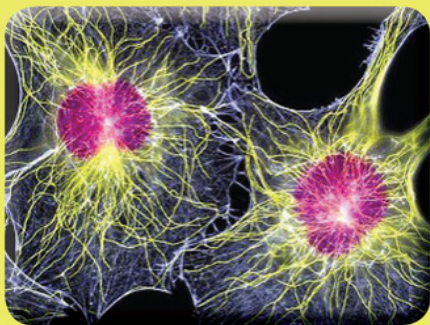


СТВОЛИНСКАЯ Н.С.

ЦИТОЛОГИЯ



Москва
2012

ИЗДАТЕЛЬСТВО
Прометей

Наталья Сергеевна Стволинская

Цитология

http://www.litres.ru/pages/biblio_book/?art=9959946

Н. С. Стволинская. Цитология. Учебник для бакалавров по направлению подготовки «Педагогическое образование и Биология»:

Прометей; Москва; 2012

ISBN 978-5-7042-2354-2

Аннотация

В учебнике излагается материал по всем разделам цитологии, включая историю и современные методы изучения клеток, понятия: дифференцировка и стволовые клетки, классические представления цитологии дополнены современными данными, полученными в этой области в последнее десятилетие, разбираются проблемы патологии клетки, в частности, современные взгляды на процессы некроза, апоптоза, рассматривается биология раковых клеток.

В учебнике представлена глава «Руководство к практическим занятиям по цитологии», где кратко изложен материал 18 практических занятий.

Учебник предназначен для бакалавров биологических факультетов вузов и учителей биологии.

Содержание

Предисловие	6
Глава 1. Введение в цитологию	10
Ранние этапы развития цитологии	10
Основные вехи в описании клеточных структур с помощью световой микроскопии	12
Микротехника	15
Клеточная теория	22
Клетки прокариот и эукариот	27
Ключевые понятия цитологии: дифференцировка, стволовые клетки, тотипотентность клеток и ядер	37
Клеточный цикл	45
Глава 2. Методы современной цитологии	51
Цитохимия	51
Иммуноцитохимия	56
Электронная микроскопия	58
Метод автордиографии	62
Фракционирование клеток	64
Метод клеточных культур	67
Конфокальная микроскопия	71
Глава 3. Химическая организация клетки	73
Белки	77
Нуклеиновые кислоты	84

Биосинтез белка	97
Глава 4. Ядро эукариотической клетки	104
Строение и функции ядра	104
Конец ознакомительного фрагмента.	106

Наталья Стволинская

Цитология

**Учебник для бакалавров по
направлению подготовки
«Педагогическое
образование и Биология»**

Рецензенты:

В. П. Викторов, заведующий кафедрой Ботаники Биолого-химического факультета МПГУ, доктор биологических наук, профессор

М. В. Кондашевская, ведущий научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека РАМН, доктор биологических наук, доцент

© Н. С. Стволинская, 2012

© Издательство «Прометей», 2012

Предисловие

В последние десятилетия цитология сделала большой рывок вперед в своем развитии и переросла в новое научное направление «клеточная биология», которое изучает молекулярные основы всех клеточных процессов и принципы их регуляции на молекулярном уровне. В связи с бурным развитием клеточной биологии пересмотрены и дополнены многие разделы классической цитологии, составляющей основу клеточной биологии.

В последние годы вышло несколько учебных пособий, отражающих отдельные разделы цитологии. Кроме того, издан объемный учебник «Введение в клеточную биологию» Ю. С. Ченцова, профессора МГУ им. М. В. Ломоносова, рассчитанный на годовой курс изучения дисциплины.

Переход на двухступенчатую систему высшего образования приводит к изменению учебного процесса. Бакалавры по направлению подготовки 050100.62 Педагогическое образование и 020400 Биология изучают цитологию в течение одного семестра первого курса. Данный учебник полностью соответствует государственному стандарту для бакалавров по указанному направлению и профилю образования университетов.

Учебник основан на классических представлениях цитологии, а также включает новые данные, полученные в этой

области в последнее десятилетие, на основе которых к настоящему времени уже сформировались устоявшиеся представления.

В учебнике подробно изложены методы цитологии, включая самые современные, такие как иммуноцитохимия и конфокальная микроскопия. Рассматриваются в современном ракурсе понятия: дифференцировка, стволовые клетки, тотипотентность клеток. Весьма подробно и досконально разбирается тема «ядро», так как именно эта структура программирует работу клетки. Учитывая многолетний опыт преподавания и трудности усвоения этого материала студентами первого курса, автор предваряет тему «Ядро эукариотической клетки» главой «Химическая организация клетки», где в доступной форме излагаются представления о строении и функциях молекул ДНК и РНК, которые в дальнейшем будут занимать важное место в изложении темы «Ядро». Большое внимание в учебнике уделяется материалу по строению и функциям мембранных структур клетки, включая механизм работы рецепторов, рассмотрены строение и функции всех структур и органоидов клетки. Согласно государственному стандарту, в учебнике имеются главы, посвященные делению клетки и развитию половых клеток. Изложение учебного материала заканчивается главой «Патология клетки», в которой представлены современные взгляды на процессы некроза и апоптоза, их роль в патогенезе клетки, а также уделяется внимание биологии клеток злокаче-

ственных новообразований и современной теории, объясняющей причины возникновения опухолей.

Учебник заканчивается главой «Руководство к практическим занятиям по цитологии», где кратко изложен материал 18 практических занятий, перечислены микроскопические препараты и микрофотографии, используемые в изучаемом курсе. Завершается глава перечнем теоретических вопросов к зачету или экзамену по цитологии.

При изложении материала автор опирался на многолетний опыт преподавательской деятельности, обращая особое внимание на трудные разделы программы, дополняя их схемами и интересными примерами из клеточной патологии, связанной с медициной.

При подготовке материала данного учебника автор использовал учебник Ю. С. Ченцова «Введение в клеточную биологию» (2004), руководство для врачей Дж. М. Фаллер, Д. Шилдс «Молекулярная биология клетки» (2006). Была использована и классическая учебная литература: учебник Ю. С. Ченцова «Общая цитология» (1995) и трехтомное издание «Молекулярная биология клетки» (1994), подготовленное авторским коллективом Б. Албертс, Д. Брей, Дж. Льюис, М. Рэфф, К. Робертс, Дж. Уотсон. Глава, посвященная патологии клетки, написана с учетом научных данных, опубликованных в текущей научной литературе, но соответствующих устоявшимся представлениям.

Учебник иллюстрирован как собственными схемами и ри-

сунками, так и иллюстративным материалом, взятым из изданий, указанных в специальном списке литературы.

Автор выражает глубокую благодарность профессору Ю. С. Ченцову за полезное обсуждение и ценные замечания.

Глава 1. Введение в цитологию

Ранние этапы развития цитологии

Любая наука начинает активно развиваться, когда появляются методы, с помощью которых можно изучать необходимые объекты. Цитология есть наука о клетках – мельчайших живых структурах, имеющих обмен веществ и способных к размножению. Название «цитология» происходит от греческого слова *kytos*, что означает ячейка, клетка. У большинства организмов размеры клеток так малы, что их невозможно различить невооруженным глазом. Поэтому цитология начала развиваться с появлением и усовершенствованием световой микроскопии. Первые клетки наблюдал английский естествоиспытатель Роберт Гук в 1665 г. под микроскопом собственной конструкции. Это были клетки коры пробкового дуба. Первая книга, которая дает начало цитологии как науке о форме, структуре, функции и эволюции клеток, вышла в свет в 1884 г. Ее автор – Ж.-Б. Карнуа. Он назвал свою книгу «Биология клетки». Таким образом, начиная с первого описания клетки понадобилось больше 200 лет, прежде чем разрозненные знания о ней сложились в систему и дали начало новой науке – цитологии.

Современная цитология – это наука, которая изучает осо-

бенности строения, деления и жизнедеятельности клеток, присущие всем клеткам организма. Ученые также выделяют частную цитологию – эта наука изучает клетки конкретных тканей и органов в связи с уникальностью их функций.

Первые шаги в развитии новой науки сопровождались усовершенствованием светового микроскопа и развитием новых методов микротехники – приготовления окрашенных препаратов, на которых под микроскопом можно увидеть не только границы клетки, но и структуры внутри нее: ядро, живую протоплазму, хлоропласты, а также синцитий – структуру из делящихся клеток, соединенных цитоплазматическими мостиками, и изучить процессы деления клеток. Дав своей книге название «Биология клетки», Ж.-Б. Карнуа опередил время. Все чаще в современной биологии с конца XX в. употребляется именно такое название науки цитологии, которая является описательной морфологической наукой. Биология клетки – это современная экспериментальная наука, которая изучает физиологию клетки на молекулярном уровне, регуляцию ее работы, адаптацию к изменяющимся условиям окружающей среды. В основе биологии клетки лежат знания, полученные учеными-цитологами на протяжении полутора веков.

Основные вехи в описании клеточных структур с помощью световой микроскопии

1665 г. – Р. Гук описал небольшие структуры в срезах коры пробкового дуба и назвал их клетками.

1674 г. – А. Левенгук открыл одноклеточные организмы, клеточный состав крови. Спустя 9 лет – увидел бактерии.

1833 г. – Р. Броун описал ядра в клетках орхидей.

1838 г. – Т. Шванн сформулировал клеточную теорию, используя обобщения М. Шлейдена о клеточном строении растений.

1846–1852 г. – Вводится термин «протоплазма» для обозначения тела живой клетки.

1855–1858 г. – Р. Вирхов установил, что клетки не могут образовываться из бесклеточного вещества, всякая клетка происходит только из клетки путем деления.

1876–1879 г. – Э. Страсбургером описана последовательность событий при делении растительных клеток.

1876 г. – Е. ван Бенеден открыл клеточный центр.

1879 г. – В. Флеминг ввел термины «митоз» и «хроматин», описал поведение хромосом в митозе животной клетки, хотя сам термин «хромосома» был предложен В. Вальдейером позднее, в 1888 г.

1875–1884 г. – Открыто, что при оплодотворении слива-

ются ядра половых клеток как у растений, так и у животных (Э. Страсбургер, Е. ван Бенеден, О. Гертвиг).

1882 г. – В. Флеминг открыл мейоз в клетках животных.

1888 г. – Э. Страсбургер описал мейоз в клетках растений.

1894 г. – Открытие биобластов Р. Альтманом, в 1897 г.

эти структуры были названы митохондриями.

1898 г. – Открыт аппарат Гольджи итальянским ученым К. Гольджи.

В первой половине XX в. были описаны микротрубочки и эндоплазматический ретикулум, представляющий собой систему мелких вакуолей и канальцев.

Описанием клеточных структур цитология не заканчивается. После их описания с помощью световой микроскопии начинается изучение функций, проводится исследование сложных процессов деления и оплодотворения, выясняется биологическое значение этих процессов. Данные исследования проводятся с начала XX в., когда в цитологии начинают использоваться совершенно новые методы – культивирования клеток вне организма, цитохимии, а с середины XX в. – методы автордиографии, фракционирования клеток и электронной микроскопии.

Вопросы

1. Почему цитология как наука начала активно развиваться только к концу XIX в.?
2. Назовите имена ученых, которые внесли значительный

Вклад в становление цитологии.

Микротехника

Размеры клеток имеют величины, выраженные в микрометрах (мкм). Средний размер животной клетки 20–40 мкм, растительные клетки обычно в 2 раза крупнее. Микрометр – это тысячная доля миллиметра, т. е. $1 \text{ мм} = 1000 \text{ мкм}$. Большинство клеточных структур составляют десятые доли микрометра. Такие структуры можно увидеть только с помощью микроскопов.

Первые простейшие микроскопы были изобретены в конце XVI в. и представляли систему линз над предметным столиком. С помощью такого микроскопа нельзя было увидеть клетки, он не давал достаточного увеличения. В XVII в. микроскоп был усовершенствован, и с его помощью Р. Гук и А. ван Левенгук осуществляли свои наблюдения и открытия по клеточному строению коры дерева, крови, мужского эякулята, наличия одноклеточных существ в водном настое листьев сенны. В XVIII в. стали накапливаться данные о клеточном строении растений и некоторых животных. Клетки описывались как прозрачные ячейки, имеющие оболочку.

В начале XIX в. появляются зачатки микроскопической техники – способы приготовления тонких срезов тканей животных. Так, чешский исследователь Я. Пуркинье и его ученики разработали и использовали микротом для приготовления тонких срезов спинного мозга, мозжечка и других тка-

ней, а также окраску срезов, в результате чего было описано живое содержимое клетки – протоплазма. Использование специальных красителей делает внутреннюю структуру клетки более контрастной, что позволило в 30-е годы XIX в. сформировать представление о наличии ядра в растительных и животных клетках.

Во второй половине XIX в. световой микроскоп был еще раз усовершенствован, изменена его конструкция. Освещение препарата стали производить снизу через систему линз конденсора. За счет применения объективов и окуляров повысилась разрешающая способность микроскопов, появилась возможность различать в клетке не только ядро и протоплазму, но и другие более мелкие структуры. Конструкция современных световых микроскопов, которые студенты используют на своих занятиях, мало чем отличается от усовершенствованных микроскопов второй половины XIX в.

Любой современный световой микроскоп имеет в своем составе три оптические системы, работающие совместно: конденсор, объектив и окуляр. Конденсор представляет собой систему линз, которые позволяют сфокусировать источник освещения и осветить объект снизу, чтобы лучи света проходили через тонкий срез. Конденсор имеет диафрагму, которая позволяет регулировать интенсивность освещения, делая его ярче или слабее.

Лучи света, пройдя через срез, фокусируются объективом. Именно объектив создает первичное увеличение объ-

екта, дает его разрешение, позволяет увидеть мельчайшие структуры клетки. Окуляр увеличивает изображение, построенное объективом, и направляет его в глаз исследователя. Разрешение объекта остается таким, каким его сделал объектив. Общее увеличение объекта будет равно произведению увеличения объектива на увеличение окуляра. На занятиях по цитологии чаще всего используется объектив с увеличением $\times 40$ и окуляр, дающий увеличение в 15 раз, тогда общее увеличение будет 40×15 . Нетрудно подсчитать, что это увеличение в 600 раз. Принято записывать увеличение препарата как 40×15 ; такая запись показывает разрешение объекта, какие детали должны быть выявлены на препарате, объектив с каким увеличением использовался для его анализа.

