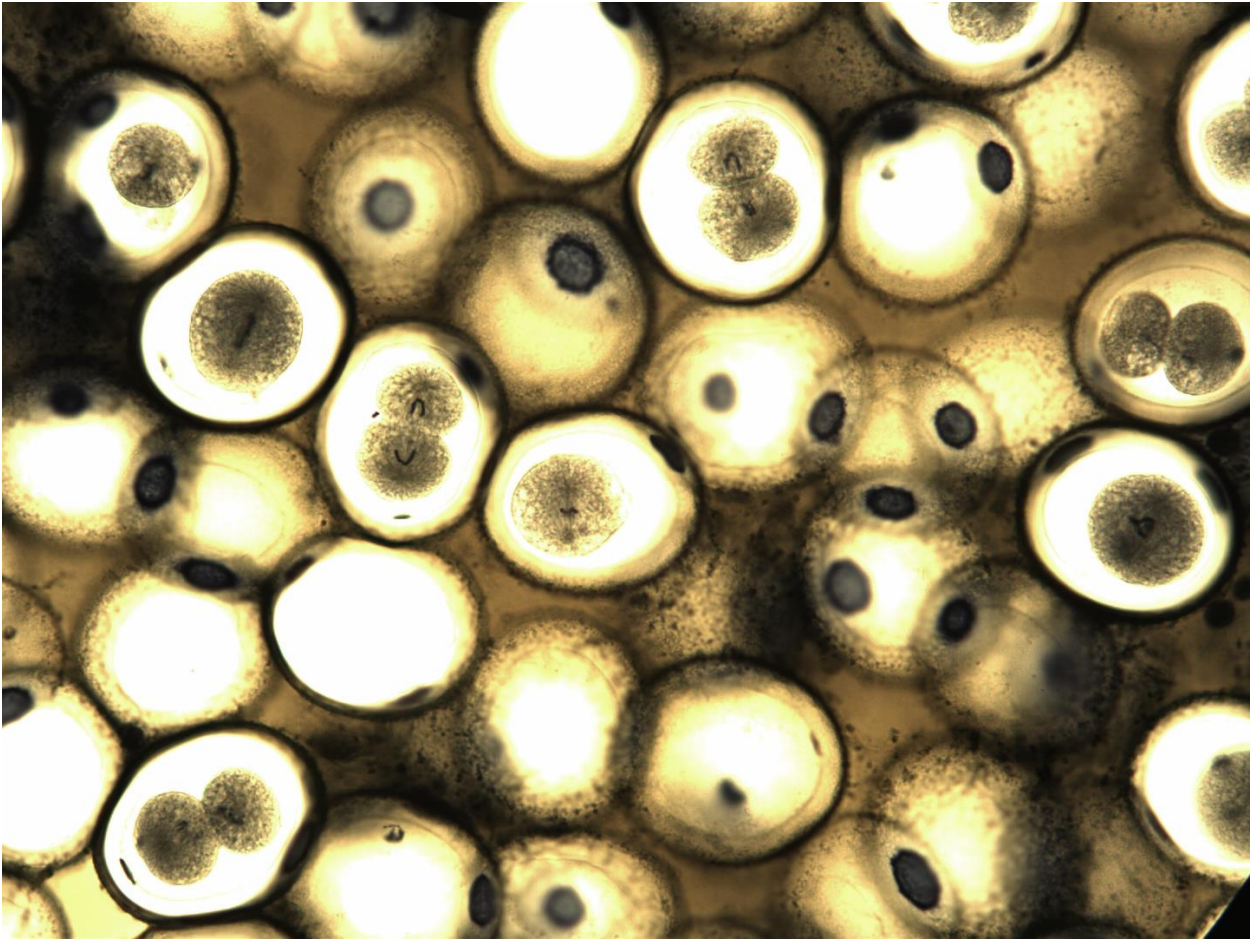


Рис. 26. Центросомы и ахроматиновое веретено митоза яйцеклетки аскариды». Цифровое изображение препарата выполнено камерой Vision CAM для тринокулярного микроскопа Meiji Techno с использованием интегрированного адаптера и разъема C-mount (ув. x 600)

Контрольные вопросы

1. Как устроены и функционируют центросомы?
2. Какова ультраструктура центриолей?
3. Сравните строение центриолей, ресничек и базальных телец.
4. Как меняется активность и структура центриолярного аппарата во время клеточного цикла?
5. Какие морфологические особенности имеет материнская и дочерняя центриоли.
6. Дайте понятие центросомного цикла в эукариотической клетке.
7. Как осуществляется вращение жгутика и биение реснички?

ЗАНЯТИЕ № 8

ТЕМА: Ультраструктура ядра

Цель: Изучить строение и функции ядерного аппарата эукариотической клетки

Задачи:

1. С помощью альбома электронных микрофотографий изучить зарисовать ядро растительной (альбом электронных микрофотографий, рис. 15), ядро животной (альбом электронных микрофотографий, рис. 16) эукариотической клетки.

2. Изучить и зарисовать ультраструктуру порового комплекса и ядерной оболочки (альбом электронных микрофотографий, рис. 17,18), ультраструктуру ядрышка (альбом электронных микрофотографий, рис. 19) и синтез рРНК (альбом электронных микрофотографий, рис. 20).

3. Изучить и зарисовать микропрепарат: “Ядрышки в яйцеклетках костистых рыб. Явление амплификации”.

Материалы и оборудование

Микроскоп Meiji Techno серии MT 5000 с камерой, руководство пользователя, готовый микропрепарат: “Ядрышки в яйцеклетках костистых рыб. Явление амплификации”, альбом электронных микрофотографий.

Теоретическая часть

Ядро – наиболее важный компонент эукариотических клеток. Клетки, как правило, содержат одно ядро шаровидной или яйцевидной формы, размером 10 – 20 мкм.

Ядро окружено *ядерной оболочкой*, состоящей из двух мембран. Наружная мембрана переходит непосредственно в ЭПР и, подобно гранулярной ЭПР, может быть усеяна рибосомами, на которых идет синтез белка. Ядерная оболочка пронизана *ядерными порами*. Через эти поры происходит обмен различными веществами между ядром и цитоплазмой (выход в цитоплазму иРНК и рибосомных субъединиц или поступление в ядро рибосомных белков, нуклеотидов и др.). Поры – не просто отверстия в ядерной оболочке, они имеют определенную структуру, представляющую собой результат слияния наружной и внутренней мембран ядерной оболочки. Содержимое ядра – *ядерный сок* (синонимы: кариоплазма, нуклеоплазма). Нуклеоплазма содержит различные химические вещества, такие как ионы, белки, нуклеотиды либо в виде истинного раствора, либо в виде коллоидного растворов.

В нуклеоплазме располагаются хроматин и одно или несколько ядрышек. Хроматин состоит из ДНК, связанной с большим количеством специальных

белков – гистонов, и небольшого количества РНК (соотношение ДНК: белков гистонов: РНК = 1 : 1,3 : 0,2). Различные участки молекул ДНК в составе хроматина обладают разной степенью спирализации, а потому различаются интенсивностью окраски и характером генетической активности. Хроматин представляет собой форму существования генетического материала в неделящихся клетках и обеспечивает возможность удвоения и реализации заключенной в нем информации. В процессе деления клеток происходит спирализация ДНК и хроматиновые структуры образуют хромосомы.

Хромосомы – плотные, интенсивно окрашивающиеся структуры, которые являются единицами морфологической организации генетического материала и обеспечивают его точное распределение при делении клетки.

Ядрышко – ядерная структура шаровидной формы. Оно содержит РНК, ДНК и белки. Ядрышко – несамостоятельная структура ядра. Оно образуется на участке хромосомы, несущем гены рРНК. Такие участки хромосом называются ядрышковыми организаторами. В образовании ядрышка клетки человека, например, участвуют петли десяти отдельных хромосом, содержащих гены рРНК (ядрышковые организаторы). В ядрышках синтезируются рРНК, которая вместе с поступившем из цитоплазмы белком образует субъединицы рибосом. Завершается сборка рибосом в цитоплазме. Во время деления клетки ядрышко распадается, а в телофазе вновь формируется.

ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) – это молекула, состоящая из двух спирально закрученных полинуклеотидных цепей. ДНК образует правую спираль, ширина спирали приблизительно 2 нм, шаг или полный оборот спирали 3,4 нм, содержит 10 пар комплементарных нуклеотидов. В 1953 году структура ДНК была расшифрована Д. Уотсоном и Ф. Криком.

Мономером ДНК является дезоксирибонуклеотид, состоящий из азотистого основания (аденина, цитозина, тимина или гуанина), пентозы (дезоксирибозы) и фосфата. Основания располагаются парами друг против друга и соединяются водородными связями. Последовательность нуклеотидов одной цепи комплементарна последовательности в другой цепи. Пара аденин = тимин, соединяется двумя, а гуанин □ цитозин тремя водородными связями.

ДНК обладает уникальными свойствами: способностью к самоудвоению (репликации) и способностью к самовосстановлению (репарации).

Репликация (редупликация) осуществляется под контролем ряда ферментов (ДНК – полимеразы, ДНК лигазы и др.), протекает в несколько этапов, полуконсервативным способом и обеспечивает точное воспроизведение в дочерних молекулах той информации, которая была записана в материнской молекуле.

ДНК содержится в основном в ядре, к внеядерным формам относятся митохондриальная и пластидная ДНК.

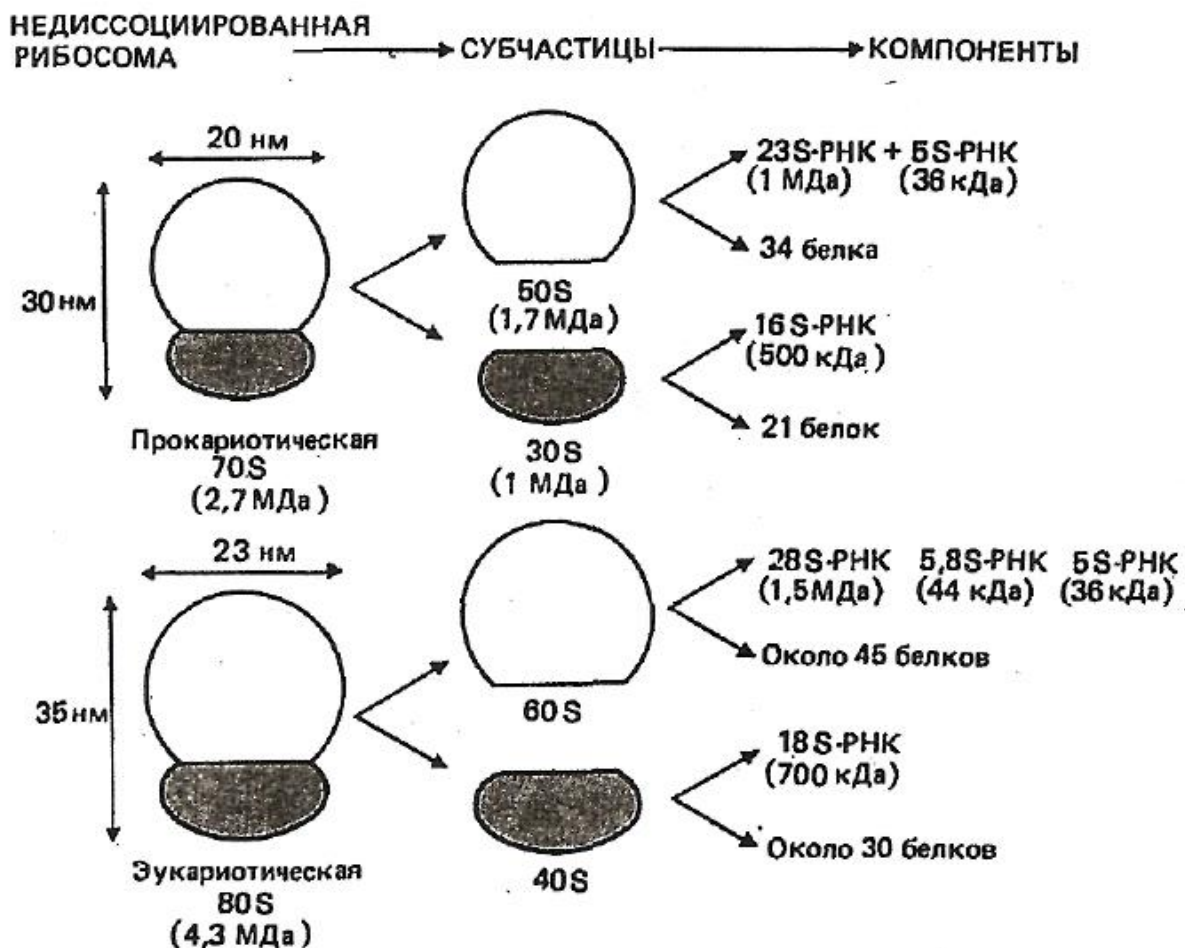


Рис. 27. Схема структурной организации рибосом в прокариотических и эукариотических клетках

РНК (рибонуклеиновая кислота) – это молекула, состоящая из одной цепи нуклеотидов. Рибонуклеотид состоит из одного из четырех азотистых оснований, но вместо тимина в РНК – урацил, а вместо дезоксирибозы – рибоза. В клетке имеются разные виды РНК: матричная или информационная (мРНК, иРНК), рибосомная (рРНК) и транспортная (тРНК). Все молекулы РНК являются копиями определенных участков молекул ДНК.

иРНК – синтезируется в ядре под контролем фермента РНК – полимеразы комплектарно информативным последовательностям ДНК. иРНК переносит эту информацию на рибосомы, где становится матрицей для синтеза белка. Имеет разную длину, составляет примерно 5% всей клеточной РНК.

рРНК – синтезируется в основном в ядрышке, в области генов рРНК и представлена разнообразными по молекулярной массе молекулами, входящими в состав большой и малой субъединиц рибосом (**рис. 27**). На долю рРНК приходится 85% всей РНК клетки.

тРНК – составляет около 10% клеточной РНК. Существует более 40 видов тРНК. Каждая тРНК присоединяет определенную аминокислоту и транспортирует ее к месту сборки полипептида – к рибосомам.

Функции ядра:

1. Контроль за жизнедеятельностью клетки.

2. Хранение генетической информации, заключенной в ДНК, и передача ее дочерним клеткам в процессе клеточного деления.

Практическая часть

1. С помощью альбома электронных микрофотографий изучить и зарисовать в рабочем альбоме: ядро растительной (рис. 15) и ядро животной (рис. 16) эукариотической клетки. Сделать на рисунках обозначения.

2. Изучить и зарисовать ультраструктуру порового комплекса и ядерной оболочки (альбом электронных микрофотографий, рис. 17,18), ультраструктуру ядрышка (альбом электронных микрофотографий, рис. 19) и синтез рРНК (альбом электронных микрофотографий, рис. 20).

3. Рассмотреть и зарисовать микропрепарат: **“Ядрышки в яйцеклетках костистых рыб. Явление амплификации”** (рис. 28) при малом и большом увеличении микроскопа.

Описание микропрепарата. На малом увеличении (x8) на препарате на срезах яичника рыбы видны клетки различной величины округлой или неправильно – округлой (многогранной) формы. Это яйцеклетки на разных стадиях созревания. Между яйцеклетками видны прослойки волокнистой соединительной ткани.

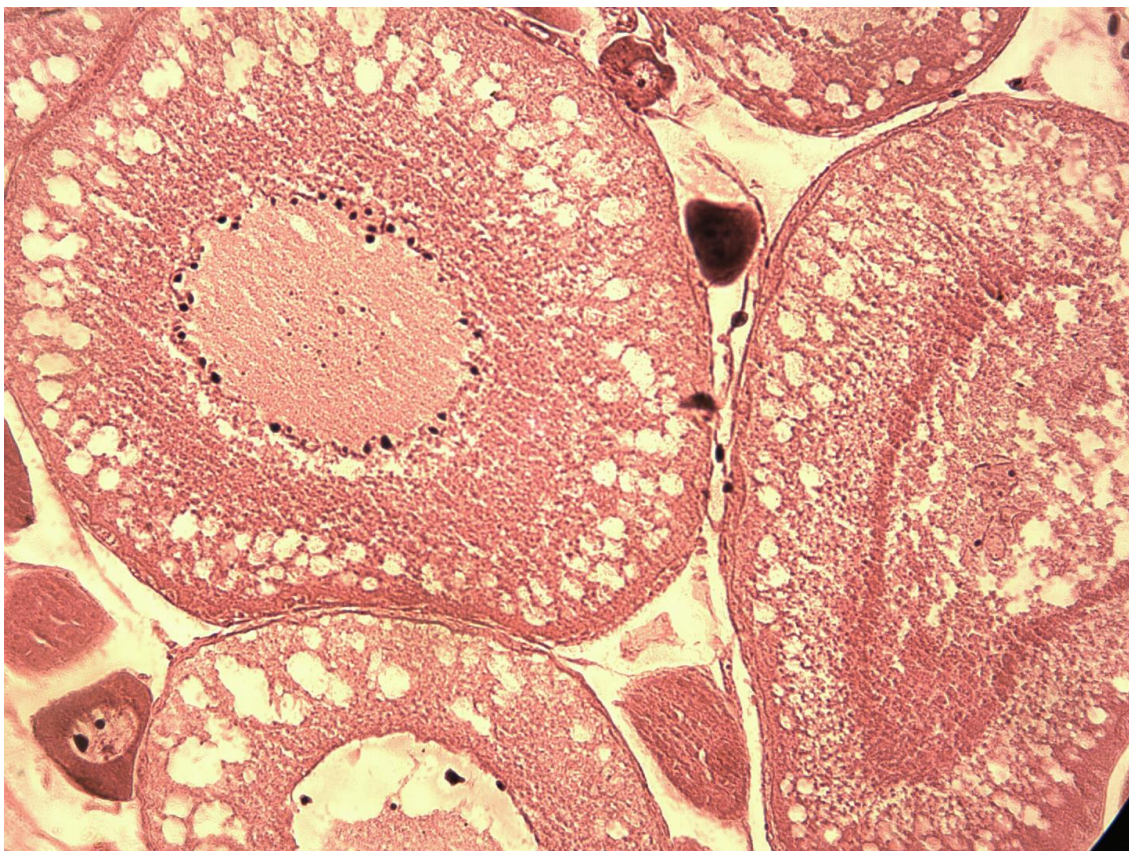


Рис. 28. Ядрышки в яйцеклетках костистых рыб. Явление амплификации. Цифровое изображение препарата выполнено камерой Vision CAM для тринокулярного микроскопа Meiji Techno с использованием интегрированного адаптера и разъема

Незрелые яйцеклетки характеризуются сравнительно мелкими размерами. Их ядра содержат одно ядрышко, окрашенное на препарате в черный цвет. По мере созревания яйцеклетка увеличивается в размерах, в ядре появляется много ядрышек – (сверхчисленность ядрышек). Они разной величины и равномерно рассеяны по ядру. В наиболее зрелых яйцеклетках ядрышки сосредотачиваются на периферии ядра у самой ядерной оболочки. Центр ядра остается свободным.