Световой микроскоп, как любой оптический прибор, имеет важную характеристику – разрешающую способность. Это минимальное расстояние между двумя точками, которые видны раздельно. Для современных световых микроскопов разрешающая способность равна 0,2 мкм, что соответствует средним размерам митохондрий. То есть под световым микроскопом при максимальном его разрешении митохондрии будут видны в виде точек с минимальными размерами. Примерно также будут выглядеть и многие другие органеллы цитоплазмы животной клетки. В растительной клетке есть более крупные структуры – хлоропласты и другие пластиды, размеры которых несколько микрометров.

Причиной того, что мелкие структуры клетки видны в световой микроскоп нечетко, является эффект оптической дифракции. В микроскопе яркая точка будет увеличена и выглядит как яркое пятно. Два близлежащих точечных объекта дают перекрывающиеся изображения пятен, которые сливаются в одно пятно.

Живые клетки бесцветны и прозрачны. Их показатель преломления близок к показателю преломления окружающего раствора. Поэтому неокрашенные клетки трудно рассматривать под микроскопом. В начале XIX в. ученые стали использовать цветные красители, которые делали клеточные структуры более контрастными и видимыми в световой микроскоп. Сейчас таких красителей множество. Некоторые из них преимущественно окрашивают определенные клеточные органеллы. Наиболее часто используемые красители для выявления общей морфологии клеток – это гематоксилин и эозин. Гематоксилин имеет сродство к отрицательно заряженным молекулам, поэтому выявляет распределение в клетках дезоксирибонуклеиновой кислоты и кислых белков. Обработка клеток гематоксилином приводит к выявлению структур ядра: хроматина, хромосом, ядрышка. Эти структуры окрашиваются в сине-фиолетовые цвета. После гематоксилина препарат помещают в раствор эозина, который окрашивает все остальные структуры клетки в розовый цвет. На розовом фоне цитоплазмы будет четко видна контрастная фиолетовая структура ядра.

Наибольшие успехи в описательной цитологии были достигнуты, когда в XIX в. научились делать постоянные, длительно хранящиеся окрашенные препараты клеток и тканей. Приготовление таких препаратов трудоемко и включает ряд этапов. Первый этап – взятие материала для исследования и фиксация небольшого кусочка ткани ($0,5 \text{ см}^3$). Цель этого процесса – быстро законсервировать клетки, но предотвратить распад клеточных структур. Чаще всего в качестве фиксаторов для световой микроскопии используют формалин, спирт, пикриновую кислоту, смеси формальдегида с этиловым спиртом, хотя известны сложные смеси многокомпонентных фиксаторов.

После фиксации из кусочка ткани нужно приготовить тонкие срезы толщиной 5–10 мкм на специальном приборе микротоме с помощью очень острого металлического ножа (лезвия). Чтобы срезы получились тонкими, кусочек ткани после фиксации обезвоживают с применением серии спиртов повышающейся концентрации и ксилола, затем пропитывают расплавленным парафином при 56°C . При комнатной температуре парафин застывает, и кусочек ткани становится твердым, он готов для приготовления срезов.

Приготовленные срезы помещают на предметное стекло, растворяют парафин ксилолом, постепенно замещают ксилол водной средой с помощью растворов этилового спирта убывающей концентрации. Затем препарат окрашивают в водном растворе красителя. После окрашивания препарат

опять обезвоживают и заключают в каплю канадского бальзама под покрывное стекло. Такой препарат может храниться очень долго, на протяжении нескольких лет.

Совокупность приемов и методов приготовления и анализа с помощью световой микроскопии называется микротехникой.

В XX в. были разработаны световые микроскопы, позволяющие более детально изучать живые неокрашенные клетки. Это интерференционная микроскопия, поляризационная микроскопия, разнообразные приставки к обычному световому микроскопу – фазово-контрастная микроскопия и метод темного поля.

При изучении живых клеток широко используется люминесцентная (флюоресцентная) микроскопия. В люминесцентном микроскопе объект освещается ультрафиолетовым лучом, используются особые красители – флюорохромы, которые при поглощении энергии света начинают ярко флюоресцировать. Флюорохромы могут избирательно связываться с определенными структурами клетки или макромолекулами. При таком микроскопировании светящиеся клеточные структуры выявляются на темном фоне. Разрешающая способность люминесцентного микроскопа такая же, как в световом.

Вопросы

1. Какой размер имеют клетки?

2. Перечислите компоненты микроскопа, задействованные в построении изображения. Какую функцию они выполняют?

3. Что такое разрешающая способность светового микроскопа?

4. Что такое микротехника?

5. Для чего используется фиксация? Приведите примеры фиксаторов.

6. Перечислите этапы приготовления постоянных препаратов.

Клеточная теория

Развитие световой микроскопии и техники приготовления препаратов позволило в тридцатых годах XIX в. сформировать представление о таких клеточных компонентах, как протоплазма и ядро. Впервые это обсуждается в работах Я. Пуркинье и Р. Броуна. Чуть позже немецкий ботаник М. Шлейден обобщил накопленные данные о сходстве строения клеток растений. Он высказал гипотезу о том, что все растения состоят из клеток, ошибочно считая, что клетки растений образуются путем кристаллизации жидкости вокруг ядра, и появление клеточной структуры растения связано с его жизнедеятельностью.

В 1838 г. Т. Шванн обобщил данные о клеточном строении и растений, и животных и сформулировал представление о клетке как структурной единице всех живых организмов. Он писал: «Клетки – это организмы, а растения и животные представляют собой агрегаты этих организмов, построенные по определенным законам». Вместе с тем и Шлейден, и Шванн ошибались, считая, что клетки могут образовываться из бесструктурного вещества, а главной структурой, которая обеспечивает особенности клетки, является клеточная оболочка.

По мере развития техники микроскопирования накапливались данные о развитии живых организмов, и во второй

половине XIX в. не подтверждается представление о возможности образования клеток из бесструктурного вещества. Наоборот, утверждается представление немецкого микробиолога и патологоанатома Р. Вирхова о том, что всякая клетка происходит от клетки путем деления предшествующей, рост организма происходит за счет деления клеток.

Таким образом, в 50-е гг. XIX в. клеточная теория была представлена тремя положениями: 1) клетка – элементарная минимальная единица жизни; 2) каждая клетка происходит из себе подобных; 3) организм представляет собой совокупность клеток.

К концу XIX в. в связи с усовершенствованием микроскопов и микроскопической техники складывается представление о сложной организации клеток; двух процессах клеточного деления – митозе и мейозе, особенностях и значении этих процессов; закладываются знания о процессе оплодотворения.

В XX в. у исследователей появляются совершенно новые методы, которые позволяют изучать не только морфологию клеток, но и сложные этапы метаболизма. При помощи этих методов удалось связать структуру органоидов клетки с функцией, которую они выполняют. Это методы специфического окрашивания различных классов крупных клеточных молекул, методы слежения за структурными компонентами биополимеров в метаболических путях клетки. Развиваются биохимические подходы, активно изучается метаболизм

клетки. В 30-е гг. XX в. на разных объектах растительного и животного происхождения показывается общность метаболических путей. И в эти же годы формируется представление о том, что единство клеточных структур основано не только на морфологии, но и на единстве химической организации, единстве всех процессов метаболизма.

И, наконец, в период между 1953 и 1966 гг. была раскрыта природа и пути передачи наследственной информации, доминирующая роль ДНК в этом процессе. На основе этих открытий сформулировано основное положение клеточной биологии: во всех клетках носителем наследственной информации является ДНК, на ней, как на матрице, синтезируются молекулы РНК, которые играют главную роль в реализации наследственной информации в процессе биосинтеза белка. Это положение характерно как для клеток прокариот, так и для клеток эукариот.

Таким образом, в настоящее время описаны структуры почти всех клеточных органоидов, определены их основные функции, ученые вплотную подходят к изучению регуляции всего многообразия клеточных процессов и в норме, и в условиях патологии – болезни клетки.

На современном уровне клеточная теория формулируется следующим образом: клетка – элементарная единица всего живого; клетки различных организмов гомологичны между собой, то есть имеют общие черты организации; каждая клетка образуется путем деления из исходной клетки, рост

организма осуществляется за счет деления клеток митозом; многоклеточные организмы представляют собой сложные клеточные системы, объединенные в ткани и органы, связанные между собой тремя формами химической регуляции: межклеточными взаимодействиями, гуморальными и нервными.

Клеточная теория – это основной закон биологии, он подчеркивает общность организации всех клеток и единство происхождения всего живого на Земле. Кроме того, этот закон имеет и практическое значение. Поскольку в нем говорится о гомологии всех клеток, то информация, полученная для одних клеточных типов, может быть использована для общей характеристики других классов клеток. Так, очень много информации о функциях клеток человека было получено при изучении менее сложных организмов, например, клеток дрожжей. Их легко выращивать в лаборатории, с ними легко ставить эксперименты. Эукариотические клетки дрожжей стали моделью для изучения процессов секреции и регуляции клеточного деления. Беспозвоночные организмы: небольшая нематода (*Caenorhabditis elegans*) и плодовая мушка дрозофила (*Drosophila melanogaster*) служат прекрасными моделями для изучения процессов специализации клеток и программируемой клеточной смерти. Чем лучше ученые понимают работу простых клеточных систем, тем больше узнают о клетках человека.

Вопросы

1. Когда было сформулировано представление о клетке как единице всего живого? Какие ученые внесли вклад в формирование этой гипотезы?
2. В какое время накопились знания о сложной организации клеток, о процессах клеточного деления?
3. Дайте современную формулировку клеточной теории.
4. В чем теоретическое и практическое значение клеточной теории?

Клетки прокариот и эукариот

Живые клетки появились на Земле, видимо, около 3,5–4 миллиардов лет тому назад. Одно из наиболее удивительных свидетельств общности происхождения всех клеток и совместной ранней эволюции – это универсальность генетического кода: организация триплетов нуклеотидов в составе нуклеиновых кислот, которые кодируют аминокислоты, входящие в состав белков. Генетический код почти не различается у всех современных организмов, следовательно, такой способ кодирования генетической информации появился и закрепился на ранних стадиях эволюции.

Ранние этапы клеточной эволюции связаны с распространением в разных средах обитания небольших клеток размером 1–2 мкм с простой внутренней организацией. Это клетки прокариот, к ним относятся бактерии, сине-зеленые водоросли, иначе их называют цианобактериями, и микоплазмы. Форма клеток может быть сферической, удлинённой или более сложной (извилистой). Они имеют плазматическую мембрану, которая служит барьером для транспорта молекул между внутренней средой клетки и ее окружением. В клетке имеется цитоплазма, в центральной части клетки находится одна двуспиральная молекула ДНК, обычно замкнутая в кольцо. В цитоплазме расположены рибосомы – мельчайшие органоиды, способные синтезировать белок из ами-

нокислот по заданной программе, записанной в матричных РНК (мРНК). В цитоплазме таких клеток могут храниться вещества запаса. Отличительной особенностью клеток прокариот является наличие сложной, объемной (до 30 % сухого веса) защитной оболочки, которая иначе называется клеточной стенкой (рис. 1.1). Поскольку в этих клетках происходят активные синтетические процессы, требующие больших затрат энергии, то клетке необходимы молекулы – носители энергии. Такими молекулами являются АТФ, они образуются в процессе дыхания на складчатых выростах плазматической мембраны, направленных внутрь клетки, называемых мезосомами.

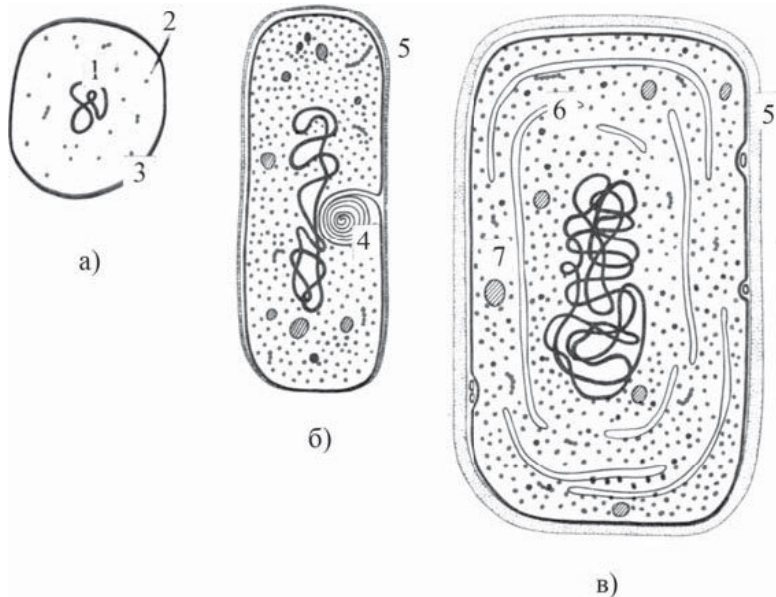


Рис. 1.1. Схема строения клетки прокариот: а) микоплазма; б) бактерия; в) цианобактерия (по Ролан, Селоши, Селоши, 1978). 1 – ДНК; 2 – рибосомы; 3 – цитоплазматическая мембрана; 4 – мезосома; 5 – клеточная стенка; 6 – тилакоид; 7 – секретируемые и запасные вещества.

Бактерии – это наиболее простые одноклеточные организмы, обнаруженные в самых разнообразных средах обитания. Они легко приспосабливаются к окружающей среде, очень быстро размножаются. Каждые 20–30 минут после удвоения кольцевой молекулы ДНК клетка делится надвое, если в сре-

де обитания достаточно веществ, способных обеспечить все эти процессы энергией. Бактерии живут на Земле дольше других организмов и превосходят по численности все другие типы клеток. В настоящее время хорошо изучен генетический материал бактериальных клеток, и показано, что в составе кольцевой ДНК находится около 5000 генов, кодирующих разнообразные белки бактерий.

Цианобактерии, в ботанической литературе их называют сине-зелеными водорослями, сходны по простоте организации с бактериями и обитают в водной среде. Они имеют клеточную стенку, сходную по химическому составу с бактериями, аналогично бактериям у них организован генетический аппарат и все клеточные структуры. Цианобактерии в несколько раз крупнее обычных бактериальных клеток. Главная их особенность – способность к фотосинтезу, который происходит на особых мембранных образованиях внутри прокариотической клетки.

Микоплазмы – мельчайшие клеточные организмы прокариотического типа. Их размер примерно 0,3 мкм, что соответствует среднему размеру митохондрий, имеющихся в эукариотической клетке. Чаще всего микоплазмы являются паразитами, обитающими в растительных или животных клетках. Паразитический образ жизни привел к упрощению их организации: они утратили клеточную стенку, границей клетки служит плазматическая мембрана; их молекула ДНК в несколько раз меньше ДНК обычной бактериаль-

ной клетки, в ней закодировано всего несколько сот белков, обеспечивающих жизнедеятельность микоплазм. Большинство необходимых молекул микоплазмы получают из клетки, в которой они паразитируют. Примером может служить микоплазма, паразитирующая в эпителиальных клетках половых путей человека, являясь причиной хронических воспалений половых путей.

На эволюционном пути клеточного развития имеется важная веха. Приблизительно 1,5 миллиарда лет тому назад произошел переход от маленьких клеток со сравнительно простой организацией – прокариот, к большим по размерам и значительно более сложно устроенным эукариотическим клеткам – клеткам растений, грибов и животных.

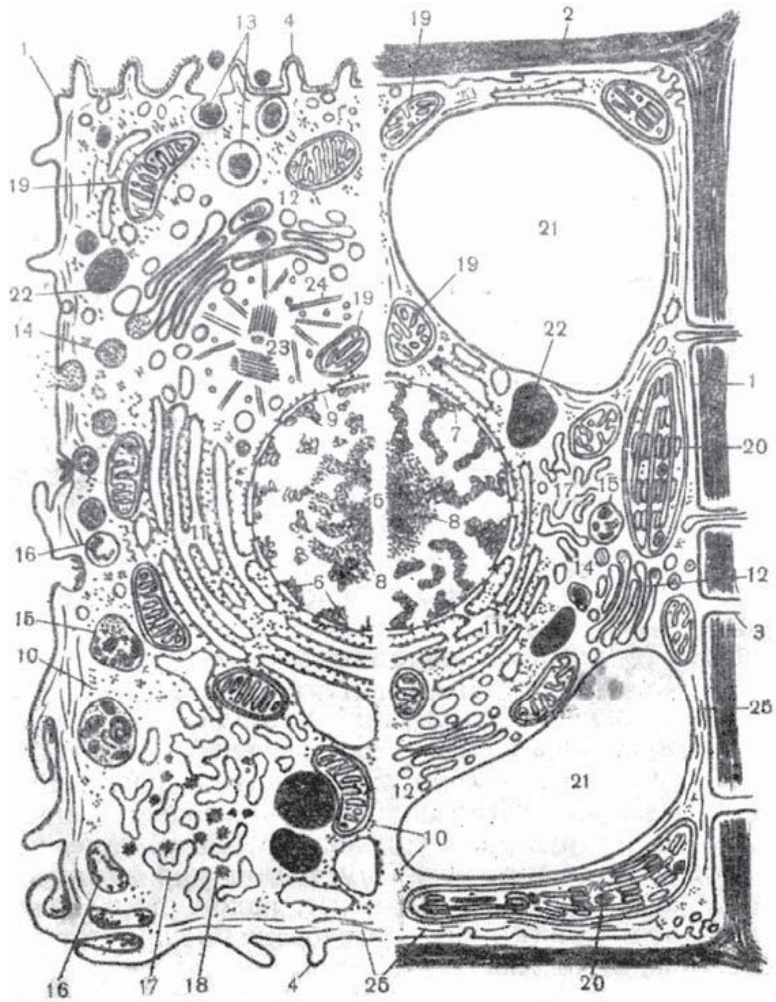
Главные отличия эукариотических клеток:

1. Имеют оформленное ядро со сложной структурой организации.
2. Они гораздо крупнее прокариотических клеток, их средний размер несколько десятков микрометров.
3. В цитоплазме имеются органоиды, окруженные мембраной, и цитоскелет белковой природы, обеспечивающий движение органелл и самой клетки.
4. Деление эукариотических клеток – это сложный процесс, связанный с образованием хромосом, веретена деления и распределением хромосом между дочерними клетками. Основной тип деления эукариотической клетки – митоз.
5. Оболочки эукариотических клеток отличаются по хи-

мическому составу и строению от клеточной стенки прокариот.

Рассмотрим схему строения растительной и животной клетки с учетом данных электронной микроскопии (рис. 1.2). Анализ схемы показывает, как много общего между этими клетками: организация и структура ядра, наличие плазматической мембраны, цитоплазмы, органоидов цитоплазмы, таких как эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, митохондрии, рибосомы, микротрубочки. Следовательно, даже если рассматривать только морфологию растительной и животной клетки, не учитывая функции органоидов, можно говорить о гомологии этих клеток. Однако в их организации есть и различия, они объясняются прежде всего тем, что растительные и животные клетки характеризуются разным типом питания. Животные клетки являются гетеротрофами, они получают большинство органических молекул из окружающей среды в процессе питания, это – сахара, аминокислоты, органические кислоты. Растительные клетки – автотрофы. Они могут аккумулировать солнечную энергию, превращая ее в энергию химических связей. За счет фотосинтеза в растительной клетке образуются сахара, аминокислоты, жиры, белки и углеводы. Для этого в растительной клетке есть специальные органоиды – хлоропласты, которые функционально связаны и с другими пластидами. Кроме того, у нее присутствует прочная твердая оболочка поверх плазматической мембраны. Особенности жизненной

организации привели к образованию большой центральной вакуоли, которая представляет собой резервуар для воды, обеспечивает напряженность клетки и является местом отложения продуктов обмена веществ. Особенности жизнедеятельности растительной клетки объясняют и особенности в организации цитоскелета.



A

Б

Рис. 1.2. Схема строения клетки животных (а) и растений (б) с учетом данных электронной микроскопии (по Ченцову, 1988). 1 – плазматическая мембрана; 2 – клеточная стенка; 3 – плазмодесмы; 4 – микроворсинки; 5 – ядро; 6 – хроматин; 7 – ядерная оболочка; 8 – ядрышко; 9 – ядерная пора; 10 – рибосомы; 11 – гранулярный эндоплазматический ретикулум; 12 – аппарат Гольджи; 13 – секреторные вакуоли; 14 – первичные лизосомы; 15 – вторичные лизосомы; 16 – пиноцитозные вакуоли; 17 – гладкий эндоплазматический ретикулум; 18 – отложение гликогена; 19 – митохондрии; 20 – хлоропласты; 21 – вакуоли; 22 – капли липидов; 23 – центриоль; 24 – микротрубочки; 25 – микрофиламенты.

Анализ сходства и различия в организации эукариотических и прокариотических клеток показал, что эти клетки устроены по-разному. Но, тем не менее, можно говорить о гомологии и между этими клетками. Общие черты их организации состоят в следующем: все типы клеток имеют плазматическую мембрану и цитоплазму; наследственная информация однотипно закодирована в молекулах ДНК; реализация наследственной информации происходит в процессе синтеза белка на рибосомах с помощью молекул РНК; носителем энергии во всех типах клеток являются молекулы АТФ. Таким образом, первое положение клеточной теории, говорящее о том, что клетка – это элементарная единица всего живого и все клетки гомологичны между собой,

опирается на общую основу принципов организации клеток прокариот и эукариот.

Вопросы

1. Приведите примеры представителей прокариот.
2. Опишите организацию прокариотической клетки.
3. В чем особенности организации цианобактерий и микоплазм?
4. Какие размеры имеет прокариотическая клетка?
5. Чем эукариотические клетки отличаются от прокариотических?
6. Что общего между клетками растений и животных?
7. Какие особенности есть в организации растительной клетки и с чем это связано?
8. Почему мы говорим о гомологии всех типов клеток?

Ключевые понятия цитологии: дифференцировка, стволовые клетки, тотипотентность клеток и ядер

Дифференцировка клеток. В организме человека сегодня выделяют более 200 разнообразных клеточных типов, различающихся по выполняемым функциям и особенностям организации. Вспомним простые примеры дифференцированных клеток: клетки эпителия, нервной, мышечной и соединительной ткани (рис. 1.3). Среди них есть и безъядерные клетки – эритроциты млекопитающих, в том числе и человека. Эти эукариотические клетки в процессе созревания утратили ядро, а с ним и способность к делению. Разнообразие клеток многоклеточных организмов связано с тем разнообразием специфических функций, которые выполняют клетки. Процесс, который приводит к образованию узкоспециализированных клеток со специфическими структурами, называется дифференцировкой.

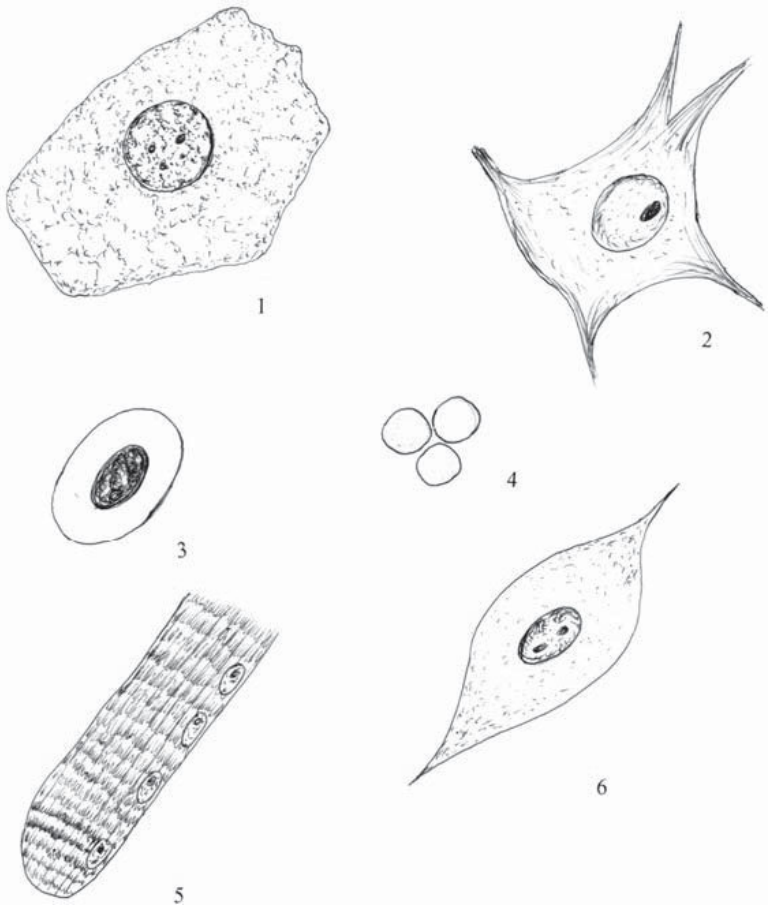


Рис. 1.3. Морфологическое разнообразие дифференцированных клеток животных. 1 – клетка печени аксолотля; 2 – нейрон спинного мозга собаки; 3 – эритроциты лягушки; 4 –

эритроциты человека; 5 – многоядерная поперечно-полосатая мышечная клетка языка кролика в продольном сечении; 6 – фибробласт соединительной ткани.

Дифференцировка – это сложный и часто длительный процесс. Клетка постепенно меняет форму, в ней изменяется состав органоидов, некоторые из которых могут размножаться, например митохондрии. Другие органоиды в процессе дифференцировки могут утрачиваться. Например, в цитоплазме зрелого эритроцита млекопитающих остаются только рибосомы, поэтому на препаратах под световым микроскопом в цитоплазме этих клеток отсутствует зернистость. В мышечных клетках постепенно исчезает кажущаяся хаотичность расположения клеточных структур, органоиды ориентируются правильными рядами. В процессе дифференцировки возможно изменение поверхности клеток. Плазматические мембраны соседних клеток могут образовывать специализированные клеточные контакты, например синаптические контакты между нейронами.

Как же возникают разнообразные клеточные типы в многоклеточном организме? За редким исключением все клетки многоклеточного организма содержат одинаковый набор генов, однотипную генетическую информацию. Например, у человека в каждой клетке присутствуют около 30 000 генов. На современном этапе развития клеточной и молекулярной биологии, генетики, эмбриологии считается, что индивиду-

альное развитие от одной оплодотворенной яйцеклетки до многоклеточного организма с большим разнообразием клеток – результат сложного взаимодействия клеток и регуляции работы генов. Обычно в дифференцированной клетке работает 15–20 % генов, характерных для клеток с конкретной специализацией. Остальные гены находятся в неактивном состоянии. В организме присутствуют механизмы, регулирующие работу генов. Если научиться управлять ими, можно регулировать процесс дифференцировки. Современная наука близка к этому.

Стволовые клетки. Очень часто процесс дифференцировки приводит к тому, что клетки утрачивают способность делиться. Дифференцированные клетки функционируют какое-то время, потом погибают, причем их гибель происходит по заданной программе, которая тоже регулируется генетически. Например, продолжительность жизни эритроцитов человека около 120 суток, а эпителиальных клеток тонкого кишечника – не более нескольких дней. Есть клетки, продолжительность жизни которых соответствует жизни индивидуума, например нейроны. Но, как теперь стало известно, при травмах и патологических состояниях состав нейронов тоже может пополняться, хотя бы частично. Таким образом, в каждом органе, в каждом типе ткани присутствуют недифференцированные или мало дифференцированные клетки, которые способны к делению. За счет таких клеток ткани и органы обновляются в течение всей жизни. Исход-

ные клетки в обновляющихся тканях животных называются стволовыми. Стволовые клетки индивидуальны для каждого типа ткани. Их особенность не только в том, что они не дифференцированы, но и в том, что они самоподдерживаются. После деления стволовой клетки митозом образуются две идентичные клетки, одна из которых остается в популяции стволовых клеток, а другая начинает дифференцироваться. Благодаря такому механизму популяция стволовых клеток в каждом типе ткани сохраняется в течение всей жизни.