Особенностью многочисленных ядрышек созревающих яйцеклеток является наличие кольцевых молекул ДНК. Этот вид молекул ДНК возникает в результате сверхрепликации зоны ядрышкового организатора, содержащего цистроны рибосомальной РНК. Многочисленные копии ДНК обособляются от хромосомной ДНК и становятся дополнительно работающими ядрышками. Это явление носит название *амплификации* рибосомальных генов. Процесс необходим для накопления огромного количества рибосом (10^{12}) на яйцевую клетку, что обеспечивает развитие эмбриона на ранних стадиях развития, при отсутствии синтеза новых рибосом. Сверхчисленные ядрышки после созревания яйцеклетки исчезают.

Рассмотреть и зарисовать микропрепарат в рабочем альбоме, обозначить все внутренние структуры.

Контрольные вопросы

1. Раскройте взаимосвязь строения и функций ДНК и РНК и укажите их сходство и различия.
2. Охарактеризуйте основные компоненты интерфазного ядра эукариотических клеток.
3. Опишите строение и морфологические особенности структуры ядрышка в зависимости от его функционального состояния.
4. Какие типы хроматина выделяет? Какова структурная организация хроматина.
5. Охарактеризуйте основные уровни конденсации (спирализации) молекулы ДНК.

ЗАНЯТИЕ № 9

ТЕМА: Организация генетического материала политенных хромосом в ядрах Бальбиани

Цель: Изучить строение политенных хромосом, выделенных из слюнных желез личинки комара *Chironomus sp.*, получить представление о структуре хромосомных локусов, активных и неактивных в отношении синтеза РНК

Задачи:

1. Выделить слюнные железы личинок 4-ой стадии развития *Chironomus sp.* и приготовить временные ацетокарминовые препараты.
2. Рассмотреть и зарисовать в рабочем альбоме хромосомный комплекс эндомитотического ядра *Chironomus sp.*

Материалы и оборудование:

1. Дистиллированная вода.
2. 45% уксусная кислота.
3. Приготовление раствора красителя ацетокармина: 1г кармина растворяют в 100 мл 45% уксусной кислоты и кипятят в течение часа. После кипячения, встряхивают и фильтруют, предварительно дав раствору остыть. Кипячение проводят под тягой в колбе с обратным холодильником, улетучивание уксусной кислоты снижает проникающую способность красителя (при необходимости можно использовать краситель более высокой 2 – 4% концентрации). Для получения более темного спектра окрашивания в краситель добавляют 1 -2 капли 45% CH_3COOH , насыщенной уксусным железом. Часто в практике эту процедуру заменяют, помещая в свежеприготовленный краситель на несколько часов железную скрепку или кнопку. Затем раствор отфильтровывают.

Остатки кармина на фильтре можно использовать повторно.

4. Микроскоп Meiji Techno серии МТ 4000, руководство пользователя, бинокулярная лупа, ножницы, скальпель, острая бритва, препаровальные иглы, часовые стекла, пипетки, фильтровальная бумага, предметные стекла, покровные стекла, марля.

Теоретическая часть

В некоторых клетках на определенных стадиях их жизненного цикла можно наблюдать особые, гигантские хромосомы, для которых характерны огромные размеры. К хромосомам такого типа относятся так называемые **политенные хромосомы** (от греч. «*poly*» – много, «*tenia*» – нить) – впервые описанные Бальбиани (1881) в некоторых тканях личинок двукрылых, например, в клетках слюнных желез, кишечника, трахей, жирового тела и мальпигиевых сосудов. Знакомясь со строением политенных хромосом, можно получить представление о структуре хромосомных локусов, активных и неактивных в отношении синтеза РНК. При малом увеличении видны мелкозернистая

цитоплазма и очень большие ядра с крупными хромосомами и прозрачной кариоплазмой. Хромосом всего 4, что соответствует гаплоидному набору. При образовании хромосом помимо политенезации происходит соматическая конъюгация, заключающаяся в том, что гомологичные хромосомы объединяются попарно и число хромосом, равное 8, в диплоидном наборе соматических клеток *Cironomus sp.*, становится в 2 раза меньшим. Считается, что подобные хромосомы находятся постоянно в состоянии профазы. На четвертой (самой короткой) хромосоме расположено ядрышко – крупное темное тельце неправильной формы.

Политенные хромосомы приобретают гигантские размеры, благодаря серии многократных редупликаций хромосом, не сопровождающихся их расхождением.



Рис. 29. Схема строения политенной хромосомы [11]

Длина хромосом различна. Они часто переплетены между собой, образуя клубок. Работая микровинтом, можно проследить за строением каждой хромосомы. Хромосомы имеют вид лент со вздутиями и поперечной исчерченностью (*рис. 29*). Темные полосы называются дисками. Они чередуются со светлыми полосами – междисками. Ширина дисков и междисков варьирует. В междисковых пространствах идут активные синтетические процессы. В каждой хромосоме помимо темных и светлых полос видны сферические вздутия, имеющие диффузное строение, сходное с междисковым пространством. Эти вздутия называются пуфами.

Наиболее развитые пуфы обнаружены на четвертой хромосоме. Здесь хромосома как бы раздваивается и образует кольцеобразные вздутия – кольцо Бальбиани. Пуфы представляют собой активные локусы хромосом, ответственные за синтез и-РНК. Ядрышко является специализированным пуфом, синтезирующим р-РНК. В междисковых пространствах также отмечаются синтетические процессы. В дисках синтеза РНК не происходит.

Практическая часть

Выделение слюнных желез проводят под бинокулярной лупой. Личинку комара *Chironomus sp.* помещают на «часовое» стекло, придерживают препаровальной иглой или пинцетом, и острой бритвой отрезают первые два сегмента головного конца. При этом слюнные железы, имеющие вид мелких прозрачных беловатых телец овальной формы, выходят из тела личинок вместе с гемолимфой. Выделенные железы сразу помещают в раствор красителя ацетокармина, который наливается в часовое стекло или предметное стекло с лункой. Краситель должен постоянно находиться в закрытом состоянии, в противном случае он теряет способность окрашивать. Время окрашивания 25-30 мин. После окрашивания слюнные железы осторожно переносят на чистое предметное стекло, добавляют каплю 45% уксусной кислоты, выдерживают 5 минут, для частичной дифференцировки хромосом и цитоплазмы. Затем с помощью фильтровальной бумаги оттягивают раствор и заменяют его свежей каплей 45% – ной уксусной кислоты. Материал осторожно накрывают покровным стеклом. Изготовленный препарат просматривают при увеличении кратном $\times 10$ и $\times 40$.

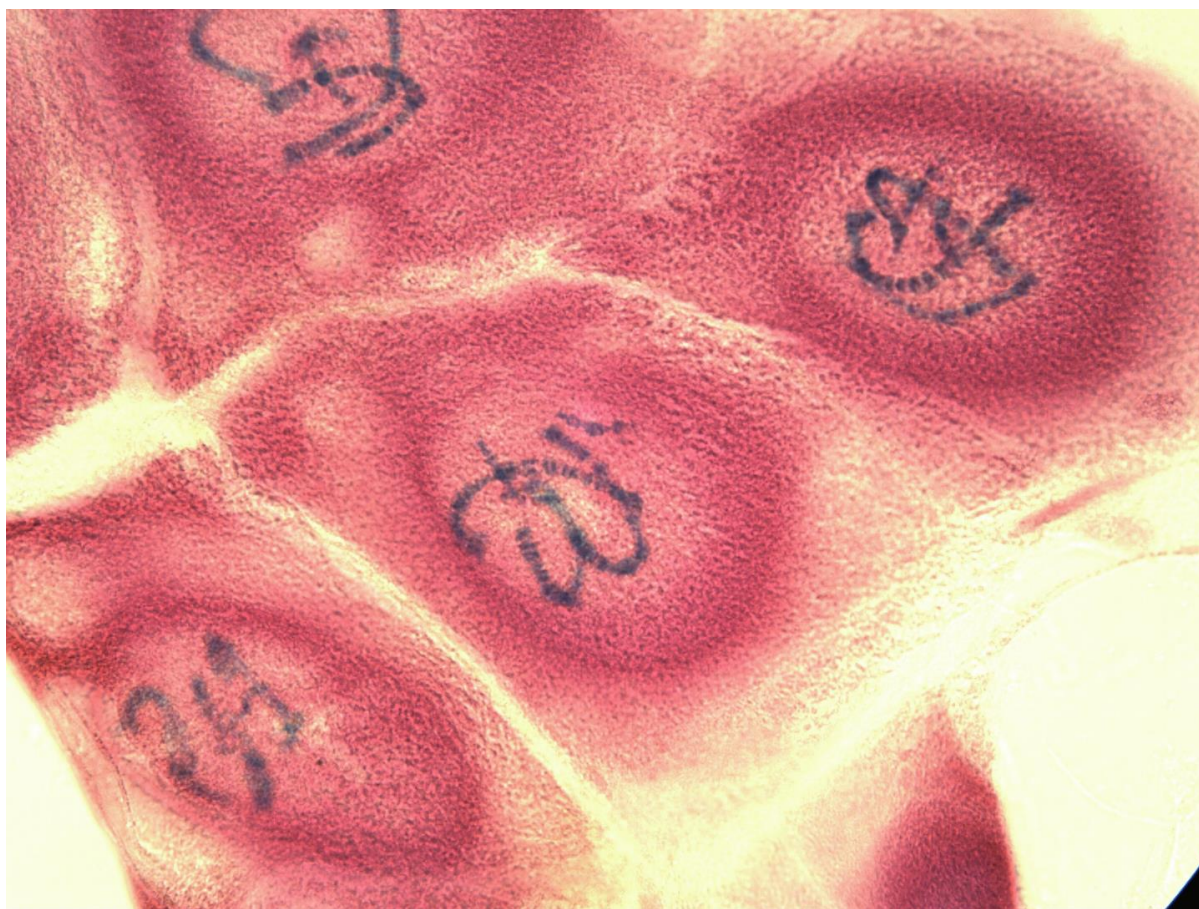


Рис. 30. Хромосомный комплекс эндомитотических ядер клеток слюнной железы *Chironomus sp.* Цифровое изображение препарата выполнено камерой Vision CAM для

тринокулярного микроскопа Meiji Techno с использованием интегрированного адаптера и разъема C-mount (ув. х 600)

Рассмотреть и зарисовать в рабочем альбоме хромосомный комплекс эндомитотического ядра (*рис. 30*). Обратить внимание на число, форму хромосом, отсутствие хромоцентра, эухроматиновые и гетерохроматиновые участки. Полностью зарисовать четвертую хромосому. Обратить внимание на расположение, величину дисков и изменение их морфологии в пучках, кольцах Бальбиани и районе ядрышкового организатора.

Контрольные вопросы

1. Какие продукты синтезируются в результате синтетической деятельности хроматина интерфазного ядра?
2. Охарактеризуйте хромомерный принцип организации хромосом на примере политенных хромосом слюнных желез двукрылых?

Раздел 3. ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ КЛЕТКИ

Жизненный (клеточный) цикл – промежуток времени от момента возникновения клетки в результате деления материнской клетки до ее собственного деления или гибели.

Обязательным компонентом в клеточном цикле является митотический цикл (период подготовки клетки к делению и само деление).

Клеточный цикл состоит из трех главных стадий:

1. **Интерфаза**. Период интенсивного синтеза и роста. Состоит из трех периодов: пресинтетического или постмитотического – G_1 синтетического S; постсинтетического или премитотического – G_2 .

2. **Митоз (кариокinesis)**. Это процесс деления ядра, при котором хроматиды отделяются одна от другой и перераспределяются в виде хромосом между дочерними клетками. Состоит из ряда стадий, плавно переходящих друг в друга: профазы, прометафазы, метафазы, анафазы и телофазы.

3. **Цитокинез (C)** – процесс равномерного разделение цитоплазмы и органоидов между двумя дочерними клетками.

Для пресинтетического периода G_1 характерны интенсивные процессы биосинтеза. Образование митохондрий, хлоропластов (у растений), эндоплазматической сети, лизосом, аппарата Гольджи, вакуолей и пузырьков. Ядрышко продуцирует рРНК, мРНК и иРНК; образуются рибосомы; клетка синтезирует структурные и функциональные белки. Имеет место интенсивный клеточный метаболизм, контролируемый ферментами. Рост клетки, образование веществ, подавляющих или стимулирующих начало следующей фазы.

Центральным событием синтетического периода S является репликация ДНК. Синтез белковых молекул (гистонов), с которыми связывается каждая нить ДНК. Каждая хромосома состоит из двух хроматид.

Постсинтетический период (G_2) относительно короток, в клетках млекопитающих он составляет 2-5 ч. В это время происходит деление митохондрий и хлоропластов. Идут активные метаболические процессы, увеличивается количество белка и энергетических запасов в клетке.

Таким образом, закономерное чередование интерфазы и митоза называют клеточным циклом. В следующих друг за другом клеточных циклах постоянно чередуются друг с другом репликация и сегрегация генетического материала. Промежуточные G-фазы служат для роста клетки (прежде всего G_1) и подготовки следующего митоза (G_2). В жизненном цикле имеются такие периоды покоя (G_0), в ходе которых клетка выполняет свойственные ей функции и погибает или возвращается в митотический цикл.

ЗАНЯТИЕ № 10

ТЕМА: Митоз (непрямое деление) эукариотических клеток

Цель: Изучить основные фазы непрямого деления клетки

Задачи:

1. Рассмотреть микропрепарат «Митоз в клетках корешка лука», зарисовать интерфазную клетку и все фазы митотического деления растительных клеток.
2. Рассмотреть микропрепарат «Митоз в яйцеклетках лошадиной аскариды», зарисовать интерфазу и все стадии митотического деления животных клеток.

Материалы и оборудование

Микроскопы Meiji Techno серии МТ 4000, руководство пользователя, готовые микропрепараты.

Теоретическая часть

Деление эукариотических клеток – **митоз** (от греч. *mitos* – нити), или **кариокинез, или непрямое деление** – является полноценным единственным способом увеличения числа клеток. Выделяют несколько типов митоза. Наиболее простой тип митоза – *плевромитоз*. При закрытом плевромитозе (без нарушения ядерной оболочки) в качестве центров организации микротрубочек выступают структуры, находящиеся на внутренней стороне ядерной мембраны – полярные тельца. Этих телец два, они расходятся друг от друга, не теряя связи с ядерной оболочкой, и в результате этого образуются два полуверетена, связанные с хромосомами. Весь процесс образования митотического аппарата и расхождения хромосом происходит в этом случае под ядерной оболочкой. Закрытый плевромитоз встречается среди простейших и широко распространен у грибов (хитридиевые, зигомицеты, дрожжи, оомицеты, аскомицеты, миксомицеты и др.). Встречаются также и формы полужакрытого плевромитоза, когда на полюсах сформированного веретена ядерная оболочка разрушается.

Другой формой митоза является *ортомитоз*, подразделяющийся на три формы: открытый (обычный митоз), полужакрытый и закрытый. При полужакрытом ортомитозе образуется бисимметричное веретено с помощью расположенных в цитоплазме ЦОМТ, ядерная оболочка сохраняется в течение всего митоза, за исключением полярных зон. В качестве ЦОМТ здесь могут обнаруживаться массы гранулярного материала или даже центриоли. Эта форма митоза встречается у зеленых водорослей, грегариин, бурых, красных водорослей, у некоторых низших грибов. При закрытом ортомитозе полностью сохраняется ядерная оболочка, под которой образуется настоящее веретено.

Микротрубочки формируются в кариоплазме, реже отрастают от внутриядерного ЦОМТ, не связанного (в отличие от плевромитоза) с ядерной оболочкой. Такого типа митозы характерны для деления микронуклеусов инфузорий, но встречаются и у других простейших. При открытом ортомитозе ядерная оболочка полностью распадается. Этот тип деления клеток характерен для животных организмов, некоторых простейших и для клеток высших растений. Эта форма митоза в свою очередь представлена астральным и анастральным типами.

Астральный тип веретена (или конвергентный) характеризуется тем, что его полюса представлены небольшой зоной, к которой сходятся (конвергируют) микротрубочки. Обычно в полюсах астральных веретен располагаются centrosомы, содержащие центриоли. От полюсов кроме того расходятся радиальные микротрубочки, не входящие в состав веретена, а образующие звездчатые зоны – цитастеры.

Анастральный тип веретена не имеет на полюсах цитастеров. Полярные области веретена здесь широкие, их называют полярными шапочками, в их состав не входят центриоли. Волокна веретена в данном случае не отходят от одной точки, а расходятся широким фронтом (дивергируют) от всей зоны полярных шапочек. Этот тип веретена характерен для делящихся клеток высших растений.