Название «стволовые (родоначальные) клетки» было предложено русским ученым А. А. Максимовым в 1909 г. Большую роль в исследовании стволовых клеток сыграли работы российских ученых – А. Я. Фриденштейна, Н. Г. Хрущева и сотрудников.

Принято разделять стволовые клетки на эмбриональные (выделяют из эмбрионов на ранней стадии развития, когда еще нет ни тканей, ни закладок органов) и региональные стволовые клетки, которые выделяют из органов взрослых особей или органов эмбрионов более поздних стадий.

У растений обновление тканей и органов происходит иначе – за счет меристемы, которая закладывается на эмбриональной стадии развития и сохраняется в различных частях растения в течение его жизни. Кроме того, у растений способность к делению сохраняют малодифференцированные клетки большинства живых зрелых тканей.

Полипотентность и тотипотентность клеток. Обыч-

но в составе ткани или органа функционируют несколько клеточных типов. Вспомним хотя бы клеточный состав крови: эритроциты, лимфоциты, лейкоциты, тромбоциты. Все эти разнообразные клетки образуются в процессе дифференцировки из одной стволовой кроветворной клетки, которая находится в красном костном мозге плоских и трубчатых костей. Таким образом, стволовая клетка – родоначальница клеток крови – может дифференцироваться в разных направлениях. В таких случаях говорят, что стволовые клетки полипотентны, то есть они могут дифференцироваться в нескольких направлениях. Другой пример полипотентности – нейрональные стволовые клетки, обнаруженные недавно в некоторых отделах головного мозга, они могут превращаться в клетки, входящие в состав ткани головного мозга: нейроны, астроциты и олигодендроциты. Не все стволовые клетки обладают таким свойством. Клетки – предшественники поперечно-полосатых мышечных клеток проходят дифференцировку только в одном направлении, они сливаются и преобразуются в гигантские сократительные мышечные волокна.

Существуют стволовые клетки, которые могут дифференцироваться в любом направлении. Из них могут получиться и нейроны, и эпителиальные, и мышечные, и любые другие типы клеток. О таких стволовых клетках говорят, что они тотипотентны. Тотипотентные стволовые клетки называются эмбриональными стволовыми клетками и находятся в

определенных участках развивающегося эмбриона. Ученые разработали методы получения таких клеток и выращивания их в перевиваемой клеточной культуре. Клеточные культуры тотипотентных эмбриональных стволовых клеток служат прекрасной моделью для изучения процесса дифференцировки. Предполагается, что в перспективе эмбриональные стволовые клетки можно будет использовать для лечения больных, получивших тяжелые травмы головного и спинного мозга, перенесших инфаркты и другие тяжелые заболевания, связанные с поражением тканей, которые при обычном лечении очень плохо восстанавливаются.

Во всех ядрах клеток, даже дифференцированных, хранится генетическая информация, которая должна обеспечить специализацию клеток в любом направлении. Но ядро находится под воздействием цитоплазмы, гормонов, разнообразных сигнальных молекул и определенного клеточного окружения. Это приводит к тому, что большая часть генетической информации присутствует, но не функционирует, находится в неактивном состоянии. Ученые исследуют, каким образом можно активировать гены, находящиеся в ядре, создавая определенные искусственные условия. Такие работы начали проводить со второй половины XX в. Широко известным примером успешных шагов в этом направлении может служить клонированная овца по кличке Долли. Ее вырастили из неоплодотворенной яйцеклетки, у которой ее собственное ядро заменили на ядро высокодифференцирован-

ной клетки эпителиального происхождения из молочной железы другой овцы. Подобных экспериментов было проведено много с разнообразными представителями домашних животных. Все эти исследования показывают, что ядра дифференцированных клеток животных и растений обладают свойством тотипотентности, и проявляться это свойство может в искусственно созданных экспериментальных условиях.

Репродуктивное клонирование встречается с множеством этических, религиозных, юридических проблем, которые в настоящее время еще не имеют решения. В некоторых государствах работы по репродуктивному клонированию запрещены на законодательном уровне.

Вопросы

1. Что такое дифференцировка?
2. Приведите примеры дифференцированных клеток. Почему вы считаете, что это дифференцированные клетки?
3. Что такое стволовые клетки? В чем их особенность?
4. Объясните понятия: полипотентность и тотипотентность клеток. Приведите примеры.

Клеточный цикл

Рост многоклеточного организма осуществляется за счет деления клеток. Основным типом клеточного деления является митоз. Клетки, которые делятся через некоторые промежутки времени, находятся в клеточном цикле. Он отражает череду событий в клетке от начала митоза до следующего деления. Промежуток времени между двумя последовательными митозами называется интерфазой. Таким образом, клеточный цикл подразделяется на митоз и интерфазу (рис. 1.4).

Митоз происходит в течение 1,5–2 часов, интерфаза во много раз более продолжительна. В это время клетка очень активна. И в ядре, и в цитоплазме происходят синтетические процессы. Синтезируются нуклеиновые кислоты, белки, клеточные мембраны, образуются разнообразные органоиды. Однако все процессы происходят не хаотично, а в определенной последовательности. В связи с этим интерфаза подразделяют на три периода: G_1 , S, G_2 (рис. 1.4).

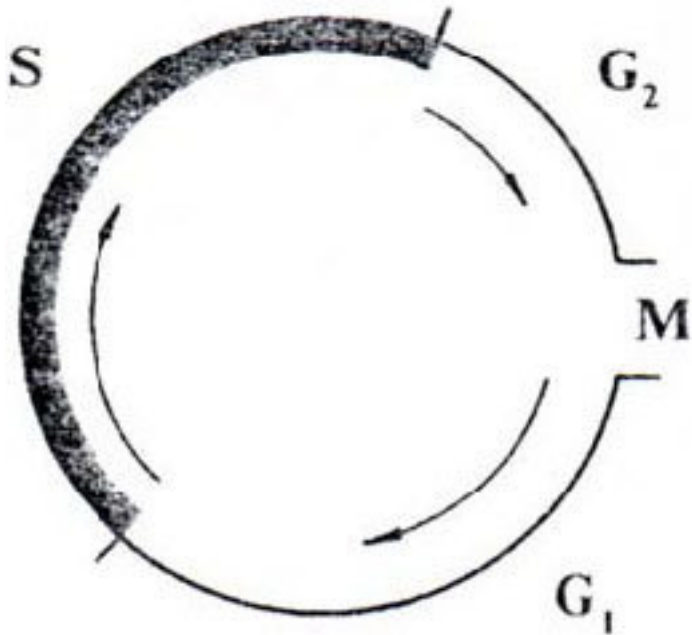


Рис. 1.4. Схематическое изображение клеточного цикла (по Епифановой, 2003). М – митоз; G_1 , S, G_2 периоды цикла; вместе они составляют интерфазу.

Первый период – G_1 , он наступает после окончания митоза. Этот период называют также периодом роста клетки, постмитотическим, или пресинтетическим. Дело в том, что в результате митоза из одной материнской клетки образуются две дочерние. Они меньше исходной материнской клетки, следовательно, им нужно достичь определенного разме-

ра. Это возможно только в результате активных процессов синтеза. Для того чтобы клетка могла подготовиться к следующему делению, должна удвоиться ее генетическая информация, а для этого необходимы специальные ферменты. Ферменты, работающие в процессе репликации ДНК, тоже синтезируются в G_1 -периоде.

Следующий период называется синтетическим, или S-периодом. В это время происходит удвоение всех молекул ДНК в ядре, иначе этот процесс называется репликацией. Это длительный период, обычно он продолжается в течение 9–10 часов.

Клетка – очень надежная система. Каждый процесс обязательно имеет точку контроля. Поэтому в S-периоде обязательно происходит проверка правильности репликации ДНК. Если какие-то участки ДНК имеют дефекты, то вступают в работу ферменты репарации. Они могут найти неправильно спаренные нуклеотиды в двойной спирали ДНК, удалить небольшой участок одной из нитей и восстановить правильную структуру. После многократных проверок и устранения всех дефектов в структуре молекулы ДНК клетка может окончательно готовиться к митозу.

Непосредственная подготовка к митозу происходит в G_2 -периоде. Иначе этот период называют постсинтетическим, или премитотическим. Обычно это наиболее короткий период интерфазы. В это время изменяется набор белков в цитоплазме и ядре. Синтезируются белки, необходимые для по-

строения веретена деления. Образуются белки, обеспечивающие перестройку хроматина, так как в митозе из хроматина образуются хромосомы.

Продолжительность клеточного цикла зависит от особенности клеток. В настоящее время показано, что суммарная длительность S-периода и G₂-фазы – величина относительно постоянная, для многих эукариот это 10–15 часов. Время G₁-периода может очень сильно изменяться у разных клеточных типов одного и того же организма. Например, у мыши в разных типах эпителиальных клеток длительность G₁-периода колеблется от 3 часов в волосяных фолликулах до 528 часов в эпидермисе уха.

Как разбиралось ранее, по мере того как клетка дифференцируется, она утрачивает способность к делению, то есть клетка выходит из клеточного цикла. Выход из клеточного цикла – сложный процесс, который регулируется специальными белками. Клетка не может выйти из клеточного цикла в любой момент. Она может это сделать только в определенной точке. Чаще всего это происходит в конце G₁-периода, реже – в G₂-фазе до начала митоза. Период жизни клетки, когда она находится вне клеточного цикла и не может делиться называется G₀-фазой. Существуют клетки, которые пребывают в G₀-фазе в течение всей жизни индивидуума. Это нейроны, мышечные клетки сердца, клетки хрусталика глаза. Клетки печени человека могут в течение нескольких

месяцев находиться в G_0 -периоде, а потом опять войти в клеточный цикл и начать делиться. Фибробласты соединительной ткани – малодифференцированные клетки. Они активно размножаются при заживании раны, а до этого могут длительное время находиться вне клеточного цикла в G_0 -фазе. Стволовые клетки постоянно находятся в клеточном цикле. Но их клеточный цикл очень длительный за счет увеличения фазы G_1 .

Регуляция клеточного цикла, переход из одного периода в другой – очень сложный процесс, который активно изучается в настоящее время. Описаны белки и ферменты-регуляторы клеточного цикла: циклины, протеинкиназы, факторы, стимулирующие клеточный цикл, и факторы, тормозящие его. Найдены контрольные точки регуляции процессов клеточного цикла. В регуляции участвуют как внутриклеточные белки, так и активные молекулы, выделяемые соседними клетками, а также гормоны, выделяемые в кровь железами внутренней секреции. Широко известно, что в качестве допинга спортсмены часто используют эритропоэтин. Это биологически активное вещество, стимулирующее деление клеток крови, своеобразный фактор роста. Факторы роста могут синтезировать и выделять из клеток многие клеточные типы. Известны факторы роста эпителиальных клеток, фибробластов, тромбоцитов и даже нервных клеток. Все они могут принимать участие в регуляции клеточного деления на уровне организма в целом.

Вопросы

1. Дайте определение клеточного цикла.
2. Что такое интерфаза? Что происходит с клеткой в интерфазе?
3. Перечислите периоды клеточного цикла, в течение которых происходит транскрипция в ядре.
4. В каком периоде клеточного цикла происходит репликация?
5. Какова продолжительность митоза, S + G₂ периодов?
6. Продолжительность какого периода наиболее изменчива? Приведите примеры.
7. Что происходит с клеткой в G₀-фазе?
8. Дайте характеристику клеточного цикла стволовых клеток.
9. Как осуществляется регуляция клеточного цикла?

Глава 2. Методы современной цитологии

Цитохимия

Развитие микротехники активно способствовало накоплению данных о тонком клеточном строении. В конце XIX в., благодаря развитию методов специального окрашивания клеточных структур на световом уровне микроскопирования, были выявлены и описаны в клетках сетчатый аппарат Гольджи и митохондрии. Ближе к середине XX в. появились объемные научные издания, обобщающие достижения в этой области. Область цитологии, которая изучает содержание и распределение химических соединений внутри клетки, динамику их превращений в процессе жизнедеятельности, в том числе при патологии, стали называть цитохимией. Цитохимия широко используется и в настоящее время. Разработано громадное количество окрасочных приемов, выявляющих конкретные химические соединения в клетке, особенно с использованием люминесцентных микроскопов.

Методы цитохимии подразделяют на две большие категории. К первой категории относятся методы, основанные на

использовании специфических красителей, взаимодействующих с конкретными химическими соединениями. Например, при окрашивании Суданом черным в клетках выявляются жиры в виде черных капель, тогда как ядра и структуры цитоплазмы останутся бесцветными (рис. 2.1).

Вторая категория методов цитохимии основана на проведении химической реакции непосредственно на срезе на предметном стекле. Суть реакции состоит в том, чтобы гидролизовать изучаемое химическое соединение так, чтобы образовались специфические реакционные группы, взаимодействующие с определенным красителем. Условия гидролиза для каждого соединения подбираются индивидуально. Например, обесцвеченное основание фуксина, взаимодействуя с альдегидными группами, образует прочное соединение, которое в присутствии сернистой кислоты окрашивается в красный цвет.

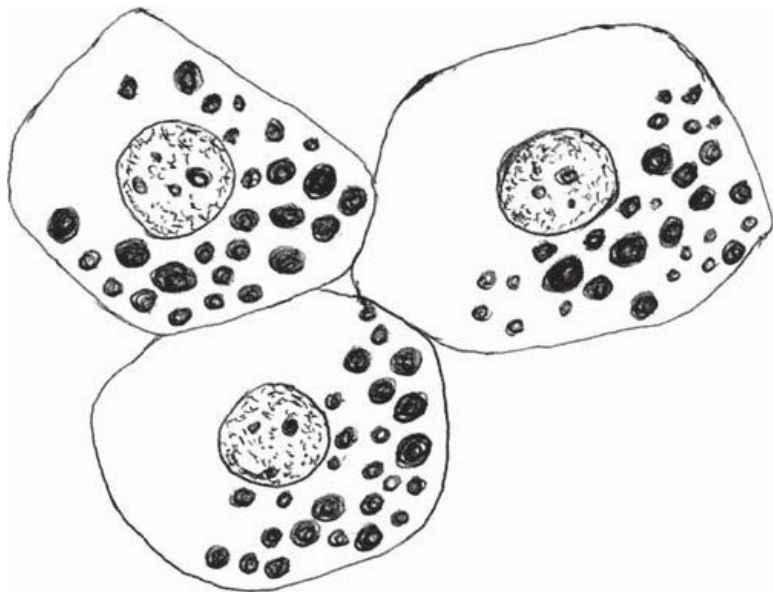
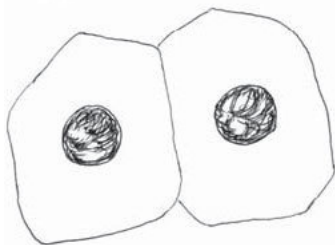


Рис. 2.1. Выявление жира в клетках печени аксолотля при окраске Суданом черным.

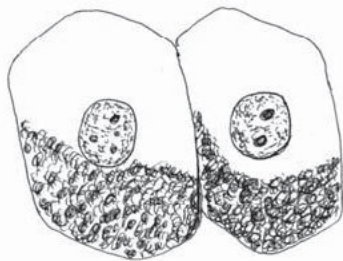
Классическим примером является реакция Фельгена на выявление ДНК. В этом случае гидролиз проводится в 1М соляной кислоте при длительном нагревании препарата. В результате реакции от молекулы ДНК отщепляются пуриновые азотистые основания – аденин и гуанин. На их месте на дезоксирибозе образуются свободные альдегидные группы, способные вступить в реакцию с красителем. Препарат после реакции помещают в раствор красителя. Связывание фукси-

на происходит строго количественно. После отмывания препарата в слабом растворе сернистой кислоты места локализации ДНК окрашиваются в красный цвет (рис. 2.2а). Такие препараты можно использовать для количественного определения ДНК в клетке.

Для выявления полисахарида гликогена, мономером которого является глюкоза, предметное стекло с тонкими срезами ткани помещают в раствор периодата калия (KIO_4) и проводят гидролиз при комнатной температуре. Такая обработка приводит к разрушению гликогена в клетках с активацией альдегидных групп в молекуле глюкозы. Затем препарат окрашивают так же, как описано для реакции на ДНК. В этом случае окрасятся участки клеток, содержащие гликоген. Специфическим в данном случае является не краситель, а подбор соответствующей химической реакции, которая проводится непосредственно на цитологическом препарате (рис. 2.2б).



а



б

Рис. 2.2. Выявление ДНК по Фельгену (а) и гликогена после гидролиза в периодате (б) с помощью обесцвеченного основания фуксина. Клетки печени аксолотля.

С помощью цитохимических цветных реакций в клетках выявляют разнообразные полисахариды, специфические аминокислоты в белках, нуклеиновые кислоты, жиры, липиды и множество ферментов, участвующих в метаболических процессах обмена и превращения веществ. Ферменты обычно выявляют по наличию продуктов их активности.

В настоящее время широко используются флюоресцентные красители для специфического окрашивания биологических полимеров или клеточных органелл. Известны флюорохромы для выявления ДНК, РНК, липидов, митохондрий и т. д. Флюоресцентная цитохимия активно развивается.

Вопросы

1. Что такое цитохимия?
2. Как можно окрасить ДНК в клетках?
3. Как выявляется в клетках гликоген? Жир?

Иммуноцитохимия

Ближе к концу XX в. цитохимия перешла на новый качественный уровень. Стало успешно развиваться новое направление цитохимии – иммуноцитохимия, которая в настоящее время является одним из самых передовых методов клеточной биологии. Для этого метода применяются люминесцентные микроскопы и красители флюорохромы.

При использовании для иммуноцитохимии флюорохромы химическим путем «сшивают» (конъюгируют) с антителами. Антитела имеют специфичность к определенному белку, который служит антигеном, и взаимодействуют не с любыми клеточными структурами, а только с теми участками клеток, где находится изучаемый белок. Таким образом, с помощью метода цитохимии можно изучать, какие специфические белки локализованы в тех или иных клеточных структурах.

Антитела, используемые в иммуноцитохимии, могут быть маркированы, помимо люминесцентных красителей, ферментами или электронно-плотными частицами. В такой модификации метода выявление специфических белков осуществляется с помощью электронного микроскопа.

С помощью метода иммуноцитохимии изучены состав и расположение элементов цитоскелета клеток растений и животных, характерные особенности цитоскелета опухолевых

клеток. С помощью этого метода научились выявлять индивидуальность хромосом человека, что необходимо при изучении развития патологий, а также в судебной медицине. Метод иммуноцитохимии позволил выявить на поверхности разнообразных клеток индивидуальные маркеры, что облегчило понимание многих патологических процессов, позволило выяснить, какие клеточные типы являются отправной точкой в развитии ряда болезней. Например, показана роль макрофагов и гладкомышечных клеток кровеносных сосудов в развитии атеросклероза.

Вопросы

1. Для чего используется метод иммуноцитохимии?
2. В чем суть метода?
3. Что вы знаете о люминесцентном микроскопе?

Электронная микроскопия

Во второй половине XX в. стал активно использоваться новый метод микроскопирования, дающий в 100 раз большее разрешение биологических объектов по сравнению со световой микроскопией, – электронная микроскопия.

В электронном микроскопе изображение строится с помощью узкого пучка электронов, с высокой скоростью проходящего через срез ткани и взаимодействующего с ним. Электроны могут поглощаться срезом или отклоняться от исходного направления, в результате чего узкий пучок электронов будет рассеиваться. В качестве устройств, формирующих и фокусирующих поток электронов до взаимодействия со срезом ткани и после этого, используются мощные кольцевые электромагниты. Напряжение в колонне электронного микроскопа достигает 100 000 вольт. Изображение строится на люминесцентном экране, который дает свечение при взаимодействии с электронами. Вместо отображения объекта на светящемся экране его изображение можно зафиксировать на фотопластинке, что дает возможность получить фотоснимок. Для изучения биологических объектов пришлось разрабатывать новые методы приготовления препаратов.

Фиксируют ткани для электронной микроскопии глутаровым альдегидом, который «сшивает» белковые молекулы, и дофиксируют тетраоксидом осмия, который стабилизирует

ет двуслойные липидные мембраны и дополнительно фиксирует тканевые белки. Для получения срезов образцы ткани пропитывают полимерными смолами, которые затвердевают, образуя твердый пластмассовый блок. С него на специальном приборе ультрамикротоме стеклянными или алмазными ножами делают очень тонкие срезы толщиной 50–100 нм; с одной клетки можно приготовить 100–200 срезов. Затем срезы пропитывают солями тяжелых металлов (урана, свинца, фосфорно-вольфрамовой кислоты) для увеличения контрастности изображения. Готовые срезы помещают на тонкую медную сеточку, ячейки которой покрыты прозрачной полимерной пленкой, и просматривают в электронном микроскопе.

Кроме срезов, под электронным микроскопом изучают крупные биологические молекулы, структуру мембран, белковые глобулы, поверхность клеточных органоидов. При изучении поверхности органоидов или молекулярных комплексов добиваются контрастного изображения различными приемами. Обычно она достигается за счет напыления под углом к поверхности объекта тонкого слоя золота или платины. Толщина слоя золота на поверхности соответствует структурным особенностям объекта. Некоторые участки объекта будут иметь более толстый слой напыления, в других местах напыление будет отсутствовать из-за образования теневой зоны. Поток электронов в микроскопе направлен перпендикулярно к поверхности объекта, что обеспечит выяв-

ление светлых и темных участков на изучаемой поверхности, так как в зависимости от толщины слоя напыления металла степень поглощения электронов будет изменяться.

Электронная микроскопия обусловила значительный прогресс в развитии цитологии. Была описана тонкая структура ядра, всех цитоплазматических органоидов: эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи, всевозможных вакуолей, митохондрий, пластид, центриолей (рис. 5.1). Именно с помощью электронной микроскопии было показано, что двуспиральная молекула ДНК, выделенная из бактерий, имеет форму кольца.

Электронная микроскопия, в которой изображение строится с помощью потока электронов, проходящих через объект, называется трансмиссионной. Ее разрешающая способность для биологических объектов 2 нм при увеличении $\times 100\ 000$, что примерно соответствует диаметру двойной спирали ДНК.

Помимо трансмиссионной электронной микроскопии существует растровая (сканирующая) электронная микроскопия, когда изображение строится с помощью электронного луча, отраженного с поверхности изучаемого объекта. Такие электронные микроскопы называются сканирующими. В микроскопе образец сканируется узким пучком электронов. Когда луч электронов попадает на образец, то поверхность образца, на которую нанесен тонкий слой золота, испускает «вторичные электроны». Они регистрируются прибо-

ром и преобразуются в изображение на телевизионном экране. Максимальное разрешение сканирующего микроскопа меньше, чем трансмиссионного, и составляет 10 нм для биологических объектов, а увеличение $\times 20\ 000$. С помощью сканирующих микроскопов изучают внутренние поверхности кровеносных сосудов, поверхности клеток и небольших структур. Сканирующий микроскоп дает объемное изображение.

Вопросы

1. Какие типы электронных микроскопов вы знаете? Каково их разрешение?
2. Какие структуры можно увидеть в ядре и цитоплазме с помощью трансмиссионного электронного микроскопа?
3. В чем состоит принцип построения изображения в электронном микроскопе?
4. В чем особенности приготовления препаратов для электронной микроскопии?

Метод автордиографии

Метод автордиографии используют для выяснения, в каких местах в клетке идет синтез тех или иных полимерных молекул, для изучения, куда переносятся синтезированные вещества. Иначе метод называют радиоавтографией. Он может использоваться применительно и к световой, и к электронной микроскопии. Метод позволяет обнаруживать в клетке биологические полимерные молекулы, меченые радиоактивными изотопами. Ядра радиоактивных изотопов нестабильны, подвергаются распаду, испуская заряженные частицы или γ -лучи. Экспериментатор регистрирует этот радиоактивный распад на фотопленке.

Обычно в кровь животному вводится мономер биополимера, в котором один из атомов водорода замещен на радиоактивный тритий. Например, в состав молекулы ДНК входит нуклеотид тимидин. В молекуле тимидина один из атомов водорода замещают на тритий. Тимидин, распространяясь с кровью, будет включаться в те клетки, где в данный момент идет репликация ДНК. На окрашенных срезах тканей можно будет выявить клетки, находящиеся в S-фазе клеточного цикла. Для этого на окрашенный срез в темноте наносят обычную фотоэмульсию, которая при хранении препаратов засвечивается под действием энергии, излучаемой изотопами. После проявления фотоэмульсии над клетками,

находящимися в S-фазе клеточного цикла, появляются черные гранулы восстановленного серебра, образующиеся в фотоземлюсии.

Именно так в 60-е гг. XX в. было показано, что в составе нейронов головного мозга, в некоторых его отделах, возможна репликация ДНК. Но в то время было трудно представить, что в головном мозге млекопитающих присутствуют стволовые клетки, способные к делению. Тогда предположили, что репликация ДНК в нейронах головного мозга связана с процессом памяти.

Именно методом автордиографии было показано, что ДНК всегда находится в ядре и никуда оттуда не выходит. РНК, напротив, синтезируется в ядре, а затем выходит в цитоплазму. Белок никогда не синтезируется в ядре. Место синтеза белка – рибосомы цитоплазмы. Отсюда белок может перемещаться и в ядро, и внутрь органелл цитоплазмы.

В заключение следует отметить, что каждый метод имеет свои преимущества и недостатки. Исследователь должен использовать несколько взаимодополняющих методов, чтобы сделать окончательный вывод.

Вопросы

1. Для чего используется метод автордиографии?
2. В чем суть метода?
3. Какие результаты получены с помощью этого метода?

Фракционирование клеток

С середины XX в. цитологи получили возможность исследовать не только целые клетки, но и отдельные органоиды, выделенные из клеток в жизнеспособном состоянии. Для этого используется метод фракционирования клеток, основанный на дифференциальном центрифугировании.

Для получения образцов органоидов фрагменты ткани разрушают таким образом, чтобы клеточные структуры остались неповрежденными. С этой целью подбирают подходящие условия гомогенизации, т. е. разрушения клеток, подходящую среду для выделения клеточных структур, буфер для поддержания определенного рН, в процессе выделения поддерживают низкую температуру, близкую к нулю. В результате получают суспензию клеточных органоидов, которая содержит ядра, митохондрии, лизосомы, аппарат Гольджи, фрагменты эндоплазматического ретикулума, рибосомы и обрывки клеточных мембран. Суспензию начинают центрифугировать на специальных приборах – центрифугах. Разные органоиды осаждаются на дно пробирки при разных скоростях центрифугирования. Скорость оседания зависит от размера частицы и ее плотности. При низких скоростях центрифугирования в первую очередь осаждаются ядра. Получив осадок ядер, оставшуюся суспензию переливают в другую пробирку для следующего этапа центрифугиро-

вания. Осадок, состоящий из клеточных ядер, размешивают и используют в экспериментальной работе. Так повторяют несколько раз, увеличивая скорость и продолжительность центрифугирования. Самые высокие скорости центрифугирования необходимы для получения самых маленьких оргanelл – рибосом. Ядра осаждаются на дно пробирки при центрифугировании в течение двух минут с ускорением 2000 g. Осадок митохондрий получают через 30 минут центрифугирования с ускорением 15 000 g, а рибосомы собирают через 3 часа центрифугирования с ускорением 40 000 g.

С помощью этого метода впервые в клетках были открыты лизосомы – небольшие вакуоли, содержащие гидролитические ферменты и выполняющие пищеварительные функции в клетках. После открытия лизосом методом фракционирования, их обнаружили на срезах клеток под световым и электронным микроскопом с помощью метода цитохимии, выявив работу специфических ферментов.

Возможность получения чистых фракций отдельных органоидов позволила изучить их химический состав, набор ферментов и, в конечном итоге, понять, как работает та или иная клеточная структура.

Вопросы

1. Что такое гомогенизация клеток?
2. Почему разные органоиды клетки при центрифугировании осаждаются на дно не одновременно?