В образовании веретена деления у всех эукариотических клеток принимают участие два рода структур: centrosомы (полюса) веретена и кинетохоры хромосом. Centrosомы, как мы уже отмечали, являются центрами организации микротрубочек. От них своими «+» – концами отрастают микротрубочки, образующие пучки, тянущиеся к хромосомам. Кинетохоры представляют собой трехслойные структуры: внутренний плотный слой, примыкающий к телу хромосомы, средний рыхлый слой и внешний плотный слой. От внешнего слоя отходят множество фибрилл, образуя фиброзную «корону» кинетохора. Функциональная роль кинетохоров заключается в связывании между собой сестринских хроматид, в закреплении митотических микротрубочек, в регуляции разъединения хромосом и в собственно движении хромосом во время митоза при участии микротрубочек.

Волокна веретена представляют собой одиночные микротрубочки или их пучки. Начинаются микротрубочки от полюсов веретена и часть из них направляется к центромерам, где расположены кинетохоры хромосом (это – кинетохорные микротрубочки), часть проходит дальше по направлению к противоположному полюсу, но до него не доходит – межполюсные микротрубочки. Кроме того, от полюсов отходит группа радиальных микротрубочек – астральные микротрубочки.

У клеток, вступивших в цикл деления, фаза собственно митоза, непрямого деления, занимает относительно короткое время, всего около 0,1 времени

клеточного цикла. В животных (*рис. 31*) и растительных (*рис. 32*) клетках митоз принято разделять на фазы: профазу, метафазу, анафазу, телофазу.

Профаза. Начало этой фазы митоза служит конденсация хромосом. Этому событию предшествует повышение активности фосфорилаз, модифицирующих гистоны, и, в первую очередь, гистон H1. В профазе сестринские хроматиды связаны друг с другом с помощью белков-когезинов, которые образуют эти связи еще в S-периоде, во время удвоения хромосом. К поздней профазе связь между сестринскими хроматидами сохраняется только в зоне кинетохоров. В профазных хромосомах уже можно наблюдать зрелые кинетохоры, которые не имеют никаких связей с микротрубочками.

Конденсация хромосом в профазном ядре совпадает с резким уменьшением транскрипционной активности хроматина и инактивацией ядрышковых генов. Большая часть ядрышковых белков диссоциирует и в свободном виде встречается в цитоплазме клетки или связывается с поверхностью хромосом. Одновременно с этим происходит фосфорилирование ряда белков ламины, ядерной оболочки, которая распадается. При этом теряется связь ядерной оболочки с хромосомами. Затем ядерная оболочка фрагментируется на мелкие вакуоли, а поровые комплексы исчезают. Параллельно этим процессам происходит активация клеточных центров. В начале профазы разбираются микротрубочки в цитоплазме и начинается бурный рост множества астральных микротрубочек. Скорость роста микротрубочек в профазе почти в два раза выше роста интерфазных микротрубочек, но лабильность их в 5-10 раз выше цитоплазматических. Так если время полужизни микротрубочек в цитоплазме составляет около 5 мин, то во время первой половины митоза – всего лишь 15 секунд. Центросомы начинают расходиться друг от друга на некоторое расстояние – будущие полюса веретена деления. Механизм такого профазного расхождения полюсов заключается в следующем: идущие навстречу друг другу антипараллельные микротрубочки взаимодействуют между собой, что приводит к их большей стабилизации и расталкиванию полюсов. Это происходит за счет взаимодействия с микротрубочками динеино-подобных белков, которые в центральной части веретена выстраивают межполюсные микротрубочки параллельно друг другу.

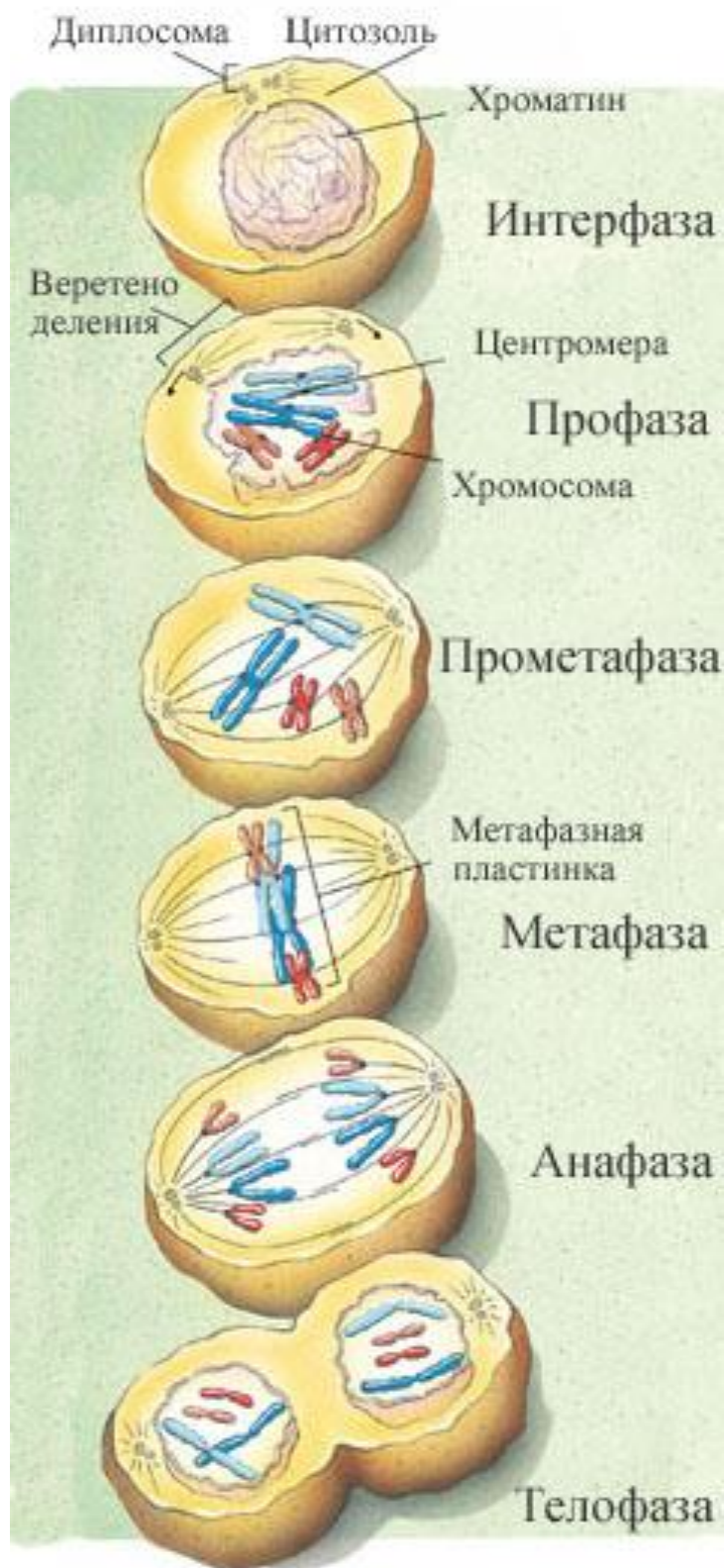


Рис. 31. Схема фаз митоза животной клетки [16]

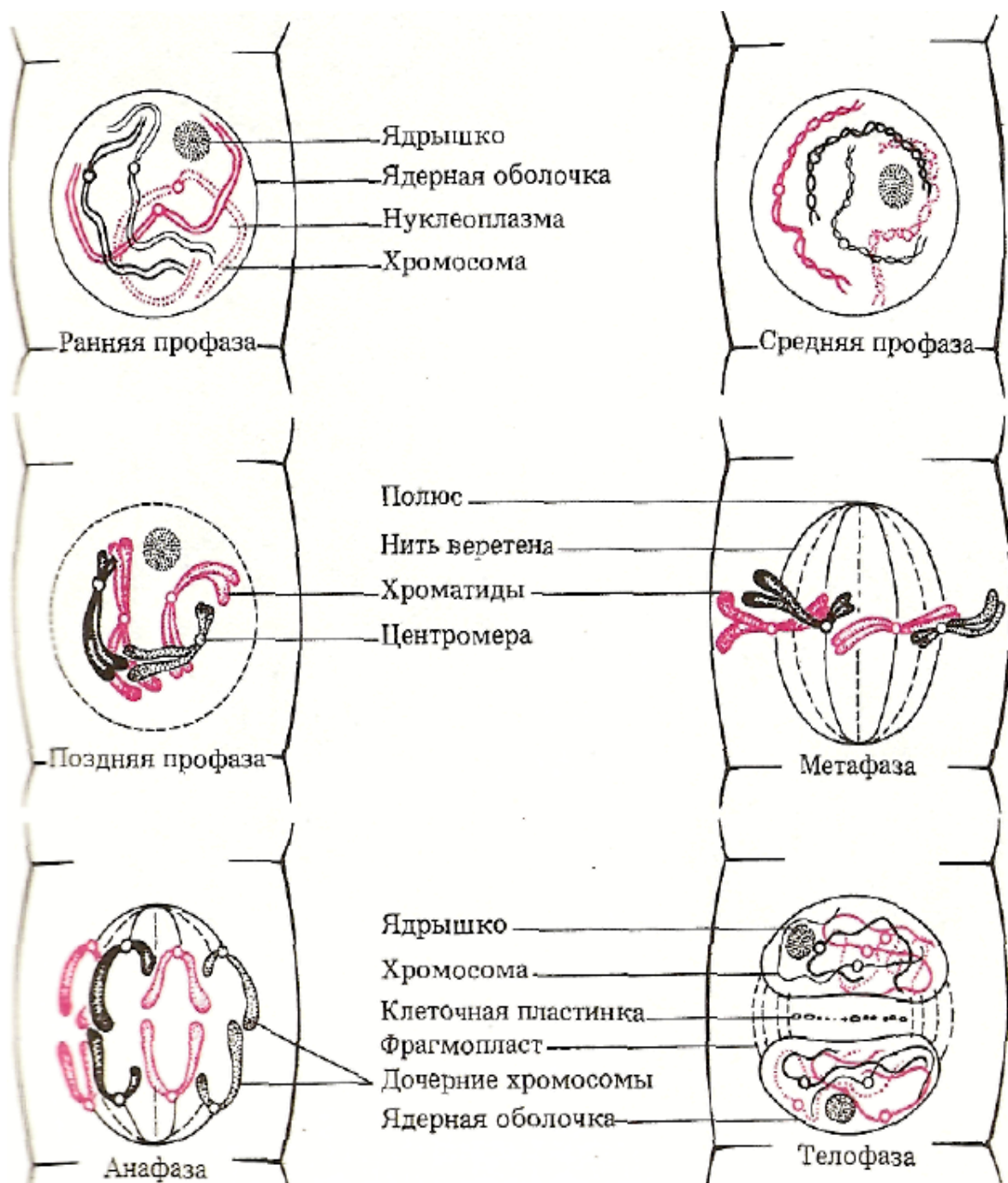


Рис. 32. Схема фаз митоза растительной клетки [10]

Одновременно с этим продолжается их полимеризация и рост, которые сопровождаются расталкиванием полюсов клетки. В профазе одновременно с разборкой цитоплазматических микротрубочек происходит дезорганизация ЭПР и комплекса Гольджи, который теряет свою околядерную локализацию, распадается на отдельные диктиосомы, без порядка разбросанные в цитоплазме.

Прометафаза. В прометафазе наблюдается постоянное движение хромосом или *метакинез*, при котором они то приближаются к полюсам, то уходят от них к центру веретена. Перемещение хромосом к разным полюсам происходит с помощью микротрубочек. Отдельные отходящие от полюсов

микротрубочки случайно достигают одного из кинетохоров хромосомы и связываются с ним, “захватываются” кинетохором. После этого происходит быстрое, со скоростью около 25 мкм/мин, скольжение хромосомы вдоль микротрубочки по направлению к её (–)-концу. Это приводит к тому, что хромосома приближается к полюсу, от которого произошла эта микротрубочка. За перемещение хромосом отвечает моторный белок, аналогичный цитоплазматическому динеину, расположенный в «короне» кинетохора.

В результате такого первичного прометафазного движения хромосомы оказываются приближены к полюсам веретена, где продолжает происходить образование новых микротрубочек. Очевидно, что чем ближе к центросоме будет находиться хромосомный кинетохор, тем будет выше случайность его взаимодействия с другими микротрубочками. В этом случае новые, растущие (+) – концы микротрубочек “захватываются” зоной короны кинетохора; теперь с кинетохором оказывается связанным пучок из микротрубочек, рост которых продолжается на их (+) – конце. При росте такого пучка хромосома перемещается к центру веретена. Одновременно от противоположного полюса ко второму кинетохору другой сестринской хроматиды подрастают свои микротрубочки, пучок которых начинает тянуть хромосому к противоположному полюсу. Хромосомы, совершая небольшие перемещения в сторону, то одного, то другого полюса, в результате постепенно занимают срединное положение в веретене и выстраиваются в метафазную пластинку, т.е. начинается истинная метафаза.

Метафаза. Во время метафазы хромосомы располагаются так, что их кинетохоры обращены к центру клетки, а плечи – к периферии. Такое расположение хромосом носит название «материнской звезды» и характерно для клеток животных. У растений часто в метафазе хромосомы лежат в экваториальной плоскости веретена без строгого порядка. Продолжается постоянное обновление микротрубочек за счет сборки и разборки тубулинов.

К концу метафазы завершается процесс обособления друг от друга сестринских хроматид.

Анафаза. Эта стадия начинается с разъединения всех сразу хромосом в центромерных участках. Происходит одновременная деградация центромерных белков когезинов, которые связывали до этого времени сестринские хроматиды.

Собственно расхождение хромосом складывается из двух процессов: 1 – расхождение хромосом за счет кинетохорных пучков микротрубочек, 2 – расхождение хромосом вместе с полюсами за счет удлинения межполюсных микротрубочек. Первый из этих процессов носит название «анафаза А», второй – «анафаза В».

Во время «анафазы А», когда группы хромосом начинают двигаться по направлению к полюсам, происходит укорачивание кинетохорных пучков микротрубочек. Разборка микротрубочек происходит в основном с (+)-конца, в месте его соединения с кинетохором, а хромосома движется по направлению к (-)-концу микротрубочек, который расположен в зоне центросомы. Движение хромосом зависит от присутствия АТФ и от наличия ионов Ca^{+2} . Динеин, входящий в состав кинетохора, подтягивает хромосому к полюсу. При

движении хромосом они меняют свою ориентацию и часто принимают V-образную форму. Вершина их направлена в сторону полюсов деления, а плечи как бы откинута к центру веретена. Скорость движения хромосом равномерная, 0,5–2 мкм/мин.

Телофаза. Начинается с остановки хромосом и завершается началом реконструкции нового интерфазного ядра (ранний G₁-период) и разделением исходной клетки на две дочерние (цитокinesis).

В ранней телофазе хромосомы начинают деконденсироваться и увеличиваться в объеме. В местах их контактов с мембранными пузырьками цитоплазмы начинает строиться новая ядерная оболочка, которая раньше всего образуется на латеральных поверхностях хромосом и позже – в центромерных и теломерных участках. После замыкания ядерной оболочки начинается формирование новых ядрышек. В телофазе начинается и заканчивается процесс разрушения митотического аппарата – разборка микротрубочек.

Одно из главных событий телофазы – разделение клеточного тела, цитотомия или цитокinesis. У растений деление клетки происходит путем внутриклеточного образования клеточной перегородки, а у клеток животных – путем перетяжки, впячивания плазматической мембраны внутрь клетки.

Закладка перетяжки при делении клеток **животных** происходит строго в экваториальной плоскости веретена. Здесь скапливаются микрофиламенты (актиновые фибриллы и короткие палочковидные молекулы из полимеризованного миозина), образуя сократимое кольцо. Взаимное скольжение этих компонентов приводит к уменьшению диаметра кольца и к появлению вдавления плазматической мембраны, что в конце приводит к перетяжке исходной клетки надвое.

Процесс цитотомии **растительных клеток** отличается от деления цитоплазмы клеток животных. В конце телофазы также происходит разборка микротрубочек веретена в полярных областях, однако микротрубочки основной части веретена между двумя новыми ядрами остаются, более того здесь происходит образование новых микротрубочек. Так образуются пучки микротрубочек, с которыми связаны многочисленные мелкие вакуоли комплекса Гольджи. С помощью микротрубочек многочисленные вакуоли движутся к экваториальной зоне клетки, где сливаются друг с другом и образуют в середине клетки плоскую вакуоль – фрагмопласт, который разрастается к периферии клетки. Мембраны фрагмопласта сливаются с плазматической мембраной: происходит обособление двух новых клеток, разделенных новообразованной первичной клеточной стенкой. После цитотомии две новые (дочерние) клетки переходят в стадию G₁ клеточного периода.

Таким образом, при митозе до S-периода общее количество ДНК в ядре соответствует числу хромосом в нем, и формула диплоидной клетки имеет вид 2n2c. После репликации, когда происходит удвоение ДНК каждой хромосомы, суммарное количество ДНК в ядре увеличивается вдвое и формула клетки приобретает вид 2n4c. В результате расхождения хроматид в анафазе митоза дочерние ядра получают диплоидный набор однохроматидных хромосом.

Формула дочерних клеток вновь становится $2n2c$, аналогична материнской диплоидной клетки.

Практическая часть

1. Рассмотреть и зарисовать в рабочем альбоме все фазы митотического деления и интерфазу в клетках корешка лука на готовом микропрепарате: «*Митоз в клетках корешка лука*» (рис. 33).

Описание микропрепарата. При малом увеличении микроскопа можно различить в корешке три зоны:

1. Концевую часть (чехлик), состоящую из тонкостенных слизывающихся на периферии клеток.
2. Зону размножения клеток (меристему).
3. Зону роста или растяжения, состоящую из вытянутых прямоугольных клеток. Деление идет только в зоне размножения, где при большом увеличении микроскопа можно найти, как неделящиеся клетки (стадия интерфазы), так и все стадии митотического деления.