3. Какие клеточные органоиды были открыты именно с помощью метода фракционирования клеток?

Метод клеточных культур

Обычно лаборатории, занимающиеся изучением биологии клетки, имеют в своем арсенале несколько методов. Метод клеточных культур обязательно есть в их числе.

В начале XX в. французский ученый А. Каррель установил, что в асептических условиях клетки многоклеточного организма могут расти в искусственной питательной среде в течение длительного времени. В настоящее время известно, что большинство видов клеток растений и животных в благоприятных условиях способны не только жить и размножаться вне организма, но и дифференцироваться, приобретая важные черты специализации. Например, клетки сердечной мышцы в клеточной культуре могут сокращаться.

Для получения клеточной культуры небольшие кусочки ткани диссоциируют на отдельные клетки, используя ферментативную и механическую обработку, и получают суспензию клеток. Затем клетки помещают в специальные сосуды с плоским дном: стеклянные или пластиковые, и заливают искусственной питательной средой. Для каждого типа клеток среда индивидуальна. Для большинства животных клеток питательная среда имеет в своем составе глюкозу, незаменимые аминокислоты, витамины и небольшой процент сыворотки крови. Важно поддерживать нейтральную реакцию среды, оптимальную температуру, не допускать ин-

фекционного заражения. В таких условиях клетки осаждаются на дно сосуда культивирования, прикрепляются к стеклу, распластываются на нем, приобретают характерную для них форму и начинают делиться. Через несколько суток вся поверхность дна сосуда становится заполненной клетками. Наступает момент контактного торможения, клетки прекращают делиться. Нормальные клетки могут в течение некоторого времени сохранять жизнеспособность в таком покоем состоянии. Для дальнейшего культивирования их собирают из первого сосуда и переносят в несколько других сосудов в тех же условиях. Цикл повторяется заново. Так получают перевиваемые клеточные культуры.

Именно с помощью метода клеточных культур впервые были описаны особенности опухолевых клеток. Первая особенность – способность к бесконечному делению. В 50-е гг. XX в. была получена перевиваемая клеточная культура раковых клеток опухоли молочной железы. Культура получила название HeLa по первым буквам имени оперированной пациентки. Эти клетки живы до сих пор, и с ними работают во многих лабораториях мира. За прошедшие годы ученые вырастили тонны этих клеток, хотя самой пациентки давно уже нет в живых.

Другая особенность раковых клеток: они не прекращают делиться, заполняя всю поверхность сосуда. Клетки наползают друг на друга, могут образовывать второй и третий слой. Нетрансформированные нормальные клетки могут де-

литься ограниченное количество раз. Такую культуру нельзя поддерживать бесконечно долго. После нескольких пересевов клетки перестают делиться и погибают.

Работа с клеточными культурами дает большие возможности для исследователей. На ранних этапах развития цитологии клеточные культуры использовали для визуального наблюдения за живыми клетками. Изучали процессы митоза, движения клеток, образования контактов между клетками. Сейчас на клеточных культурах изучают процессы дифференцировки, получают перевиваемые клеточные линии стволовых эмбриональных клеток. Клеточные культуры используют для моделирования различных патологических состояний: ишемии, химического или гормонального стресса, для переноса чужеродной генетической информации и т. д. Клеточные культуры находят широкое практическое применение для получения специфических антител, ферментов, факторов регуляции жизнедеятельности клеток, их используют при разработке вакцин.

Из клеточных культур растений можно вырастить целые организмы, поэтому их используют для создания новых сортов растений, обладающих важными для человека свойствами.

Вопросы

1. Как получают перевиваемые клеточные культуры?
2. Какие особенности раковых клеток были изучены в кле-

точной культуре?

3. Для чего используются клеточные культуры?

Конфокальная микроскопия

Широкий интерес к конфокальной микроскопии появился в конце XX в. благодаря бурному развитию компьютерной и лазерной технологий. Конфокальный микроскоп – это оптико-электронный прибор. В его основе лежит люминесцентный микроскоп, где объект освещается лазерным лучом и полученное изображение обрабатывается с использованием памяти компьютера. За счет такого приема можно воссоздать объемное изображение объекта при исследовании серии оптических срезов. Изображение создается на экране компьютера. Разрешение микроскопа увеличивается по сравнению с обычным люминесцентным микроскопом примерно в 1,5 раза. Основное достоинство конфокального микроскопа – не рост разрешающей способности, а существенное увеличение контрастности изображения.

Конфокальный микроскоп дает две неопределимые возможности: он позволяет исследовать ткани на клеточном уровне в состоянии физиологической жизнедеятельности, а также оценивать результаты исследований в четырех измерениях: высота, ширина, глубина и время.

В таком микроскопе используются принципы люминесцентной микроскопии и иммуноцитохимии с применением специальных флюорохромов для конфокальных микроскопов. Помимо флюоресцентного конфокального изобра-

жения, в микроскопе можно получить соответствующее ему изображение образца в проходящем свете.

Использование конфокального микроскопа позволяет локализовать отдельные гены в структуре интерфазного ядра; изучать одновременно два или более белков, помеченных разными антителами, чтобы понять существует ли функциональная связь между ними; исследовать динамические процессы в клетке, в том числе и транспорт веществ через мембраны.

Благодаря использованию научно-технических достижений XX и XXI вв. в цитологии были разработаны новые методы, позволившие перейти на новый молекулярный уровень исследований с возможностью изучения не только структур клетки, но и молекул, выполняющих разнообразные функции.

Вопросы

1. Опишите принцип устройства конфокального микроскопа.
2. Каково его разрешение?
3. Для чего используется конфокальный микроскоп?

Глава 3. Химическая организация клетки

Живая клетка состоит из ограниченного набора химических элементов, хотя количество их велико. На долю шести элементов приходится более 99 % от сухой массы клеток. Это углерод, водород, азот, кислород, фосфор и сера (С, Н, N, О, Р, S). Это главные компоненты всех органических соединений клетки.

Химическое соединение, которое в максимальном количестве представлено в клетке, – вода. Практически все внутриклеточные реакции протекают в водной среде. Вода составляет более 70 % клеточной массы.

В растворенном виде в цитоплазме находятся малые органические молекулы, в состав которых входят четыре основных химических элемента, – С, Н, О и N. Например, аминокислоты, простые сахара, нуклеотиды и предшественники жирных кислот. Эти молекулы дают начало макромолекулам: нуклеиновым кислотам, белкам, полисахаридам, жирным кислотам. Кроме того, малые молекулы могут расщепляться в клетке до простых соединений, и энергия их химических связей будет использоваться клеткой для многих процессов жизнедеятельности. Так, глюкоза в процессе окисления расщепляется до углекислого газа и воды. Осво-

бодившаяся энергия аккумулируется в форме двух важнейших соединений клетки – АТФ и НАД·Н.

Простые сахара используются клеткой для построения сложных полисахаридов, которые являются запасными веществами. В животной клетке вещество запаса гликоген, а в растительной – крахмал. Мономером этих веществ служит глюкоза. Целлюлоза, главный компонент оболочки растительных клеток, тоже является полимером, построенным из простых сахаров.

Аминокислоты являются строительным материалом для синтеза гигантских линейных полимеров – белков. В белках обычно встречается 20 разных аминокислот. Все аминокислоты имеют общую особенность в строении молекул: карбоксильную группу (-COOH) и аминогруппу (-NH₂), связанные с одним и тем же углеродным атомом.

Нуклеотиды при полимеризации образуют РНК и ДНК. В состав нуклеотида входит азотистое основание, связанное с пятиуглеродным сахаром (рибозой или дезоксирибозой), который в свою очередь несет еще и фосфатную группу. Пиримидиновые азотистые основания – цитозин, тимин и урацил – являются производными шестичленного кольца. Пуриновые основания (гуанин и аденин) дополнены вторым пятичленным кольцом. Нуклеотид имеет название, соответствующее азотистому основанию:

Азотистое основание	Нуклеотид
цитозин	цитидин
тимин	тимидин
урацил	уридин
гуанин	гуанидин
аденин	аденозин

Роль нуклеотидов в клетке связана не только с нуклеиновыми кислотами. Основной носитель энергии в клетке – АТФ, имеет в своем составе азотистое основание аденин, соединенное с рибозой, к которой последовательно присоединены три остатка фосфорной кислоты. Другое производное аденина – циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) – служит уникальным внутриклеточным сигналом и регулятором скорости множества реакций в клетке.

Основную роль в метаболизме клеток играют гигантские полимерные макромолекулы – белки, нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК), жирные кислоты и углеводы.

Вопросы

1. Перечислите малые органические молекулы цитоплазмы клеток.
2. Какова роль глюкозы в клетке?
3. Назовите вещества запаса растительной и животной клетки.
4. Какова роль аминокислот в клетке? В чем особенность

их строения?

5. Что такое нуклеотид?

6. Перечислите и охарактеризуйте известные вам нуклеотиды.

7. Какую роль нуклеотиды выполняют в клетке?

Белки

Функции белков. Белки – это сложные органические соединения, состоящие из углерода, водорода, кислорода и азота. В некоторых белках содержится сера. Молекулы белков – цепи, построенные из аминокислот. Это макромолекулы. Их масса колеблется от нескольких тысяч до нескольких миллионов дальтон. В природных белках встречается двадцать различных аминокислот. Каждому белку свойственна своя особая последовательность аминокислот. Количество разнообразных белков в природе исчисляется десятками тысяч. В клетках на их долю приходится более 50 % от сухой массы. На клеточном уровне они выполняют много функций. Белки входят в состав всех клеточных органоидов, то есть выполняют структурные функции. В процессе метаболизма в клетке одновременно происходит несколько тысяч реакций. Каждая реакция контролируется специализированным белком – ферментом, который отвечает за точность и скорость проведения реакции. Работа ферментов очень специфична. Один фермент контролирует проведение одной реакции. Ферментативная функция белков – одна из важнейших функций в клетке. С помощью белков происходит транспорт веществ в организме и на клеточном уровне. Все знают белок гемоглобин, осуществляющий перемещение кислорода и углекислого газа в крови. Этот пример

демонстрирует транспортную функцию белков. Невозможна жизнь организма без защиты от болезнетворных факторов внешней среды. Эту функцию выполняет иммунная система. В основе работы иммунной системы лежит взаимодействие белков с чужеродными химическими соединениями. Мы перечислили только самые важные функции белков. На самом деле их гораздо больше. Белки – важный компонент пищи животных. В организме они расщепляются до аминокислот, которые используются клетками для построения новых белков.

Вопросы

1. Какие мономеры входят в состав белков?
2. Какую долю по массе составляют белки в клетке?
3. Перечислите основные функции белков в клетках.
4. Почему говорят о специфичности работы ферментов?
5. Назовите белок, который выполняет транспортную функцию.

Строение белков

1. *Аминокислоты. Пептидная связь.* Аминокислоты, соединенные друг с другом последовательно, образуют первичную структуру белка, или полипептидной цепи.

Каждая аминокислота имеет группу – NH_2 , которая обладает свойствами основания, и группу – COOH , характерную

для всех органических кислот. Следовательно, аминокислоты – амфотерные соединения, совмещающие свойства кислоты и основания. Они способны взаимодействовать друг с другом. Взаимодействуя с помощью рибосом, молекулы аминокислот образуют связи между углеродом кислотной группировки и азотом основной группы. Образовавшаяся ковалентная связь называется пептидной связью. Побочный продукт реакции – вода. Полипептидные цепочки из аминокислот обычно не ветвятся и не замыкаются в кольцо.

Аминокислоты имеют общий план строения, но отличаются друг от друга по строению радикала. Радикалы могут иметь простое или сложное строение, могут содержать серу: – CH_2SH .

2. *Вторичная структура. Белковая спираль.* Громадная полипептидная цепь самопроизвольно складывается в пространстве за счет взаимодействия между остатками карбоксильных и аминогрупп аминокислотных остатков. Основа взаимодействия аминокислотных остатков – слабые водородные связи, многократно повторяющиеся вдоль длинной полипептидной цепи. В результате такого взаимодействия цепь приобретает вид спирали (α -структура) (рис. 3.1).

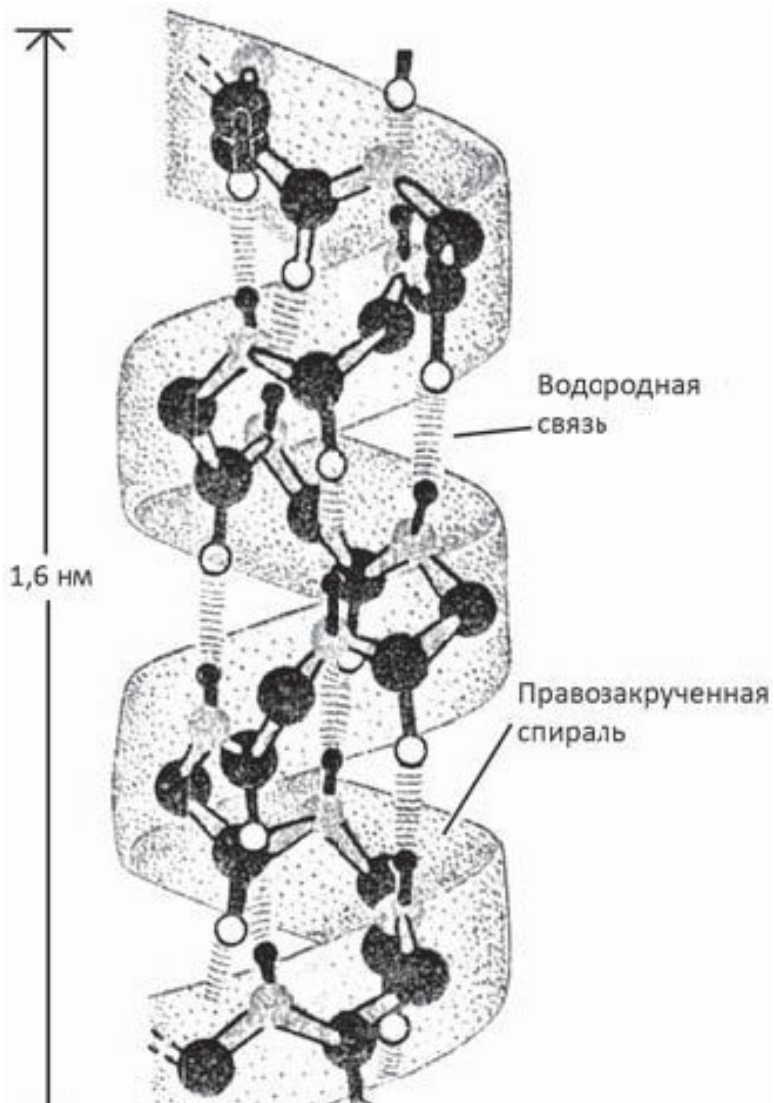


Рис. 3.1. Вторичная структура полипептида – α -спираль (по Албертс, Брей, Льюис и др., 1994).