В *интерфазе* клетки имеют прямоугольное очертание, окружены хорошо заметной оболочкой. Ядра округлые и овальные, в них видны 1 - 2 окрашенных в черный цвет округлых, крупных ядрышка с мелкими глыбками хроматина.

В *профазе* в ядре появляется в начале клубок тонких, а затем более коротких и толстых хроматических нитей. В ранней профазе еще заметны ядрышки и ядерная мембрана, которые к концу профазы исчезают. Хромосомы в виде коротких нитей лежат в центральной части цитоплазмы.

Для *метафазы* характерно завершение формирования митотического аппарата, состоящего из тонких нитей (центриоли в растительных клетках отсутствуют), а также перемещение 16-и хромосом к центру клетки и расположение их в виде экваториальной пластинки.

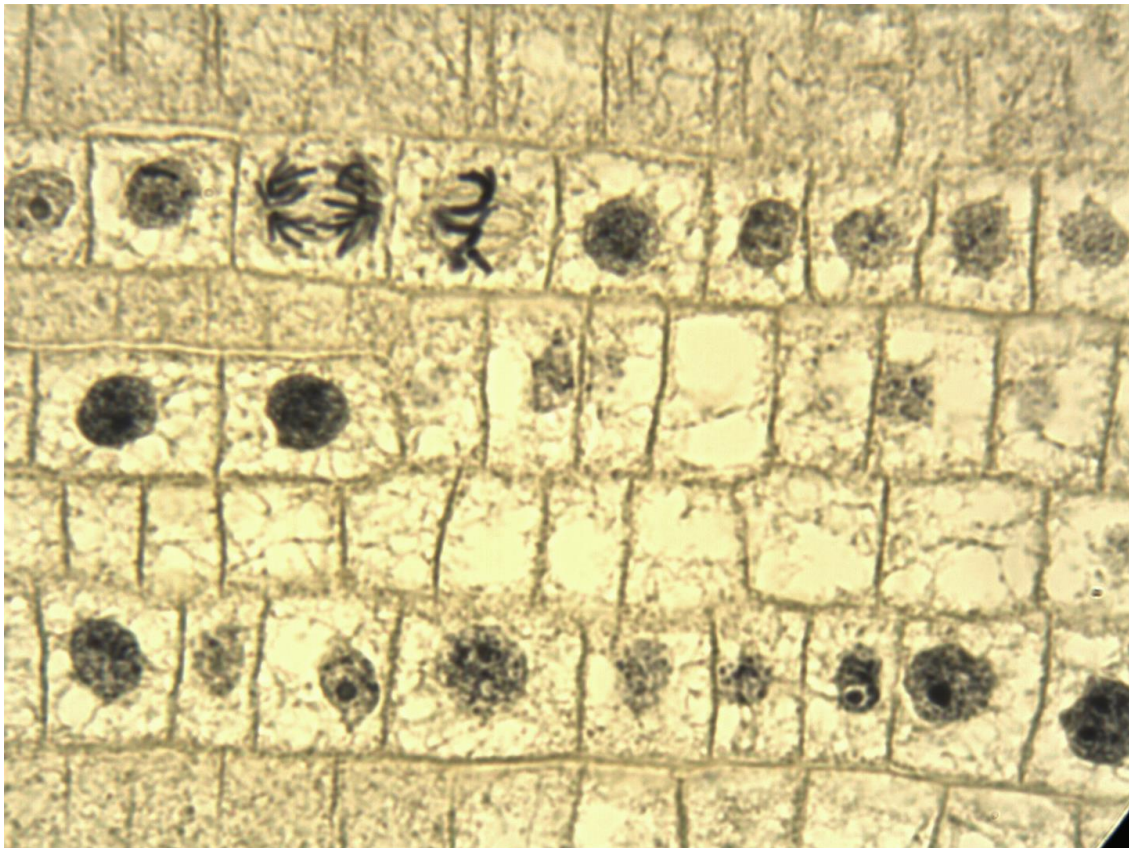


Рис. 33. Митоз в клетках корешка лука. Цифровое изображение препарата выполнено камерой Vision CAM для тринокулярного микроскопа Meiji Techno с использованием интегрированного адаптера и разъема C-mount (ув. x 600)

Часть нитей веретена оканчивается на центромерах (кинетохорах), другие идут от одного полюса к другому. Хромосомы в экваториальной плоскости лежат центромерными участками в направлении центра клетки, а концы их обращены к клеточным мембранам. Поэтому при рассматривании сверху они образуют фигуру, напоминающую звезду. В метафазе заметно, что хромосомы состоят из двух сестринских хромосом.

В *анафазе* осуществляется расхождение сестринских хромосом (хроматид) к противоположным полюсам клетки. На этой стадии митоз обеспечивает равномерное распределение генетического материала в дочерние клетки. В ранней анафазе хромосомы повернуты центромерами к полюсам клетки, а в поздней - уже собираются на полюсах. Расхождение хромосом осуществляется очень быстро - анафаза является наиболее короткой фазой митоза.

Телофаза. Хромосомы начинают деконденсироваться и теряют свою индивидуальность. Появляется ядерная мембрана, начинает формироваться срединная пластинка из фрагмопласта (трубчатая структура, образуемая остатками соединительных нитей митотического веретена и пузырьков комплекса Гольджи). Клетка переходит в интерфазное состояние.

Рассмотреть и зарисовать в рабочем альбоме последовательные стадии митоза растительной клетки.

2. Рассмотреть и зарисовать все стадии митотического деления и интерфазы в яйцеклетках лошадей аскариды на готовом микропрепарате: «*Митоз в яйцеклетках лошадиной аскариды*» (рис. 34).

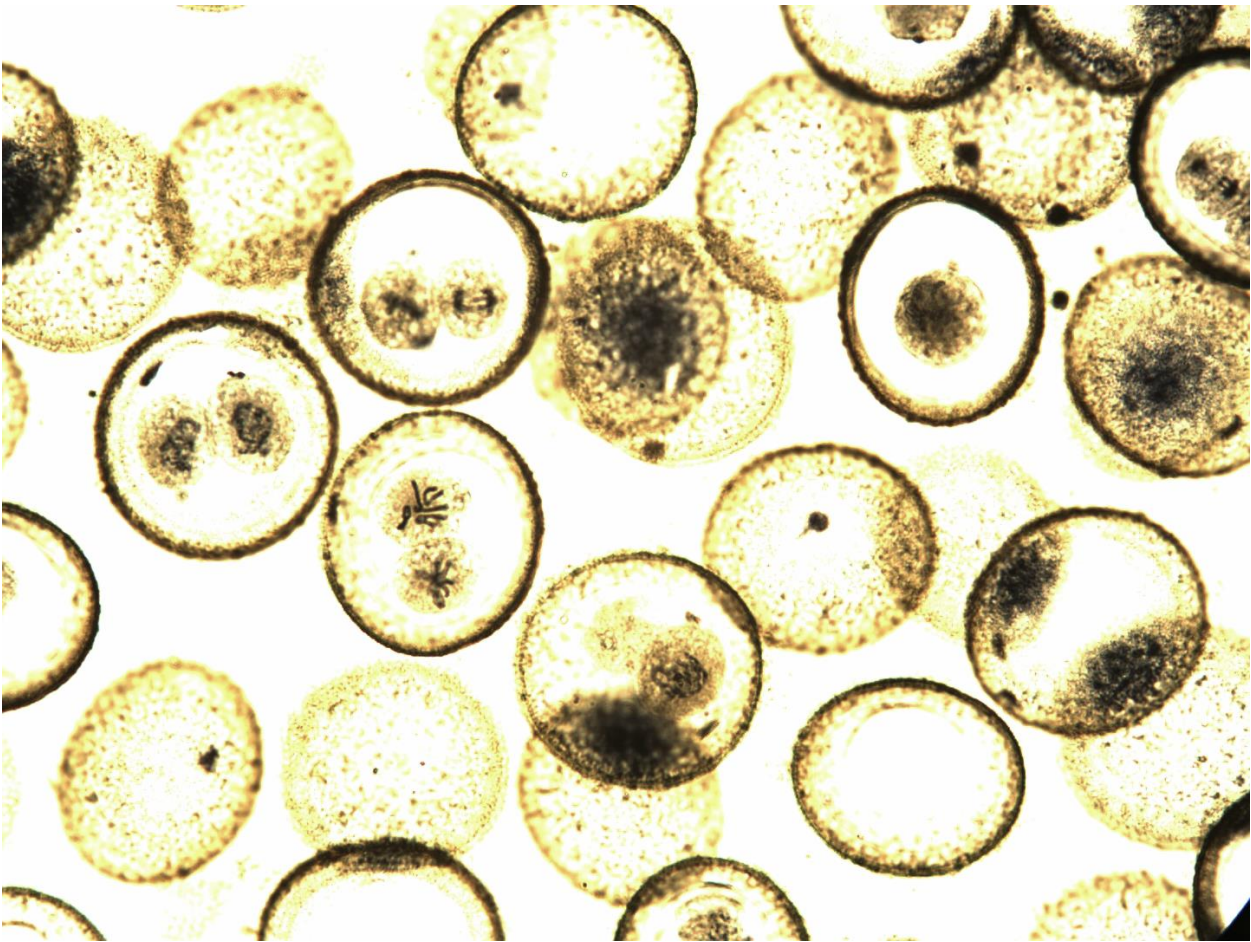


Рис. 34. Митоз в дробящихся яйцеклетках аскариды. Цифровое изображение препарата выполнено камерой Vision CAM для тринокулярного микроскопа Meiji Techno с использованием интегрированного адаптера и разъема C-mount (ув. x 600)

Описание микропрепарата. В препарате в поле зрения микроскопа видны яйцевые клетки, лежащие в полости матки. Они находятся на разных стадиях развития, поэтому на одном препарате можно рассмотреть все стадии митоза.

Рассматривают стадии двух, трех и четырех blastomeres. В неделящейся (интерфазной) клетке видно ядро, клеточный центр, гетерогенная цитоплазма. В ядре находится ядрышко. Клеточный центр содержит центриоли, от которых радиально отходят лучи в виде темных нитей. Иногда при недостаточно хорошей окраске отдельных лучей не видно, а вся лучистая сфера выглядит как более темное пятно вокруг центриолей, при этом центриоли прокрашиваются как одно пятнышко, большой плотности.

В *профазе* центриоли начинают расходиться и лежат друг от друга на некотором расстоянии; между ними видна полоска уплотненной цитоплазмы - это нити будущего веретена деления. В поздней профазе отсутствует ядрышко,

разрушена ядерная оболочка, центриоли почти у полюсов; образуется веретено деления. Хромосомы располагаются в виде спутанного клубка.

В *метафазе* хорошо сформировано веретено, образующее митотический аппарат вместе с участком близлежащей цитоплазмы. Оно прокрашивается более темно, чем цитоплазма клетки. Нити веретена сходятся у полюсов, веретено имеет ромбовидную форму. Две или четыре хромосомы расположены на экваторе, их концы направлены к периферии клетки, а кинетохоры - к центру. Все кинетохоры лежат в одной плоскости, к ним прикреплены нити веретена деления.

В *анафазе* хромосомы передвигаются к полюсам. Видно, что пары хромосом лежат на некотором расстоянии друг от друга. Нити веретена укорочены. В поздней анафазе хромосомы локализуются у полюсов, их число установить трудно, они имеют вид спутанного клубка. Расхождение к полюсам начинается в области кинетохоров и распространяется к концам плеч хромосом. Левые и правые плечи иногда начинают неравномерное разъединение и, можно видеть, что дочерние хромосомы еще сцеплены на концах одного плеча. Яйцеклетка слегка вытянута в направлении полюсов. В отдельных яйцеклетках, где хромосомы значительно продвинулись, между ними видна межзональная область. Плотность цитоплазмы здесь меньше, появляется перетяжка.

В *телофазе* хромосомы спутываются в клубок, а в более поздней телофазе уже видны глыбки хроматина. Вокруг клубка хромосом образуется ядерная оболочка, формируется ядрышко. В цитоплазме видна глубокая перетяжка, которая в поздней телофазе делит материнскую клетку на две дочерние клетки. В телофазе происходит распад митотического аппарата.

Рассмотреть и зарисовать в своем рабочем альбоме все стадии деления животной клетки.

Контрольные вопросы

1. Дайте характеристику процессам, происходящим в разных фазах митоза.
2. Жизненный цикл клетки. Опишите события, происходящие в разные фазы клеточного цикла.
3. Опишите основные фазы мейоза и раскройте его биологическое значение.

ЗАНЯТИЕ № 11

ТЕМА: Включения в цитозоле эукариотических клеток

Цель: Изучить основные типы клеточных включений в животной и растительной клетках и их роль в процессах жизнедеятельности эукариотической клетки.

Задачи:

1. Провести сравнительный анализ видов и особенностей клеточных включений в растительных и животных клетках.

2. Рассмотреть и зарисовать основные виды включений на готовых микропрепаратах:
 - Включения гликогена в клетках печени аксолотля
 - Секреторные включения в клетках Лейдига аксолотля.
 - Жировые включения в клетках печени аксолотля.
 - Пигментные включения в хроматофорах в коже головастика.
 - Желточные включения в бластомерах амфибий.
 - Гранулы зимогена в клетках поджелудочной железы.
3. С помощью альбома электронных микрофотографий изучить и зарисовать ультраструктуру гранул гликогена (рис. 13) и капель жира (рис. 14) в животных эукариотических клетках.

Материалы и оборудование

Микроскоп Meiji Techno серии МТ 4000, готовые микропрепараты, альбом электронных микрофотографий, учебно-методическое пособие.

Теоретическая часть

Клеточные включения – это непостоянные компоненты цитозоля, представляющие собой отложения веществ, временно выведенных из метаболизма клетки, конечные его продукты, возникающие на определенном этапе жизнедеятельности клетки, а также вещества, поглощенные клеткой из окружающей среды путем фагоцитоза или пиноцитоза. Включения представляют собой локальные концентрации веществ, которые вырабатываются в процессе секреции и пигментирования, в разных компартментах клетки (гиалоплазме, митохондриях, пластидах, ядре и т.п.). Вещества, возникающие в результате деятельности цитоплазмы, называются *эргастическими*. Являясь продуктами метаболизма клетки, включения отражают различные стороны и этапы ее биологической активности. Химическая природа включений разнообразна. К ним относятся капли и зерна белков, углеводов, жиров, а также кристаллические включения (органические кристаллы, которые могут образовывать в клетках белки, соли щавелевой кислоты и т.д., и неорганические кристаллы, образованные солями кальция). В отличие от органоидов клетки включения не имеют мембран или элементов цитоскелета, периодически синтезируются и расходуются.

Разнообразные включения в цитозоле эукариотических клеток подразделяются на следующие категории:

1. Трофические (капельки жира, белковые гранулы, глыбки гликогена).
2. Пигментные (гемоглобин, меланин, липофусцин)
3. Секреторные (гранулы зимогена).
4. Экскреторные (желчные кислоты, мочевиная кислота).
5. Рекреторные (капельки воды).

6. Специфические (витамины, родопсин).

Особенности включений растительных и животных клеток обусловлены, во-первых, разным характером обмена веществ. У растений преимущественно *анаболический* (пластический или ассимиляционный) тип метаболизма, приводящий к усвоению, накоплению, синтезу органических веществ. У животных преимущественно *катаболический* (диссимиляционный) тип метаболизма, связанный с реакциями расщепления сложных органических соединений клетки. Во-вторых, связаны со строением и функциональными особенностями выделительной системы: *накопительной* – в растительных, активно *выделительной* – в животных клетках.

Включения растительной клетки

Углеводные включения. У растений являются главными запасными энергетическими веществами. Это наиболее распространенные и важные включения в растительных клетках. К ним относится, в первую очередь, крахмал, откладывающийся в виде крахмальных зерен в амилопластах.

Крахмал – полисахарид, полимер глюкозы. Молекула крахмала состоит из амилазы и амилопектина. Линейные цепи амилазы способны свертываться в растянутую спираль. Амилопектин разветвлен и содержит гораздо больше глюкозных остатков. В крахмальных зернах содержится приблизительно 25% амилазы и 75% амилопектина. Различают два типа крахмальных зерен:

1. Первичный (транзитный) – ассимиляционный крахмал, зерна которого образуются при избытке продуктов фотосинтеза (сахаров). В отсутствие фотосинтеза ассимиляционный крахмал гидролизует до сахаров и транспортируется в различные части растения.
2. Вторичный (запасной) – крахмал, откладывающийся в амилопластах частей растений, лишенных света, из притекающих сюда сахаров из фотосинтезирующих клеток.

Образование крахмальных зерен начинается в определенных точках стромы пластиды – образовательных центрах. Рост зерна происходит последовательно вокруг образовательного центра путем наложения новых слоев крахмала на старые. Смежные слои имеют различный показатель преломления и хорошо визуализируются под микроскопом. с увеличением роста крахмального зерна объем амилопласта увеличивается, а стромы уменьшается.

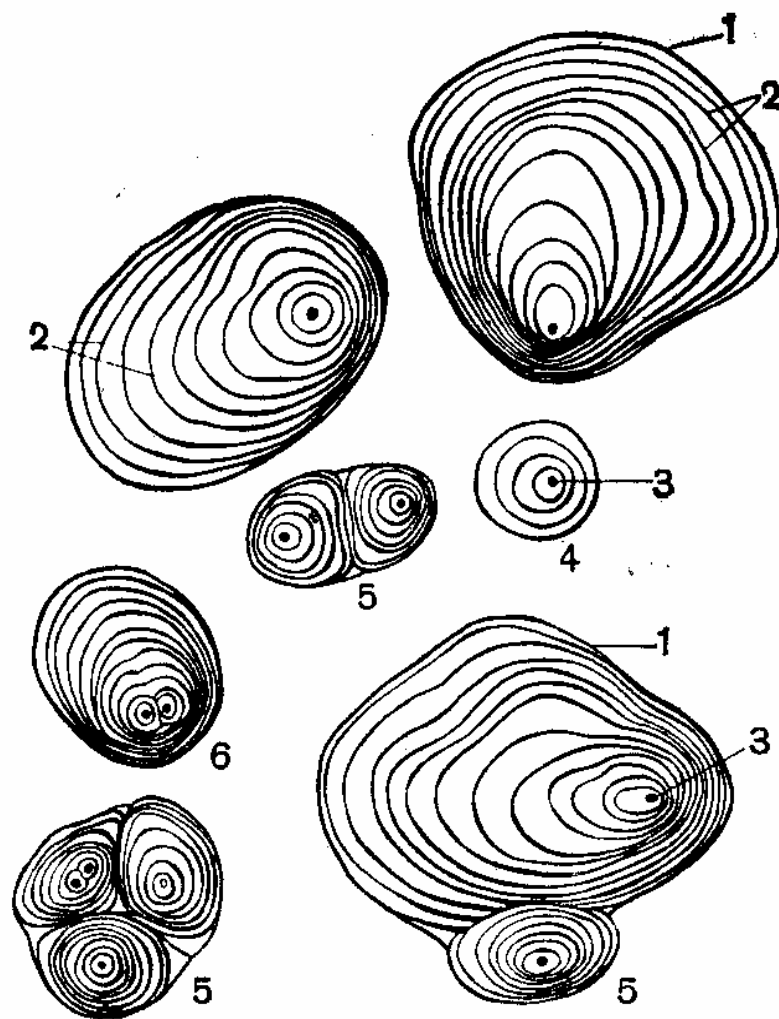


Рис. 35. Крахмальные зерна картофеля [9]:

1– оболочка пластиды; 2– слои крахмала; 3– центр образования; 4– простое зерно; 5 – сложное зерно; 6 – полусложное зерно

Морфологически различают: *простые* крахмальные зерна, имеющие по одному центру образования; *сложные* – с 2-мя – 5-ью центрами образования, каждый из которых окружен собственными крахмальными слоями; *полусложные* – вокруг каждого зерна затем возникают общие слои (**рис. 35**). Слоистость не зависит от влияния внешних факторов, носит эндогенный характер.

В виде углеводных включений в растительных клетках встречается *инулин* – резервный полисахарид, полимер фруктозы. Откладывается в вакуолях клеток корней и клубней растений семейства сложноцветных. *Гемицеллюлоза*, сложная молекула которой построена из пентоз (ксилозы, арабинозы) или гексоз (маннозы, галактозы, фруктозы). Этот полисахарид входит в состав клеточной стенки растений, содержится в древесине (от 17% до 45%), соломе злаков, шелухе семян.

Откладывается в стенках клеток эндосперма (запасяющей ткани семян) у многих пальм и некоторых плодовых растений. Другие сахара, присутствующие в клеточном соке вакуолей (сахароза, глюкоза, фруктоза и др.).

Липидные включения. Эти включения в виде отдельных капель присутствуют в цитоплазме, в пластидах, в сферосомах. Как продукт запаса, жир широко распространен в плодах и семенах многих растений.

Белковые включения. Образуются в различных компартментах клетки: в нуклеоплазме ядра, в гиалоплазме, в строме пластид, в расширенных цистернах ЭПР, в матриксе пероксисом и митохондрий, в вакуолях. Размеры белковых включений от 8 до 12 мкм. Запасной белок – алейрон – характерен для запасяющей ткани семени. Он представлен простыми белками. При созревании семян содержимое вакуоли затвердевает, превращаясь в алейроновое зерно, окруженное мембраной вакуоли. Алейроновые зерна могут быть простыми и сложными. Простые имеют гомогенную структуру (бобовые, рис, кукуруза и др.) (рис. 36).

Сложные содержат включения в виде аморфных или кристаллических отложений белка и глобулоидов, представляющих собой вместилища фосфорных соединений (лен, подсолнечник, тыква, горчица, клеверщина и др.).

При отложении запасного белка в лейкопластах, их называют протеино или алейронопластами.

Отложение минеральных веществ. В процессе жизнедеятельности растительных клеток образуются разные органические кислоты. Из них наиболее распространена щавелевая кислота. При ее взаимодействии с ионами кальция, поступающими в растение вместе с почвенными растворами, возникает нерастворимый в воде щавелевокислый кальций (оксалат кальция), образующий кристаллы разной формы. Такие кристаллы откладываются только в вакуолях.

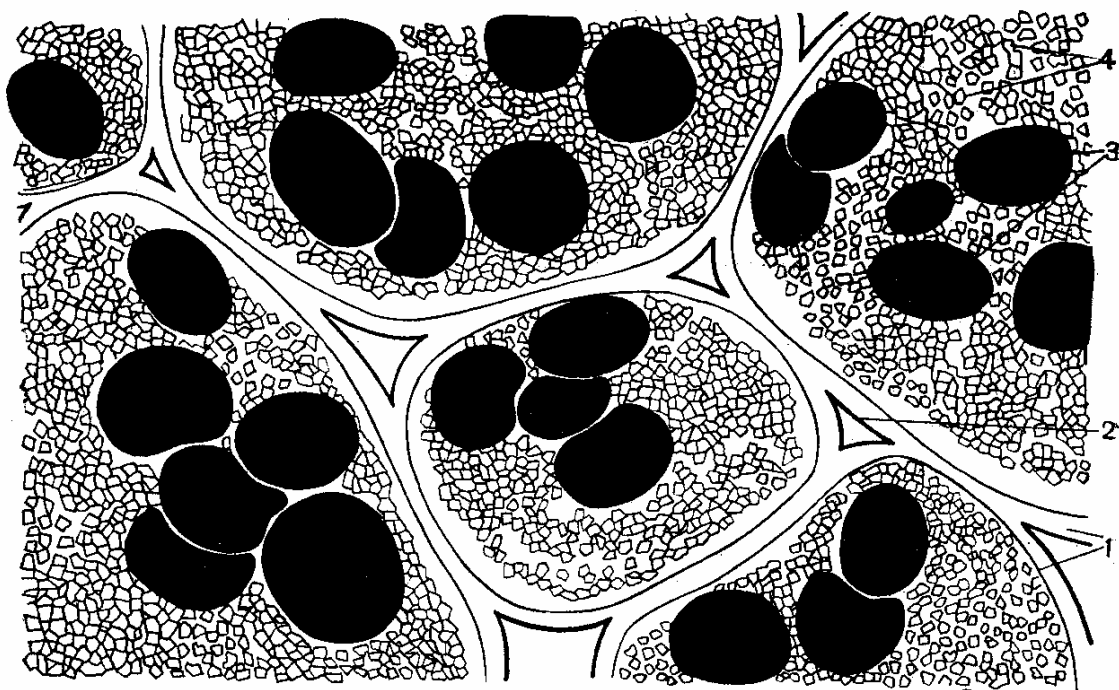


Рис. 36. Клетки семядоли гороха с крахмальными и алейроновыми зернами [9]:
1– оболочка клетки; 2– межклетник; 3 – крахмальные зерна; 4 – алейроновые зерна

Моногидраты оксалата кальция ($CaC_2O_4 \cdot H_2O$) чаще всего представлены крупными одиночными кристаллами призматической или клиноромбической формы (**рис. 37**). Дигидраты ($CaC_2O_4 \cdot 2H_2O$) представлены сросшимися кристаллами, называемыми друзами (**рис. 38**), и рафидами – игольчатыми кристаллами, составляющими плотные компактные пачки (**рис. 39**). Тригидраты ($CaC_2O_4 \cdot 3H_2O$) – более или менее кубическими кристаллами.

Кроме оксалатов в растительных клетках встречаются отложения извести, которые инкрустируют клеточную стенку. Из других минеральных веществ довольно обычен кремнезем, который находится либо в оболочках (хвощи), либо образует прозрачные тельца, заполняющие полость клетки (эпидермальные клетки листьев тростника). Кремнезем и известь – зольные вещества, их включение в оболочку – пассивный процесс, т.к. они представляют собой минеральные соединения, которые остаются в оболочке после того, как пропитывающая их вода испарится в процессе транспирации. Известь, кроме того, способна откладываться в виде цистолитов – крупных гроздевидных тел (**рис. 40**).

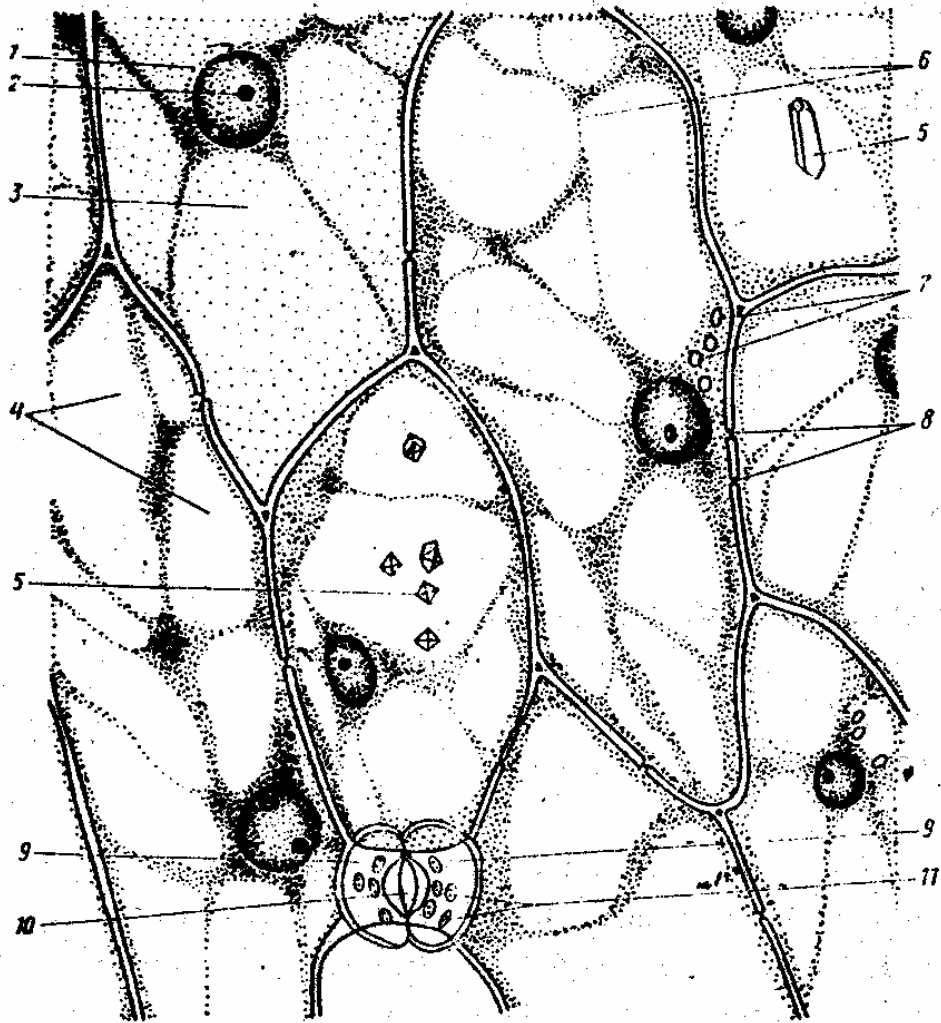


Рис. 37. Клетки эпидермиса внутренней чешуи луковицы лука [9]:

1 – ядро; 2 – ядрышко; 3 – цитоплазма; 4 – вакуоли; 5 – кристаллы оксалата кальция; 6 – тяжи цитоплазмы; 7 – капли масла; 8 – поры; 9 – замыкающие клетки; 10 – устьичная щель; 11 – хлоропласты

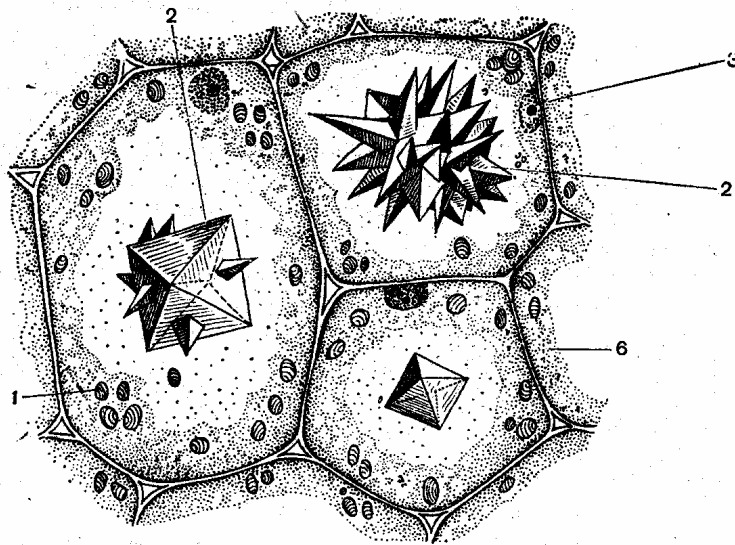


Рис. 38. Кристаллы щавелевокислого кальция в вакуолях клеток [9]:
 1 – крахмальные зерна; 2 – друзы; 3 – ядро; 4 – рафиды; 5 – вакуоли; 6 – цитоплазма

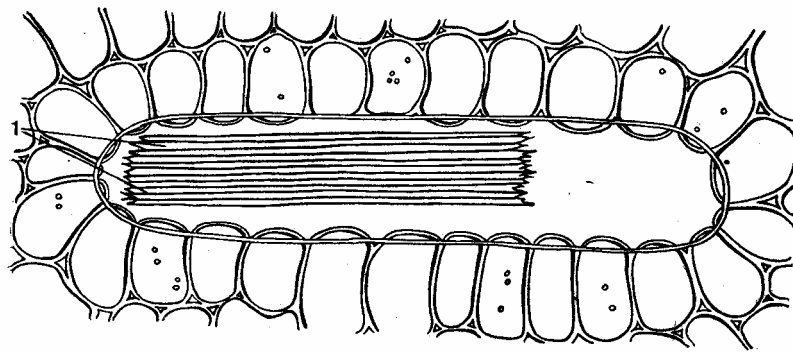


Рис. 39. Рафиды (1) в клетках листа агавы [9]

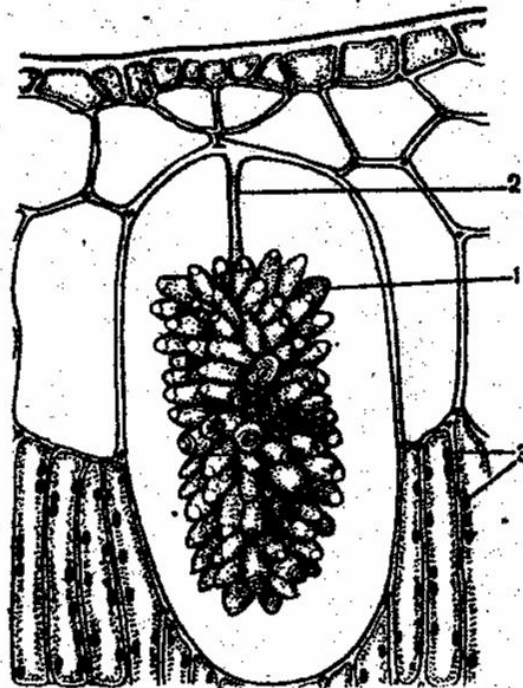


Рис. 40. Цистолит в клетке листа фикуса [9]:
1 – цистолит; 2 – ножка цистолита; 3 – хлоропласты

Включения животной клетки

По своему биологическому значению включения животных клеток могут быть разделены на три группы: *трофические, секреторные и специфические*.

Трофические включения, отражающие повседневный метаболизм клеток, представлены в цитоплазме липидами, гранулами белка или гликогена и продуктами распада. Все эти вещества в последствии ассимилируются клеткой и входят в ее состав.

Липидные включения. В малых количествах жировые включения, в виде нейтрального жира, постоянно присутствуют практически в любой клетке. Эти же вещества в значительно большем объеме накапливаются в жировых клетках соединительной ткани, в клетках печени (гепатоцитах) рыб и амфибий (*рис. 41*). При обработке ткани четырехокисью осмия с последующей докраской ядерным красителем видно, что в цитоплазме гепатоцитов локализуются черные (адсорбировавшие осмий) жировые капли, разного размера. Первоначально синтезированный в клетках жир откладывается в виде мельчайших капель, сливаясь между собой, они образуют капли большего размера.

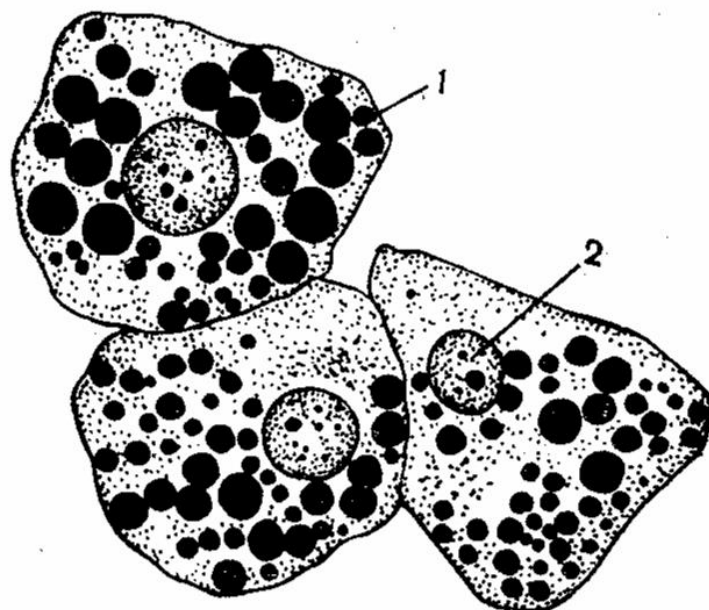


Рис. 41. Жировые включения в клетках печени аксолотля [9]:
1 – капли жира. 2 – ядра клеток

Включения гликогена. В виде глыбчатых скоплений обнаруживаются главным образом в цитоплазме гепатоцитов и клетках поперечно-полосатых мышечных волокон. Более мелкие гранулы гликогена могут присутствовать в ядрах клеток (интрануклеарный гликоген). Накопление гранул гликогена происходит в канальцах агранулярного ЭПР и цистернах комплекса Гольджи.