3. *Третичная и четвертичная структуры.* Третичная структура образуется благодаря взаимодействию между собой сложных радикалов аминокислотных остатков в составе одного белка. Например, удаленные друг от друга в полипептидной цепи две аминокислоты, содержащие в составе радикалов серу, могут образовывать дисульфидные мостики, или S-S связи. Благодаря подобным взаимодействиям полипептидная спираль сворачивается и приобретает специфическую форму, например глобулы. Большинство белков глобулярные: общая формула их молекул более или менее сферическая. Известны и фибриллярные белки. Их молекулы в рабочем состоянии вытянуты в волокно. Пространственная конфигурация полипептидной молекулы играет важную роль в осуществлении ее функции.

Четвертичная структура белка представляет собой сложное функциональное объединение нескольких полипептидных молекул с третичной структурой. Например, молекула белка гемоглобина включает в себя четыре полипептида с третичной структурой: две молекулы α -гемоглобина и две молекулы β -гемоглобина. Кроме того, в центре этой сложной молекулы находится гетероциклическое соединение, в состав которого входит железо. Функциональная особенность гемоглобина, как и других белковых молекул, зависит от его

пространственной конфигурации (рис. 3.2).

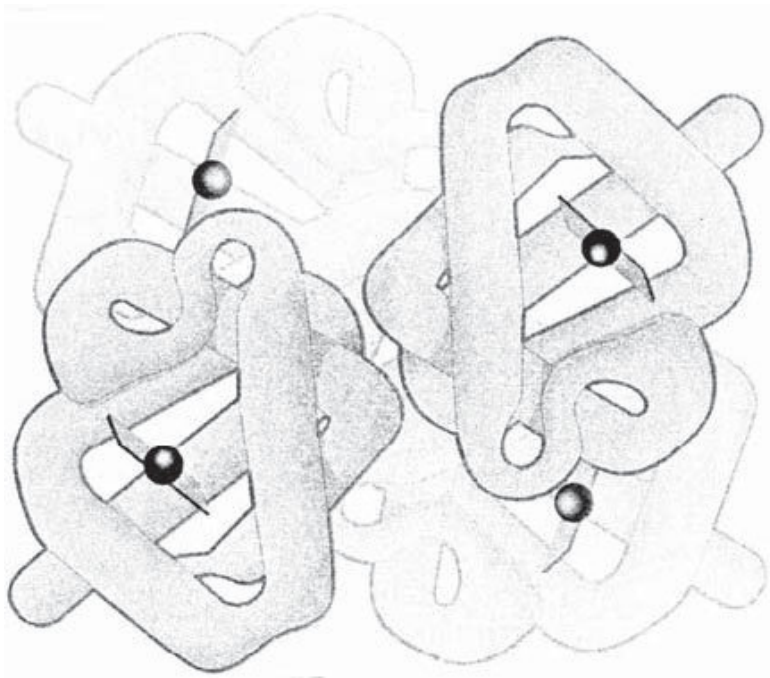


Рис. 3.2. Третичная и четвертичная структура молекулы гемоглобина.

Биосинтез белка осуществляется в цитоплазме всех живых клеток. Происходит этот процесс на рибосомах с участием матричных РНК (мРНК) и транспортных РНК (тРНК), которые образуются в ядре, как на матрице, на молекуле

ДНК. Хотя молекулы ДНК не принимают непосредственного участия в биосинтезе белка на рибосомах, они играют в этом процессе ключевую роль. В них закодирована информация о последовательности аминокислот в молекуле белка. Главный постулат клеточной биологии: ДНК \rightarrow РНК \rightarrow белок. Чтобы разобраться в процессе биосинтеза белка, рассмотрим строение и функции нуклеиновых кислот, что важно для понимания работы клетки.

Вопросы

1. Какие химические элементы входят в состав молекул белков?
2. Из каких химических соединений образуются молекулы белков в клетке?
3. В чем значение водородных связей в белковых молекулах?
4. В чем значение правильных пространственных конфигураций белковых молекул?
5. Каким образом формируется глобулярная структура белка?
6. Приведите пример белка, для которого характерна четвертичная структура.
7. Что такое полипептид?

Нуклеиновые кислоты

Нуклеиновые кислоты – ДНК и РНК – необходимы для жизни. Они представляют собой генетический материал всех живых организмов вплоть до самых простых вирусов. Открытие структуры ДНК, одного из типов нуклеиновых кислот, позволило понять, каким образом в ней кодируется генетическая информация, необходимая живым организмам для регуляции жизнедеятельности. Понимание структуры ДНК навело на мысль о том, как эта информация удваивается, без чего невозможно размножение клеток и организмов.

Нуклеиновые кислоты являются длинными полимерными молекулами. Например, длина молекулы ДНК может достигать нескольких сантиметров. Мономерами нуклеиновых кислот являются нуклеотиды. Сахара в молекулах ДНК и РНК различаются: в ДНК – дезоксирибоза, в РНК – рибоза. Специфичность молекул ДНК и РНК определяется последовательностью азотистых оснований или нуклеотидов. Азотистые основания и нуклеотиды принято обозначать первой буквой их названия. В состав ДНК входят четыре типа азотистых оснований: А (аденин), Г (гуанин), Т (тимин), Ц (цитозин). В состав РНК – так же четыре, но вместо тимина (Т) урацил (У).

Нуклеиновые кислоты являются кислотами потому, что в

их молекулах содержится очень большое количество остатков фосфорной кислоты. Каждый нуклеотид, являющийся мономером ДНК или РНК, имеет в своем составе остаток фосфорной кислоты. Нуклеотиды соединяются друг с другом в длинные полимерные молекулы с помощью фосфатных группировок. Остатки фосфорной кислоты соединяют между собой сахара посредством прочной ковалентной фосфодиэфирной связи. Образуется длинный неразветвленный сахарофосфатный остов полинуклеотида, который является прочным и стабильным. Это очень важно, так как в результате уменьшается риск нарушений структуры в молекулах ДНК и РНК.

Структура ДНК. ДНК состоит из двух длинных полинуклеотидных цепей. Длина молекулы может достигать до нескольких сантиметров. Каждая цепь закручена в спираль вправо. Две цепи свиты вместе, закручены вправо вокруг одной и той же оси, в результате чего образуется двойная спираль. Две цепи двойной спирали антипараллельны, то есть направлены в противоположные стороны (рис. 3.3), направление расположения сахаров противоположно. Каждая цепь состоит из сахарофосфатного остова, вдоль которого перпендикулярно длинной оси располагаются азотистые основания. Азотистые основания двух цепей двойной спирали ДНК находятся строго друг против друга, перпендикулярно длинной оси. Азотистые основания двух цепей связаны между собой слабыми водородными связями. Промежуток между це-

пиями имеет постоянный размер. Он равен расстоянию, занимаемому парой азотистых оснований. Аденин всегда спаривается только с тиминном (А – Т), а гуанин – с цитозином (Г – Ц). Последовательность нуклеотидов одной цепи ДНК определяет последовательность нуклеотидов другой цепи. Поэтому говорят, что две цепи двойной спирали ДНК комплементарны друг другу. Никаких ограничений относительно последовательности нуклеотидов в одной цепи ДНК не существует. На один полный оборот двойной спирали приходится 10 пар азотистых оснований. Вдоль оси молекулы соседние пары оснований располагаются на расстоянии 0,34 нм одна от другой, строго периодически.

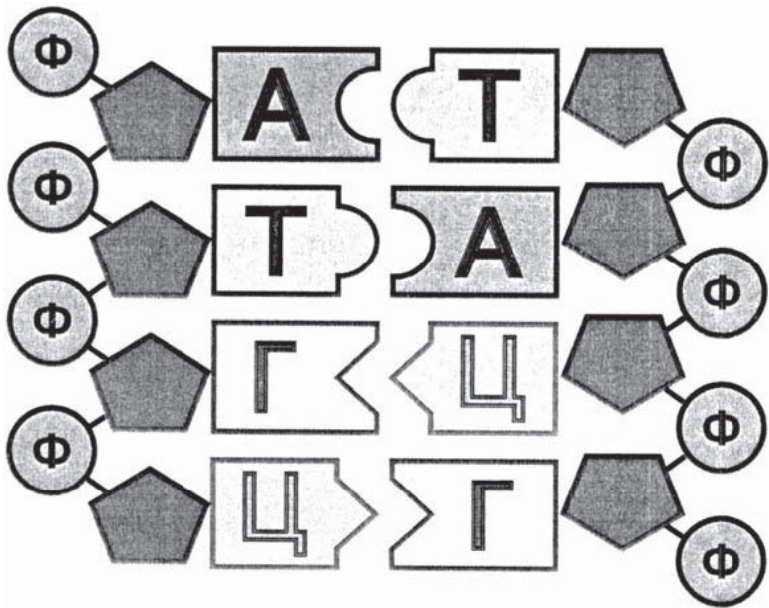


Рис. 3.3. Схема антипараллельности двух нитей в молекуле ДНК. Сахара двух нитей имеют противоположное направление.

Вопросы

1. Назовите азотистые основания, входящие в состав молекул ДНК и РНК. Какое азотистое основание присутствует в ДНК и отсутствует в РНК?
2. Что такое нуклеотид?

3. Как связаны между собой нуклеотиды в составе нуклеиновых кислот?
4. Что такое сахарофосфатный остов?
5. В чем принцип комплементарности азотистых оснований в молекуле ДНК? Приведите примеры.
6. Объясните структуру молекулы ДНК.
7. Что вы знаете о строении молекул РНК?

Функции РНК. Молекулы РНК в несколько раз меньше, чем молекулы ДНК. РНК, в отличие от ДНК, является одноцепочечной молекулой, хотя отдельные участки могут быть комплементарны друг другу, за счет чего образуются небольшие двуспиральные участки – «шпильки». Это важно при образовании пространственной структуры молекул РНК (рис. 3.4).

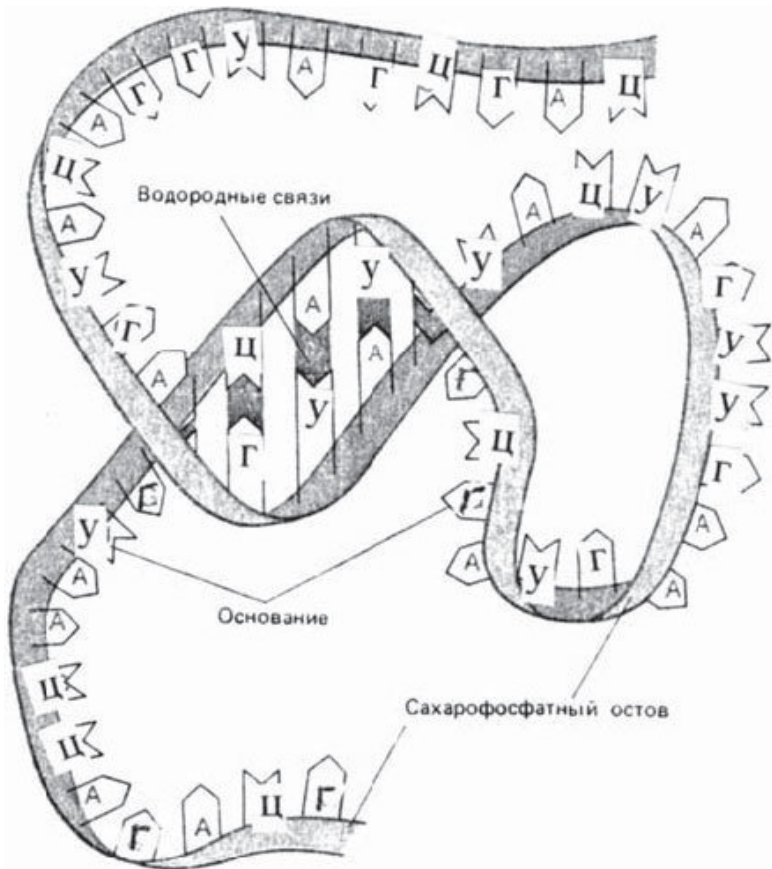


Рис. 3.4. Схема участка одинарной цепи РНК. Присутствуют короткие спаренные области, образованные за счет комплементарности азотистых оснований в небольших участках молекулы (по Албертс, Брей, Льюис и др., 1994).

РНК – это класс разнообразных по размерам и функциям молекул, которые служат посредником при реализации генетической информации в процессе биосинтеза белка. Все типы молекул РНК образуются на молекуле ДНК, как на матрице, по принципу комплементарности азотистых оснований:

Азотистые основания в ДНК	Азотистые основания в РНК
А	У
Т	А
Г	Ц
Ц	Г

Этот процесс образования РНК на одной из цепей молекулы ДНК называется транскрипцией. Во время транскрипции двуспиральная молекула ДНК раскручивается на небольшом участке, где происходит синтез РНК. Затем РНК отделяется от участка молекулы ДНК, а ДНК опять скручивается в двойную спираль. Молекулы РНК перемещаются из ядра в цитоплазму. В клетке процесс транскрипции и созревания молекул РНК, а также их выход в цитоплазму, происходит в несколько этапов, с участием большого количества ферментов, разнообразных структурных и регуляторных белков. Но наша задача – усвоить принцип процессов, обеспечивающих биосинтез белка, а, следовательно, процесс реализации гене-

тической информации.