Белковые включения. Встречаются относительно редко. Примером их могут служить неправильной формы глыбки в клетках печени некоторых позвоночных, многочисленные желточные зерна в овоцитах и яйцевых клетках, имеющие формы пластин, шариков, дисков и веретен.

Продукты процессов диссимиляции. К этой группе можно отнести целый ряд веществ, пигментов, родни из которых подлежат периодическому удалению из клетки путем экскреции (желчные пигменты и др.); другие – выходят из цитоплазмы только после гибели клетки, подвергаясь фагоцитозу макрофагами. К таким веществам следует отнести: *липофусцин* – желтый или коричневый пигмент, гранулы которого накапливаются в нервных клетках, волокнах миокарда, гепатоцитах, клетках почек и надпочечниках и др., в процессе старения клеток; *ретинин* – входящий в состав зрительного пурпура палочек сетчатки глаза.

Секреторные включения характерны для железистых клеток и содержат в себе продукты, выводящиеся из клетки и имеющие определенное, иногда строго специфическое значение для нормального функционирования организма. Так, например, секреторные включения в цитоплазме клеток сальной железы кожи, являются жировыми капельками, которые, в отличие от трофических жировых включений, поступают в проток железы и входят в состав смазки

волос и эпидермиса. Секреторные включения в клетках желез желудочно-кишечного тракта содержат такие важные вещества, как ферменты, в клетках эндокринных желез – гормоны. В химическом отношении секреторные включения в виде гранул имеют или белковую (гранулы белка в слюнных железах и гранулы зимогена в клетках поджелудочной железы) или липидную (жировые капельки в сальных и молочных железах) природу. Либо представлены гликопротеинами (мукоидный секрет в железистых клетках желудка).

Специфические включения представлены разнородной по химической природе и функциональному значению группой. Эти включения образуются в ходе специфического метаболизма клетки. Сюда относятся широко распространенные в тканях включения бурого пигмента *меланина*. Гранулы меланина имеют округлую или палочковидную форму, размером от 0,1 до 6,0 мкм. Присутствуют в пигментных клетках (меланоцитах), клетках нервной ткани (вегетативных ганглиях, черной субстанции головного мозга). Отдельные гранулы меланина состоят из двух частей: умеренно плотного протеинового тела и большого числа мелких осмиофильных гранул, расположенных по периферии. В химическом отношении гранулы меланина содержат: белок – 30%, липиды – 1-5%, углеводы – 5-10%, РНК – 0,3%, в следовых количествах присутствуют металлы – медь, цинк, железо.

К специфическим включениям следует отнести красный дыхательный пигмент *гемоглобин*, содержащийся в цитоплазме эритроцитов, *зернистые гранулы лейкоцитов* крови и *гранулы тучных клеток* рыхлой соединительной ткани. В гранулах тучных клеток присутствует гепарин (от 2,7 % до 4,6%) и гистамин (1,1%).

Как своеобразная форма специфических включений интересны редко встречающиеся в клетках Лейдига и фолликулах щитовидной железы *белковые кристаллы* или *кристаллоиды*. Включения, являющиеся продуктами специфического метаболизма, связанного или с процессами дифференцировки (*гранулы кератоглиана* в ороговевающем эпителии), либо с патологией клеток (*капли слизи* в соединительной ткани, костях, хрящах при слизистом перерождении).

Практическая часть

1. Изучить и зарисовать в рабочем альбоме готовый микропрепарат: «*Включения гликогена в клетках печени аксолотля*» (рис. 42).

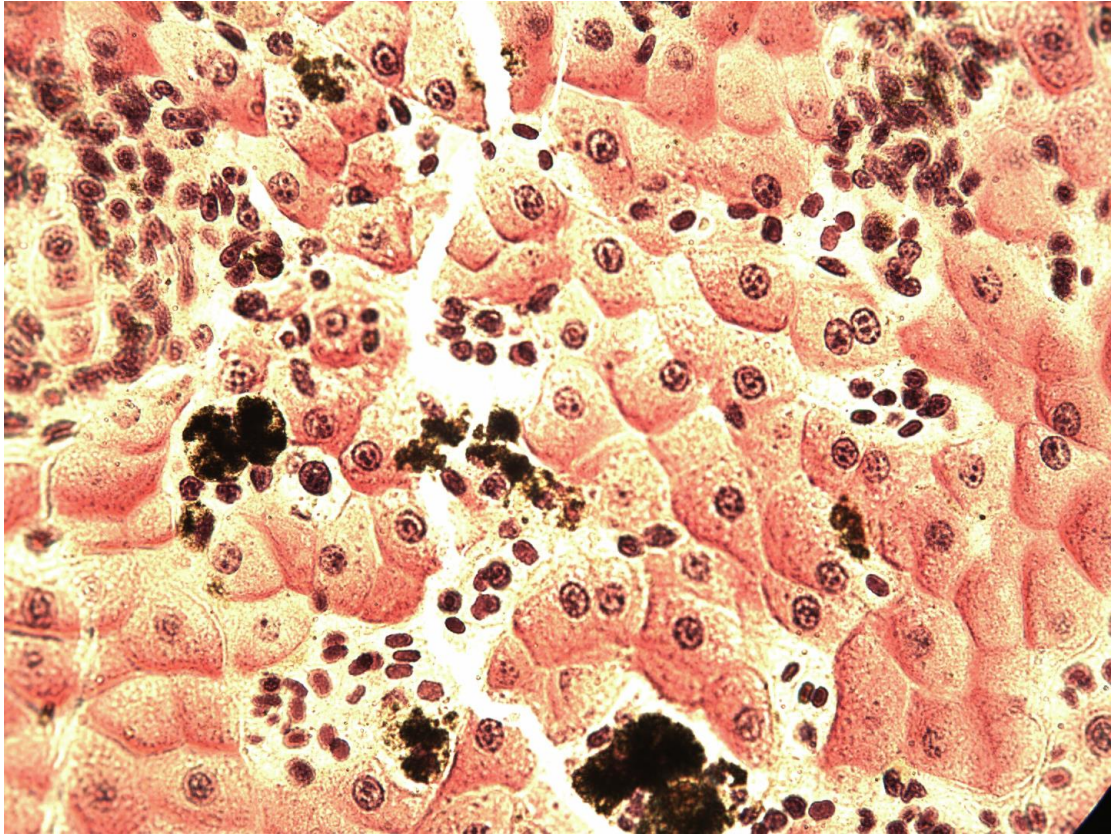


Рис. 42. Гранулы гликогена в клетках печени аксолотля. Цифровое изображение препарата выполнено камерой Vision CAM для тринокулярного микроскопа Meiji Techno с использованием интегрированного адаптера и разъема C-mount (ув. х 600)

Описание микропрепарата. Печень представляет собой орган, в котором депонируются сахара и постоянно идут процессы синтеза и расщепления гликогена. На большом увеличении микроскопа (х20; х40) в клетках паренхимы печени обнаруживается большое количество глыбок гликогена, окрашенных в красно-фиолетовый цвет. Глыбки имеют разную формы и величину. Смещение гликогена ближе к одной стороне клетки является артефактом и вызвано проникновением фиксатора в клетку при изготовлении препарата.

Рассмотреть при большом увеличении и зарисовать в своем рабочем альбоме микропрепарат, сделать обозначения.

2. Изучить и зарисовать готовый микропрепарат: «*Секреторные включения в клетках Лейдига аксолотля*» (рис. 43).

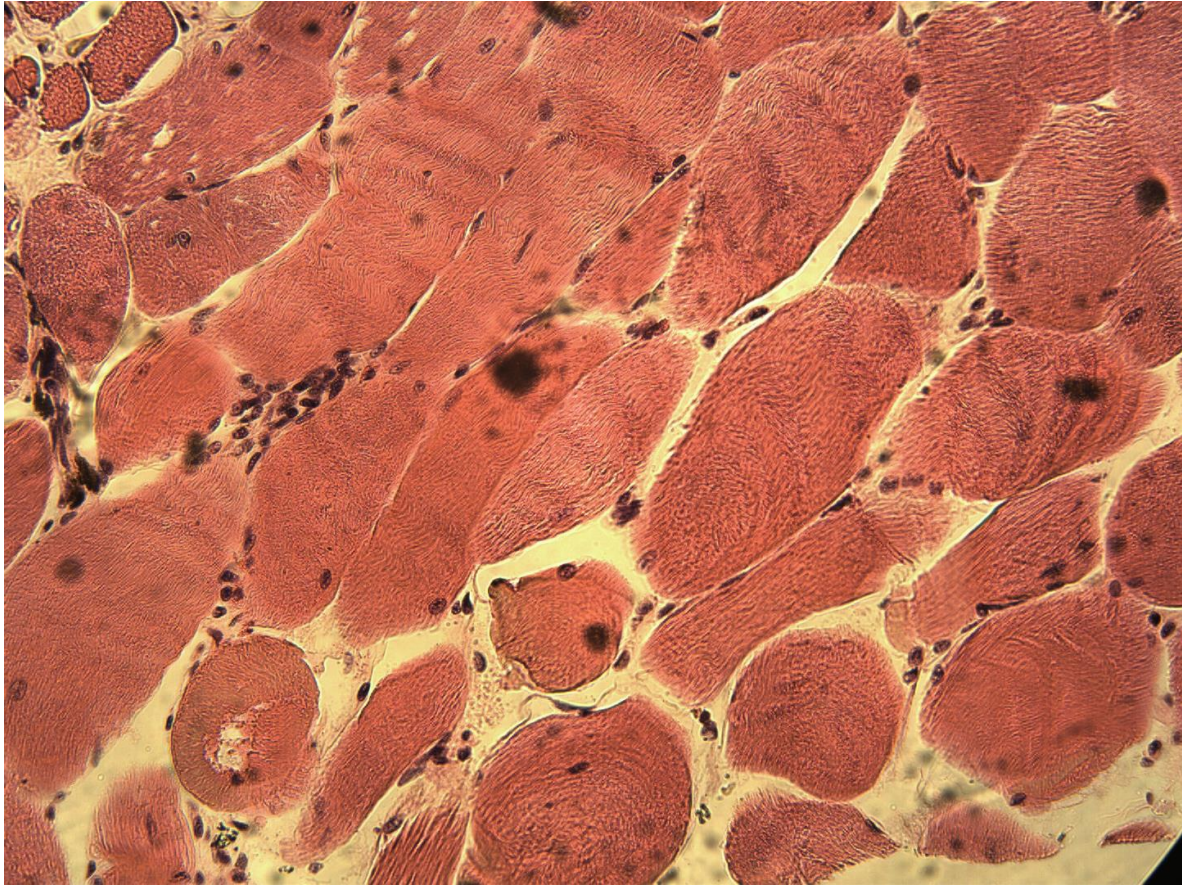


Рис. 43. Секреторные включения в клетках Лейдига аксолотля. Цифровое изображение препарата выполнено камерой Vision CAM для тринокулярного микроскопа Meiji Techno с использованием интегрированного адаптера и разъема C-mount (ув. x 600)

Описание микропрепарата. Клетки Лейдига (интерстициальные клетки) – особые железистые клетки, выполняющие трофическую функцию и участвующие в выработке стероидного гормона. Они разбросаны небольшими группами или поодиночке в рыхлой соединительной ткани. Каждая клетка имеет одно эксцентрично расположенное ядро и вакуолизированную цитоплазму, содержащую липидные включения, мукопротеиды, гранулы пигмента и др. Секреторные включения лишены оболочек, в их образовании принимают активное участие элементы агранулярного ЭПР и комплекса Гольджи.

Рассмотреть при большом увеличении и зарисовать в своем рабочем альбоме микропрепарат, сделать обозначения.

3. Изучить и зарисовать готовый микропрепарат: **«Жировые включения в клетках печени аксолотля» (рис. 44).**

Описание микропрепарата. При большом увеличении микроскопа (x40) видно, что в клетках печени откладывается большое количество жировых включений. При обработке ткани четырех окисью осмия с последующей окраской срезов кармином видно, что в цитоплазме гепатоцитов локализуются черные (адсорбировавшие осмий) жировые капли. Эти капли могут быть разного размера. Количество их тоже варьирует. Первоначально

синтезированный в клетке жир откладывается в вид мельчайших капель. Эти капли, сливаясь между собой, образуют капли большого размера

Рассмотреть при большом увеличении и зарисовать в своем рабочем альбоме микропрепарат, сделать обозначения.

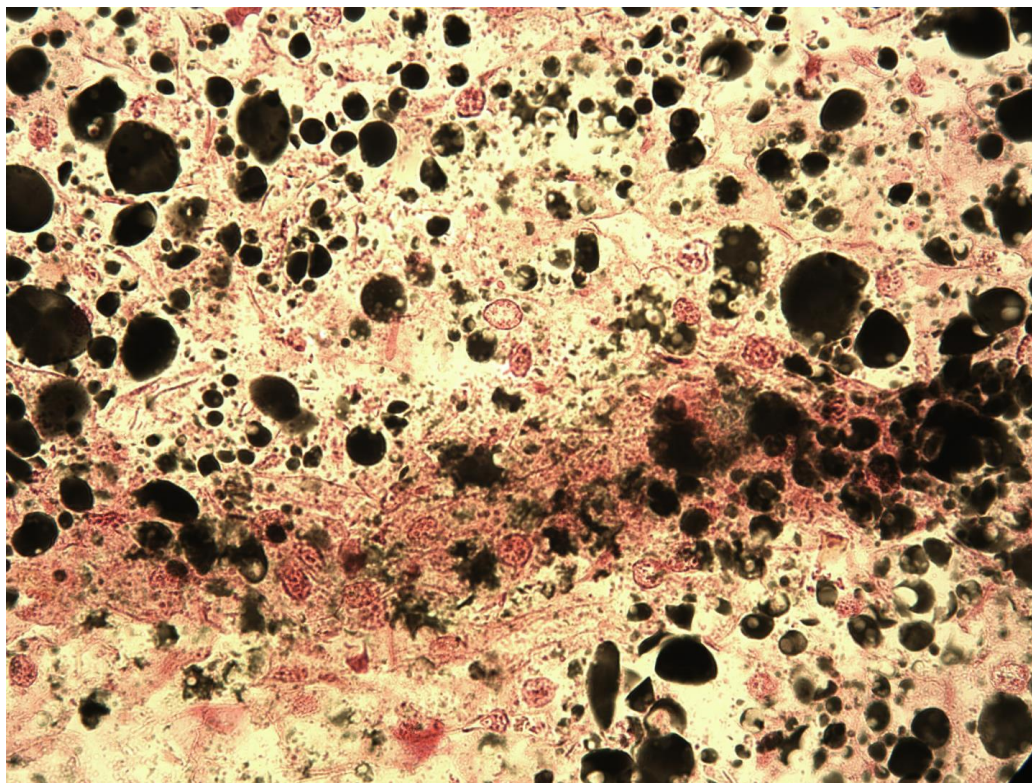


Рис. 44. Жировые включения в клетках печени аксолотля. Цифровое изображение препарата выполнено камерой Vision CAM для тринокулярного микроскопа Meiji Techno с использованием интегрированного адаптера и разъема C-mount (ув. х 600)

3. Изучить и зарисовать готовый микропрепарат: **«Пигментные включения в хроматофорах в коже головастика»** (рис. 45).

Описание микропрепарата. На неокрашенных препаратах при большом увеличении микроскопа (х20) видны пигментные клетки звездчатой формы. В них содержатся серые и черные гранулы меланина.

Рассмотреть при большом увеличении и зарисовать в своем рабочем альбоме микропрепарат, сделать обозначения.

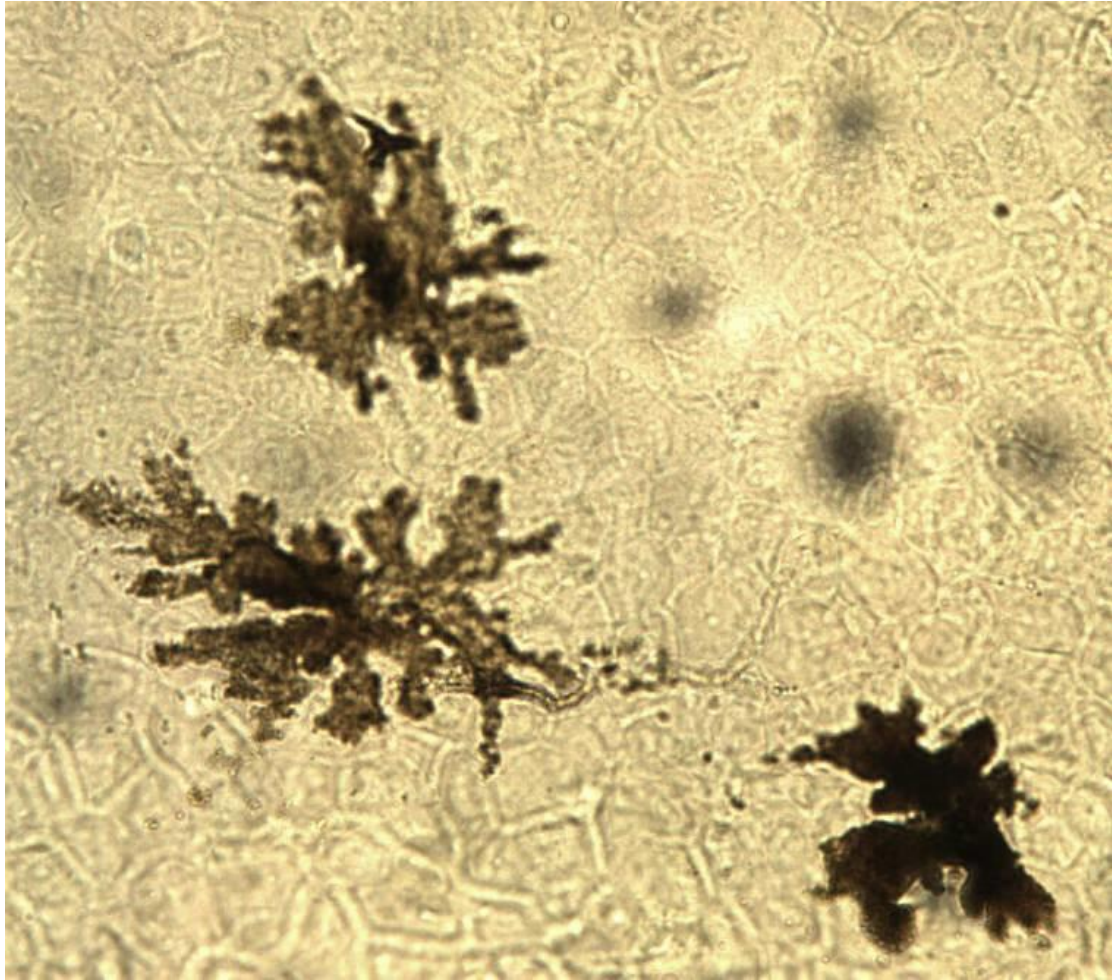


Рис. 45. Пигментные включения в хроматофорах в коже головастика. Цифровое изображение препарата выполнено камерой Vision CAM для тринокулярного микроскопа Meiji Techno с использованием интегрированного адаптера и разъема C-mount (ув. х 300)

4. Изучить и зарисовать готовый микропрепарат: «**Желточные включения в бластомерах амфибий**» (рис. 46).

Описание микропрепарата. При большом увеличении микроскопа (x20) видны многочисленные зерна, имеющие форму шариков, желтого цвета в яйцевых клетках амфибий. Желточные включения состоят из протеиновых макромолекул, образующих кристаллоподобные структуры. Материал желточных зерен образуется в цистернах гранулярного ЭПР и имеет белковую природу.

Изучить при большом увеличении и зарисовать в своем рабочем альбоме микропрепарат, сделать обозначения.

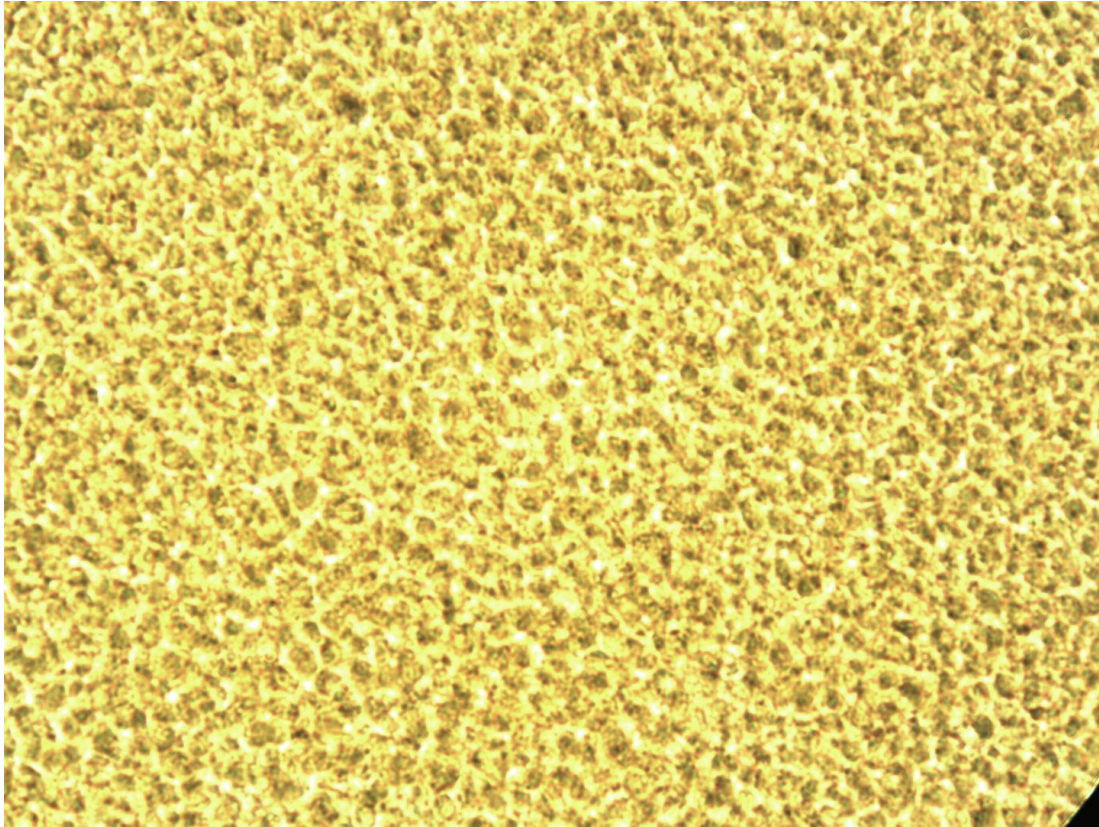


Рис. 46. Желточные включения в бластомерах амфибий. Цифровое изображение препарата выполнено камерой Vision CAM для тринокулярного микроскопа Meiji Techno с использованием интегрированного адаптера и разъема C-mount (ув. x 300)

5. Изучить и зарисовать готовый микропрепарат: *«Гранулы зимогена в клетках поджелудочной железы»* (рис. 47).

Описание микропрепарата. На срезе поджелудочной железы при малом увеличении микроскопа (x10) хорошо видны экзокринные концевые отделы – ацинусы округлой или удлинённой формы с узкими просветами. В просветах, в центре ацинуса располагаются мелкие центроациназные клетки. Ацинусы построены из секреторных клеток – панкреацитов, вырабатывающих пищеварительные ферменты (трипсиноген, амилазу, мальтазу, лактазу, липазу, нуклеазу). Ацинарные отделы переходят в систему протоков с постепенно увеличивающимся диаметром просвета.

На препарате следует внимательно рассмотреть ацинарные клетки. Они имеют коническую форму и резко выраженную полярность. В апикальной части клетки находится секрет в виде скоплений гранул, в средней, или базальной, части располагается ядро.

Изучить при большом увеличении и зарисовать в своем рабочем альбоме микропрепарат, сделать обозначения.

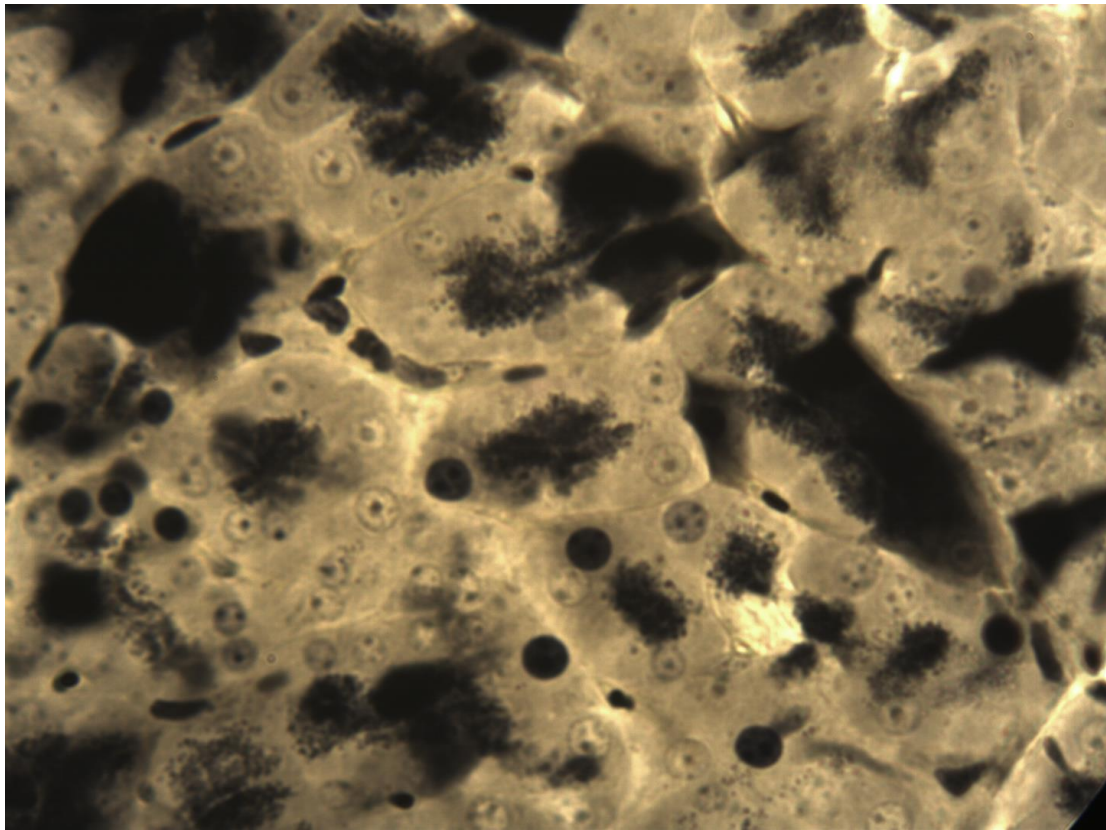


Рис. 47. Гранулы зимогена в клетках поджелудочной железы амфибий. Цифровое изображение препарата выполнено камерой Vision CAM для тринокулярного микроскопа Meiji Techno с использованием интегрированного адаптера и разъема C-mount (ув. x 300)

6. Изучить и зарисовать в своем рабочем альбоме ультраструктуру гранул гликогена (рис. 13) и ультраструктуру жировых включений (рис. 14) в животных клетках, используя «Альбом электронных микрофотографий».

Контрольные вопросы и задания

1. Что представляют собой клеточные включения, и каково их значение в процессах жизнедеятельности клетки?
2. Как можно классифицировать клеточные включения по химической природе?
3. Назовите основные углеводные включения растительной клетки.
4. Какие липидные и белковые включения образуются в растительных клетках?
5. На какие группы разделяются включения в цитозоле животных клеток?
6. Чем обусловлены особенности включений растительных и животных клеток?
7. Заполните таблицу:

Особенности клеточных включений

Включения	Растительная клетка	Животная клетка
Белковые		
Липидные		
Углеводные		

Раздел 4. ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

Согласно учебному плану по дисциплине «Цитология» предусмотрено проведение или контрольных работ или коллоквиумов (по усмотрению преподавателя). Далее приводятся перечень тем, по которым целесообразна оценка знаний студентов.

4.1. ТЕМЫ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ СТУДЕНТОВ

Тема 1. Световой микроскоп

Световая микроскопия. Правила обращения с микроскопом. Компоненты микроскопа. Механическая часть микроскопа: основание или станина, штатив, коаксиальные винты фокусировки препарата, предметный столик, смотровая головка. Оптическая часть: осветитель с полевой диафрагмой, конденсор с апертурной диафрагмой, объективы, бинокулярная насадка. Характеристики микроскопа: общее увеличение, разрешающая способность, парфокальность, центрирование. Настройка межзрачкового расстояния по глазам наблюдателя. Настройка освещения по Кёлеру.

Тема 2. Поверхностный аппарат клетки (мембранном)

Цитоплазматическая мембрана. Современные представления о строении мембран. Характеристика липидного бислоя. Мембранные белки: интегральные, полуинтегральные и периферические. Мембранные углеводы. Клеточная стенка. Основные компоненты клеточной стенки. Функции клеточных стенок. Особенности мембран и надмембранных структур прокариотических клеток.

Надмембранные структуры эукариотических клеток. Собственно надмембранные структуры – гликокаликс. Производные надмембранного комплекса.

Субмембранная система гиалоплазмы. Периферическая гиалоплазма и структурно-оформленная опорно-сократимая система. Микрофибриллярная система или система микрофиламентов (актин-миозиновая система). Строение и функции микрофиламентов. Тубулиновая система или система микротрубочек (тубулин-динеиновая система). Строение и функции. Система промежуточных и система тонких филаментов. Их функция и строение.

Проявление единства subsystemов поверхностного аппарата клетки в реализации основных функций: барьерной, транспортной, рецепторной и контактной. Мембранный транспорт макромолекул и частиц; экзоцитоз и эндоцитоз. Основные типы эндоцитоза: жидкостный, неспецифический адсорбционный и рецепторный.

Контактная функция плазматической мембраны. Межклеточные контакты. Адгезионные(механические): поясковые десмосомы, точечные

десмосомы и полудесмосомы. Замыкающие контакты: плотный, промежуточный (зона слияния). Проводящие контакты: щелевой контакт, химические синапсы и плазмодесмы.

Тема 3. Органоиды энергетического обмена (митохондрии, хлоропласты, сопрягающие мембраны)

Митохондриальный аппарат (хондриом). Морфология, локализация и структура митохондрий. Наружная, внутренняя мембраны, межмембранное пространство и внутримитохондриальный матрикс. Состав и свойства наружной и внутренней мембран митохондрий. Кристы, грибовидные тельца. Локализация в мембранах основных звеньев окислительного фосфорилирования. Межмембранные пространства как резервуар водородных ионов (протонов). Механизм возникновения электрохимического протонного градиента. Митохондрия как полуавтономный органоид. Матрикс митохондрий: РНК, рибосомы, ДНК и белки митохондрий. Основные функции митохондрий.

Фотосинтетический аппарат (пластидом). Связь между пластидами разных типов: лейкопласты, хлоропласты, амилопласты, хромопласты. Хлоропласта - энергообразующие органоиды растительных клеток. Видовое разнообразие хлоропластов и их эволюционные связи. Морфология, химический состав, ультраструктура хлоропластов. Строение наружной, внутренней и тилакоидной мембран хлоропласта. Локализация в тилакоидных мембранах ферментных систем фотоокислительного фосфорилирования.

Механизм возникновения протондвижущей силы. Функции хлоропластов. Хлоропласт – как полуавтономный органоид.

Тема 4. Вакуолярная система

Эндоплазматический ретикулум (ЭПР). Гладкий эндоплазматический ретикулум. Строение и химический состав. Синтез липидов, полисахаридов, жиров, стероидов и других молекул в гладком ЭПР. Роль гладкого ЭПР в детоксикации различных веществ. Шероховатый (гранулярный) ЭПР.

Эргастоплазма. Строение и биохимия шероховатого ЭПР. Функция синтеза, накопления и транспорта синтезированного белка. Гликозилирование белков в ЭПР. Связь гранулярного ЭПР с ядерной оболочкой и комплексом Гольджи.

Комплекс Гольджи. Общая характеристика, локализация в клетке, ультраструктура. Строение диктиосом. Вертикальная и горизонтальная полярность диктиосом: формирующейся (цис-), медиальный и зрелый (транс-) полюсы диктиосом. Функции комплекса Гольджи: сегрегация, накопление, созревание и выведение белков и липидов. Транспортные пузырьки комплекса Гольджи.

Лизосомы. Структура лизосом и их химическая характеристика. Типы лизосом: первичные, вторичные, телолизосомы (остаточные тельца) и аутофагосомы. Гетерофагический и аутофагический циклы в клетке.

Реконструктивная функция лизосом. Связь лизосом с процессами внутриклеточного пищеварения, с фагоцитозом и с работой комплекса Гольджи.

Пероксисомы (микротельца). Структура пероксисом. Их химическая характеристика. Функциональное значение пероксисом. Специализация пероксисом на проведении окислительных реакций с помощью фермента каталазы.

Вакуоли. Вакуоли растительных и животных клеток. Функции вакуолей. Структурная и функциональная взаимосвязь всех компартментов вакуолярной системы.

Тема 5. Ядерный аппарат (кариом)

Роль ядра в жизни клетки и его значение в переносе информации от ДНК к белку. Основные функции ядра: транскрипция, редупликация и перераспределение генетического материала. Интерфазное ядро. Основные элементы его структуры: совокупность интерфазных хромосом (хроматин или ДНП интерфазного ядра), поверхностный аппарат ядра, ядерный сок (кариоплазма) и ядрышко.

Хроматин, его химическая характеристика. Разновидности хроматина: деспирализованный эухроматин, конденсированный гетерохроматин и факультативный гетерохроматин. Функциональное значение типов хроматина.

Белки хроматина: гистоны и негистоновые белки. Функция гистонов, как регуляторов транскрипции и укладки молекул ДНК. Структурная организация хроматина. Несколько уровней упаковки ДНК: элементарная хромосомная фибрилла, нуклеосома, хроматиновое волокно, петельный домен, конденсированный хроматин, метафазная хромосома.

Поверхностный аппарат ядра. Основные компоненты поверхностного ядерного аппарата: ядерная оболочка, периферическая плотная пластинка (ламина) и поровые комплексы. Ламина – скелет поверхностного аппарата ядра. Связь ламин с гетерохроматином хромосом. Функции поверхностного аппарата ядра.

Кариоплазма. Химический состав.

Ядрышко. Химия ядрышка, РНК ядрышка. Три основных компонента ядрышка: ДНК ядрышкового организатора, гранулярный и фибриллярные компоненты. Организация ядрышка. Сегрегация ядрышка.

Строение и химия рибосом. Структурно-биохимическая организация рибосом, их роль в синтезе белка. Амплификация генов рибосомных РНК.

Тема 6. Общая характеристика репродукции клеток

Деление клеток. Жизненный цикл клетки: пресинтетическая, синтетическая, постсинтетическая стадии, митоз. Значение этих фаз в жизни клеток. Основные биосинтетические процессы каждого периода интерфазного цикла репродукции эукариотических клеток. Понятие ядерного и клеточного

цикла. Особенности клеточных циклов у растений и животных. Происхождение клеточных циклов.

Деление прокариотических клеток. Особенности репродукции прокариот. Деление эукариотических клеток: амитоз, митоз, мейоз.

Общая схема митоза эукариотических клеток. Временной ход митоза и цитокинеза. Структурно-биохимическая организация митотического аппарата эукариотических клеток. Стадии митоза, их продолжительность характеристика. Цитокинез у животных и растительных клеток: образование клеточной перетяжки и фрагмопласта. Поведение клеточных органелл в процессе митоза. Происхождение митоза. Формы митоза и их эволюционная связь.

Мейоз, стадии мейоза. Конъюгация хромосом, кроссинговер, редукция числа хромосом. Различия между митозом и мейозом. Биологический смысл мейоза.

4.2. ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ ПОДГОТОВКИ

1. Назовите метод, с помощью которого можно установить последовательность этапов химического превращения какого-либо вещества, установить путь изучаемых веществ в клетке:

- 1) метод меченных атомов;
- 2) цитохимический;
- 3) центрифугирование;
- 4) световая микроскопия;
- 5) хроматография.

2. Назовите оптический метод, который позволяет изучить детали строения, движение и взаимодействие живых клеток, перемещение в цитоплазме их структурных компонентов:

- 1) электронная микроскопия;
- 2) фазово-контрастная микроскопия;
- 3) сканирующая микроскопия.

3. Назовите метод, с помощью которого была определена пространственная структура белков и ДНК:

- 1) световая микроскопия;
- 2) изучение в лучах Рентгена;
- 3) электрофорез;
- 4) радиоизотопный;
- 5) электронная микроскопия;
- 6) биохимический/

4. Назовите группу органических соединений, к которым относят хитин животных:

- 1) белки;
- 2) липиды;
- 3) углеводы;

4) нуклеиновые кислоты.

5. Какие жирные кислоты обладают большей подвижностью и более низкой температурой замерзания?

- 1) насыщенные;
- 2) ненасыщенные.

6. Существует явление комплементарности среди химических соединений, когда имеет место пространственное соответствие участков молекул одних химических соединений участкам молекул других химических соединений. Укажите пару химических соединений, в которых отсутствует такое соответствие:

- 1) гормон роста и рецептор гормона роста;
- 2) агглютинин α и агглютиноген А;
- 3) фибрин и фибриноген;
- 4) аденин и Тимин.

7. Третичная структура транспортных РНК имеет специфическую форму.

Назовите ее:

- 1) шар;
- 2) спираль;
- 3) L – образная;
- 4) X – образная;
- 5) палочковидная.

8. Назовите структурный компонент клетки, в состав которого входят белки актин и миозин:

- 1) жгутик;
- 2) ресничка;
- 3) микроворсинка;
- 4) микротрубочка.

9. Существует теория, согласно которой хлоропласты в процессе эволюции произошли от древних сине-зеленых водорослей. Найдите доказательства этой теории среди ответов и укажите факт, который к этим доказательствам НЕ относится:

- 1) способность к синтезу белков;
- 2) единый план строения мембраны;
- 3) размножаются;
- 4) сходство в химическом составе мембран;
- 5) мелкие рибосомы;
- 6) кольцевая ДНК.

10. Назовите химические соединения, молекулы которых в основном обеспечивают такое свойство мембраны, как текучесть:

- 1) олигосахариды;
- 2) белки;
- 3) фосфолипиды;
- 4) АТФ.

11. Какой органоид принимает непосредственное участие в образовании ядерной оболочки во время деления клетки?

- 1) митохондрия;
- 2) лизосома;
- 3) ЭПР;
- 4) плазмалемма.

12. Прежде чем оказаться в лизосоме, ферменты после своего образования проходят через два структурных компонента клетки. Назовите их в той последовательности, в которой через них проходят синтезированные в рибосомах ферменты:

- 1) комплекс Гольджи и ЭПР;
- 2) ЭПР и комплекс Гольджи;
- 3) ЭПР и митохондрии;
- 4) митохондрии и ядро.

13. Укажите структурный компонент клетки, который виден в световой микроскоп:

- 1) митохондрия;
- 2) рибосомы;
- 3) лизосома;
- 4) плазмалемма;
- 5) микротрубочка.

14. В митохондриях происходят различные биохимические процессы. Найдите их среди ответов и укажите процесс, который происходит в клетке за пределами митохондрий:

- 1) цикл Кребса;
- 2) гликолиз;
- 3) окислительное фосфорилирование;
- 4) трансляция;
- 5) редупликация;
- 6) транскрипция.

15. Назовите в митохондрии участок, где расположены белки, транспортирующие электроны от окисляемых низкомолекулярных органических соединений к кислороду:

- 1) наружная мембрана;
- 2) внутренняя мембрана;
- 3) матрикс;
- 4) протонный резервуар.

16. Некоторые мембраны клеток содержат много липидов, в состав которых входит не два, а четыре остатка жирных кислот. Назовите такую мембрану:

- 1) наружная плазматическая мембрана;
- 2) наружная мембрана митохондрий;
- 3) внутренняя мембрана митохондрий;
- 4) мембрана гладкого ЭПР;
- 5) мембрана шероховатого ЭПР;

17. Клетки многих представителей одной из систематических групп животных делятся путем митоза без разрушения ядерной оболочки. Назовите эту группу животных:

- 1) простейшие;
- 2) кишечнополостные;
- 3) насекомые;
- 4) кольчатые черви.

18. Митоз животной клетки по ряду особенностей отличается от митоза растительной клетки. Найдите среди ответов и укажите признак. НЕ относящийся к числу таких особенностей:

- 1) цитоплазма клетки делится путем перетяжки;
- 2) полюса веретена деления содержат центриоли;
- 3) формируются компактные толстые хромосомы.

19. Сколько хроматид входит в состав каждой хромосомы в метафазу первого мейотического деления:

- 1) 1;
- 2) 2;
- 3) 4.

20. В клетке функционирует несколько типов РНК. РНК каждого типа, в свою очередь, бывает нескольких разновидностей. Один тип РНК представлен наименьшим числом разновидностей. Назовите эту РНК:

- 1) тРНК;
- 2) рРНК;
- 3) иРНК.

4.3. ПРИМЕРНЫЙ ПЕРЕЧЕНЬ ВОПРОСОВ К ЭКЗАМЕНУ ПО ДИСЦИПЛИНЕ «ЦИТОЛОГИЯ»

1. Цитология – ее цели и задачи. Этапы в развитии цитологии.
2. Развитие современной цитологии. Выявление ультрамикроскопических особенностей, присущих специализированным клеткам.
3. Современные положения клеточной теории.
4. Методы цитологических исследований. Световая микроскопия – основной метод наблюдения клеток.
5. Дифференциальное центрифугирование – метод получения отдельных клеточных компонентов для цитохимического и биохимического анализа.
6. Клетки прокариот и эукариот. Особенности и различия в их строении.
7. Цитоплазматическая мембрана. Современные представления о строении мембран.
8. Надмембранные структуры эукариотических клеток.
9. Микрофибриллярная система или система микрофиламентов (актин-миозиновая система).
10. Тубулиновая система или система микротрубочек (тубулин-динеиновая система).

11. Проявление единства субсистем поверхностного аппарата клетки в реализации основных функций: барьерной, транспортной, рецепторной и контактной.
12. Мембранный транспорт макромолекул и частиц; экзоцитоз и эндоцитоз.
13. Контактная функция плазматической мембраны. Межклеточные контакты.
14. Адгезионные (механические): поясковые десмосомы, точечные десмосомы и полудесмосомы.
15. Замыкающие контакты: плотный, промежуточный (зона слияния).
16. Проводящие контакты: щелевой контакт, химические синапсы и плазмодесмы.
17. Особенности развития и строения прокариотических клеток. Основные гипотезы происхождения прокариотной клетки и ее компартментов.
18. Цитоплазма (цитозоль). Общий химический состав цитоплазмы. Организация цитозоля.
19. Включения в цитозоле растительных клеток, их локализация и функциональное значение
20. Включения в цитозоле животных клеток, их локализация и функциональное значение.
21. Морфология, локализация и структура митохондрий.
22. Локализация в мембранах митохондрий основных звеньев окислительного фосфорилирования.
23. Митохондрия как полуавтономный органоид.
24. Хлоропласты - энергообразующие органоиды растительных клеток.
25. Эндоплазматический ретикулум (ЭПР). Строение и химический состав.
26. Комплекс Гольджи. Общая характеристика, локализация в клетке, ультраструктура.
27. Лизосомы. Структура лизосом и их химическая характеристика.
28. Пероксисомы (микротельца). Структура пероксисом. Их химическая характеристика. Функциональное значение пероксисом.
29. Структурная и функциональная взаимосвязь всех компартментов вакуолярной системы.
30. Роль ядра в жизни клетки и его значение в переносе информации от ДНК к белку.
31. Основные элементы структуры интерфазного ядра: совокупность интерфазных хромосом (хроматин или ДНП интерфазного ядра), поверхностный аппарат ядра, ядерный сок (кариоплазма) и ядрышко.
32. Разновидности хроматина: деспирализованный эухроматин, конденсированный гетерохроматин и факультативный гетерохроматин. Функциональное значение типов хроматина.
33. Функция гистонов, как регуляторов транскрипции и укладки молекул ДНК. Структурная организация хроматина.
34. Основные компоненты поверхностного ядерного аппарата: ядерная оболочка, периферическая плотная пластинка (ламина) и поровые комплексы.

- 35.Кариоплазма. Химический состав.
- 36.Ядрышко – органоид клеточных рибосом. Химия ядрышка, РНК ядрышка.
- 37.Структурно-биохимическая организация рибосом, их роль в синтезе белка.
- 38.Гипотезы происхождения эукариотической клетки и основных компартментов эукариотических клеток.
- 39.Жизненный цикл клетки: пресинтетическая, синтетическая, постсинтетическая стадии, митоз. Значение этих фаз в жизни клеток.
- 40.Деление прокариотических клеток. Особенности репродукции прокариот.
- 41.Общая организация митоза эукариотических клеток.
- 42.Мейоз, стадии мейоза. Конъюгация хромосом, кроссинговер, редукция числа хромосом.
- 43.Особенности профазы I мейотического деления.
- 44.Основные различия между митозом (непрямым делением и мейозом (редукционным делением).
- 45.Котрансляционный транспорт растворимых белков на мембранах гранулярного ЭПР.
- 46.Клеточный центр: центриоли и диплосома.
- 47.Центросомный цикл в животной клетке.
- 48.Различные типы митоза эукариот.
- 49.Динамика митоза и цитокинеза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Альбом электронных микрофотографий по цитологии / Сост. Е.Б. Романова. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 1999. – 46 с.
2. Билич, Г.Л. Цитология: учебник / Г. Билич, Г.С. Катинас, Л.В. Назарова. – СПб: ДЕАН, 1999. – 112 с.
3. Ботаника. Учебник для вузов: в 4 т. / П. Зитте, Э.В. Вайлер, Й.В. Кадеперайт, А. Брезински, К. Кернет; на основе учебника Э. Страсбургера и др. пер. с нем. Т. 1. Клеточная биология. Анатомия. Морфология / под ред. А.К. Тимонина, В.В. Чуба.– М.: Издательский центр «Академия», 2007.– 368 с.
4. Грин, Н. Биология: В 3 т. / П. Грин, У. Стаут, Д. Тейлор. – М: Мир, 1990.– Т.1. – 367 с.; Т.2. – 326с.; Т.3. – 373с.
5. Гринстейн, Б. Наглядная биохимия: пер. с англ. / Б. Гринстейн, А. Гринстейн. – М.: ГЭОТАР - МЕД, 2004.– 119 с.
6. Заварзин, А.А. Биология клетки: общая цитология/ А.А. Заварзин, А.Д. Харазова, М.Н. Молитвин. – СПб: Изд-во СПбГУ, 1992.– 320 с.
7. Кольман, Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К.Г. Рем. – М: Мир, 2000. – 469с.
8. Молекулярная биология клетки: В 3 т. / Б. Альбертс, Д. Брей, Дж. Льюс и др.– 2-е изд., перераб. и доп. – М: Мир, 1994.– Т.1.– 515с.; Т.2. – 540с.; Т.3. – 503с.
9. Практикум по цитологии / В.И. Гребенщикова, В.И. Лейкина, Л.И. Лотова, Г.Е. Онищенко, Ю.С.Ченцов // Отв. ред. Ю.С.Ченцова. – М: Изд-во Московского ун-та, 1988 – 292с.
10. Рейвн, П Современная ботаника: В 2-х томах. Т.1. / П. Рейвн, Р. Эверт, С. Айкхорн. М.: Мир, 1990. – 348 с.
11. Рис, Э. Введение в молекулярную биологию / Э. Рис, М. Стернберг.– М: Мир, 2002.– 141 с.
12. Соколов, В.И. Цитология, гистология, эмбриология: учебник / В.И. Соколов, Е.И. Чумасов.– М.: КолосС, 2004.– 350с.
13. Узбеков, Р.Э., Алиева И.Б. Центросома — клеточный концертмейстер/ Р. Э. Узбеков, И. Б. Алиева. – Природа.–2007.– № 5.–С.3 –12 [Электронный ресурс] – Режим доступа <http://elementy.ru/lib/430462>
14. Ченцов, Ю.С. Введение в клеточную биологию/ Ю.С. Ченцов.– 4-е изд., перераб. и доп. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2004.–385 с.
15. Encyclopaedia Britannica, 2010 [Электронный ресурс] – Режим доступа <http://www.britannica.com/bps/media-view/114953/1/0/0>
16. Wikimedia Foundation, Inc. [Электронный ресурс] – Режим доступа <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/26/Chloroplast.svg/2000px-Chloroplast.svg.png>

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ И ИНФОРМАЦИОННОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ «ЦИТОЛОГИЯ»

а) основная литература:

1. Кузнецов, С.Л. Гистология, цитология, эмбриология: Учебник / С.Л. Кузнецов, Н.Н. Мушкамбаров. 3-е изд., испр. и доп.– Медицинское информационное агентство, 2016. – 180 с.
2. Льюин, Б. Клетки / Б. Льюин, Л. Кассимерис и др.– Изд-во: Бином, 2011. – 951 с.
2. Слюсарев, А.А. Биология с общей генетикой: учебник / А.А. Слюсарев. – М.: Альянс, 2015.-472с.
- 3.. Тейлор, Д. Биология: в 3-х т. / Д. Тейлор, П. Грин, У. Стаут. 3-е изд. – М.: 2012.– Т.1. – 454 с.; Т.2. – 436 с.; Т.3. – 451 с.
4. Ченцов, Ю.С. Введение в клеточную биологию. / Ю.С. Ченцов. – М.:Альянс, 2015 – 495 с.

б) дополнительная литература:

1. Альбом электронных микрофотографий по цитологии / Сост. Е.Б.Романова, Нижний Новгород, Нижегородский ун-т, 1999. 46С.
2. Билич, Г.Л. Универсальный атлас. Биология . Кн. 1 / Г.Л. Билич. – Москва: ОНИКС 21 век, 2005. -1008с.
3. Ботаника. Учебник для вузов: в 4 т. / П. Зитте, Э.В. Вайлер, Й.В. Кадеперайт, А. Брезински, К. Кернет; на основе учебника Э. Страсбургера и др. пер. с нем. Т. 1. Клеточная биология. Анатомия. Морфология / под ред. А.К. Тимонина, В.В. Чуба.– М.: Издательский центр «Академия», 2007.– 368 с.
4. Гистология, эмбриология, цитология: учебник /Ю.И. Афанасьев, Н.А. Юрина, Б.В. Алешин и др.; под ред. Ю.И. Афанасьева, Н.А. Юриной – 6-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 800 с.
5. Гистология, цитология и эмбриология: атлас: учеб. пособие / В.Л. Быков, С.И. Юшканцева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 296 с.
6. Мушкамбаров, Н.Н. Молекулярная биология / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов. – Мед. инф. агентство, 2016. – 660 с.
7. Романова, Е.Б. Руководство к практическим занятиям по дисциплине «Общая цитология» / Е.Б. Романова. – Н.Новгород: Изд-во ННГУ, 2005. 59С.

8. Романова Е.Б. Общая цитология: учебное пособие – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2009.– 80 с.
9. Романова Е.Б. Основы современной цитологии: Учебно-методическое пособие / Е.Б. Романова. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012.– 115 с.
10. Романова Е.Б. Основы клеточной биологии / Электронный управляемый курс на сайте электронного обучения ННГУ им. Н.И. Лобачевского, в среде Moodle. – 2016 // <http://e-learning.unn.ru/course/view.php?id=1333>. Идентификационный номер: 1333У.01.16.

в) программное обеспечение и Интернет-ресурсы

1. Encyclopaedia Britannica, 2010 [Электронный ресурс] – Режим доступа <http://www.britannica.com/bps/media-view/114953/1/0/0>
Wikimedia Foundation, Inc. [Электронный ресурс] – Режим доступа <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/26/Chloroplast.svg/2000px-Chloroplast.svg.png>
2. Атлас, медицинская образовательная сеть Университета Лойола (Чикаго, США). База гистологических изображений по цитологии, общей и частной гистологии. Есть система самоконтроля по слайдам – Режим доступа http://www.meddean.luc.edu/lumen/MedEd/Histo/frames/histo_frames.html
3. Учебная программа по цитофизиологии животных и растительных клеток – Режим доступа <http://www.cellsalive.com/>
4. Виртуальная электронная микроскопия препаратов – Режим доступа <http://www.amc.anl.gov>
5. Небольшая учебная программа, содержащая набор анимированных иллюстраций по цитофизиологии животных и растительных клеток – Режим доступа <http://www.cellsalive.com/>
6. Учебная программа Университета штата Аризона (США), содержащая подробную текстовую информацию и иллюстрации по истории, методам изучения клетки, жизненному циклу клеток (включая митоз), цитоскелету. Каждый раздел включает возможность самоконтроля (тесты на выбор одного из нескольких правильных ответов) – Режим доступа http://www.biology.arizona.edu/cell_bio/cell_bio.html

Елена Борисовна Романова

ЦИТОЛОГИЯ

Учебное пособие

Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского
603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23