В клетке различают три основных класса молекул РНК: мРНК (матричная РНК), тРНК (транспортная РНК) и рРНК (рибосомная РНК). Матричную РНК часто называют информационной РНК (иРНК), это синонимы.

Матричная РНК, попадая в цитоплазму, соединяется с рибосомой. Последовательность нуклеотидов мРНК кодирует определенную последовательность аминокислот в молекуле белка.

Транспортная РНК также находится в цитоплазме вблизи рибосом. Она транспортирует аминокислоту из жидкой фазы цитоплазмы в рибосому. Транспортную РНК иногда называют трансферной, или адаптерной. Количество разных тРНК велико, так как каждой аминокислоте соответствует своя тРНК.

Рибосомная РНК представлена несколькими молекулами разного размера, которые входят в состав рибосом. Рибосомы почти полностью образуются в ядре, а потом в виде двух незрелых субъединиц выходят в цитоплазму. Следовательно, отдельных молекул рРНК в цитоплазме нет.

Таким образом, ДНК и РНК играют ключевую роль в кодировании и реализации генетической информации.

Функции ДНК. Одна из главных функций ДНК – кодирование генетической информации. Длинные молекулы ДНК «разделены» на отдельные участки, каждый из которых кодирует один полипептид. Такой участок ДНК называют ге-

ном. В одной молекуле ДНК может находиться от нескольких сотен до нескольких тысяч генов. Ключом к кодированию генетической информации является генетический код.

Генетический код – это последовательность трех нуклеотидов, которая кодирует одну аминокислоту полипептида. Итак, ген – это большой участок молекулы ДНК, а генетический код имеет в своем составе всего три нуклеотида.

Принцип кодирования одинаков для всех живых организмов. Это свойство генетического кода называют универсальностью. Универсальность генетического кода говорит о том, что принцип кодирования сложился на самых ранних этапах эволюции, еще в те времена, когда на Земле, кроме прокариот, не было других живых организмов.

Кроме триплетности и универсальности у генетического кода есть еще одно важное свойство – вырожденность. Оно означает, что одна аминокислота может быть закодирована не одним триплетом, а двумя, тремя, или даже четырьмя вариантами триплетов.

Таким образом, генетическая информация в ДНК закодирована в генах с помощью генетического кода.

Для сохранения жизни на Земле должен существовать не только принцип кодирования генетической информации, но и способ ее удвоения. Клетки делятся, из одной получаются две, и каждая из дочерних клеток должна получить идентичную генетическую информацию от материнской клетки.

Уникальным свойством воспроизведения себе подобной

обладает только молекула ДНК. Процесс удвоения молекулы ДНК называется репликацией. Он сходен у прокариот и эукариот. У эукариот репликация ДНК происходит в ядре только во время S-фазы клеточного цикла и длится 9–10 часов. У прокариот молекула ДНК короче и реплицируется в течение 20–30 минут непосредственно в цитоплазме.

Принцип репликации простой: две нити двуспиральной молекулы ДНК отходят друг от друга, и на каждой из них синтезируется новая нить, комплементарная данной. Свойство комплементарности азотистых оснований обеспечивает образование двух новых молекул, полностью идентичных материнской ДНК. Каждая из двух новых молекул будет содержать одну нить ДНК исходную, материнскую, а другую новую, синтезированную заново. Такой способ репликации называют полуконсервативным (рис. 3.5).

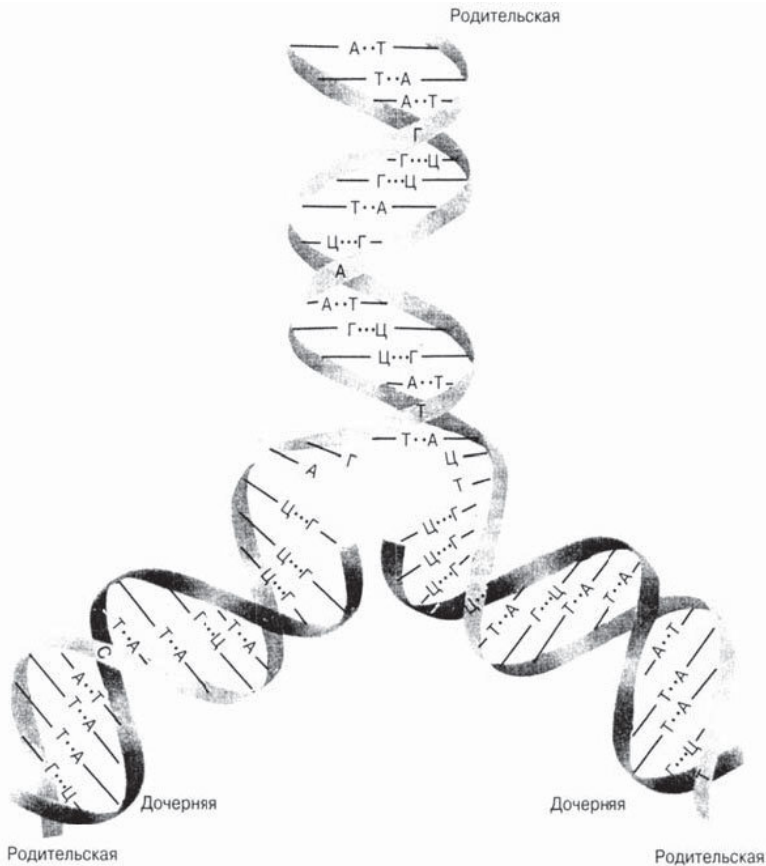


Рис. 3.5. Модель репликации двойной спирали ДНК, предложенная Дж. Уотсоном и Ф. Криком. Полуконсервативный способ репликации (по Ченцову, 2004).

Изучение процесса репликации показало, насколько он сложен. В этом процессе работает ферментативный комплекс, объединяющий не менее 10 разнообразных ферментов. Начало репликации связано с образованием сложной пространственной структуры – «вилки» репликации, где спаренные цепи в молекуле ДНК расходятся при разрушении водородных связей между азотистыми основаниями. Главную работу по полимеризации нуклеотидов в цепи ДНК катализирует фермент ДНК-полимераза. Синтез двух новых цепей ДНК происходит не синхронно. На одной цепи этот процесс идет быстрее, а на другой медленнее. Соответственно, синтезируемые цепи ДНК так и называются – ведущая и отстающая.

Итогом репликации является точное удвоение материнской молекулы ДНК.

Вопросы

1. Перечислите типы молекул РНК, назовите их функции.
2. Что такое транскрипция?
3. Какие типы РНК образуются в результате транскрипции?
4. Что такое ген?
5. Что такое генетический код? Каковы его свойства?
6. Как связаны понятия «ген» и «генетический код»?
7. Что такое репликация? В чем значение этого процесса?
8. Назовите основные принципы репликации.

9. В чем состоит принцип полуконсервативности процесса репликации?

Биосинтез белка

Началом процесса синтеза белка считается копирование одной из нитей ДНК на небольшом участке, называемом геном, с образованием мРНК. Процесс копирования участка ДНК, как известно, называется транскрипцией. У прокариот он происходит в цитоплазме, у эукариот – в ядре интерфазной клетки. Транскрипция – это начальный этап передачи информации от ДНК для синтеза белка. Когда идет процесс транскрипции, то говорят, что ген работает. Работающие гены – это гены, на которых происходит транскрипция.

После транскрипции молекулы РНК выходят из ядра в цитоплазму, где находятся рибосомы – органоиды клетки, функцией которых является биосинтез белка. Рибосомы всех типов живых клеток имеют сходное строение. Это немембранный органоид почти сферической формы, диаметром около 20 нм, состоящий из большой и малой субъединиц. В рибосомах есть участок, где присоединяется длинная молекула мРНК. Каждая молекула мРНК соответствует одному гену, т. е. копирует небольшой участок молекулы ДНК, который отвечает за синтез одной молекулы белка. В составе рибосомы одновременно может находиться только маленький участок мРНК, он соответствует шести нуклеотидам.

Молекулы мРНК длинные, в их составе может быть

несколько сотен нуклеотидов. Последовательность нуклеотидов кодирует последовательность аминокислот в белке. Кодирование происходит одинаково у всех живых организмов. Каждые три нуклеотида кодируют одну аминокислоту. Это свойство генетического кода – триплетность. Молекула мРНК, постепенно считываясь, пропускается через рибосому, каждый раз продвигаясь на 3 нуклеотида, и вся информация, которая в ней закодирована, реализуется.

Расшифровка генетической информации в рибосоме происходит с помощью молекул тРНК. По сравнению с мРНК, это небольшие молекулы. Они тоже образуются в ядре на ДНК, как на матрице, на специальных участках. Из ядра молекулы тРНК выходят в цитоплазму, направляясь к рибосомам.

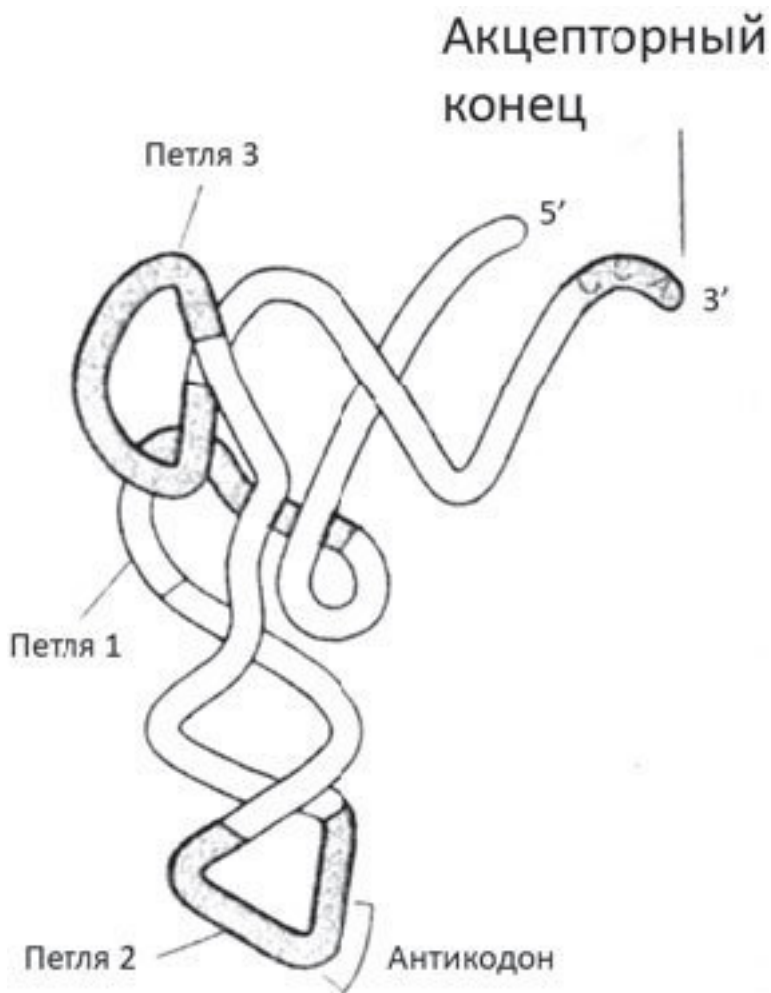


Рис. 3.6. Строение молекулы тРНК. Один ее конец (ак-

цепторный) предназначен для присоединения аминокислоты. Вторым важным участком – антикодон, состоящий из трех нуклеотидов (по Албертс, Брей, Льюис и др., 1994).

Известен 61 вид молекул тРНК. Они отличаются друг от друга тройкой азотистых оснований на самой вершине молекулы. Это очень важный участок тРНК. С помощью него тРНК находит свое место в рибосоме. Этот участок называется антикодон. Любая тРНК только тогда займет свое место в рибосоме, когда ее антикодон будет комплементарен генетическому коду мРНК. В тРНК известен еще один важный участок (акцепторный конец) – это один из ее концов, сюда присоединяется аминокислота. Присоединение аминокислоты специфично и соответствует антикодону (рис. 3.6).

Транспортные РНК приносят аминокислоты к рибосоме и занимают свое место на специальных участках рибосомы, взаимодействуя с мРНК. В рибосоме одновременно находятся два триплета иРНК, следовательно, к рибосоме сразу могут присоединяться две молекулы тРНК. Расположены они близко друг к другу, почти соприкасаются (рис. 3.7).

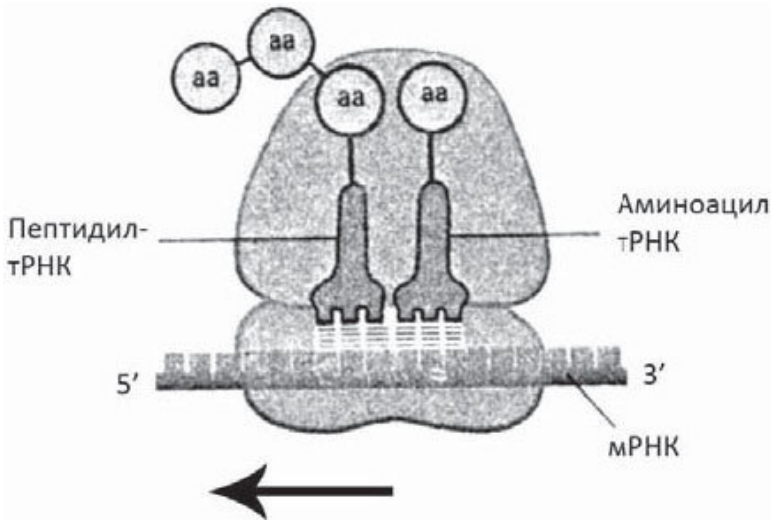


Рис. 3.7. Схема нагруженной рибосомы, удерживающей мРНК и две молекулы тРНК с грузом. Левая тРНК удерживает синтезируемый пептид из трех аминокислот (aa). Правая тРНК доставила следующую аминокислоту. Стрелка показывает направление смещения мРНК относительно рибосомы (по Албертс, Брей, Льюис и др., 1994).

Главная функция тРНК – доставить аминокислоты в рибосому. Из аминокислот в рибосоме синтезируется белок.

Взаимосвязь тРНК с аминокислотами происходит в цитоплазме вне рибосомы. Аминокислота присоединяется к концевому участку тРНК. Один вид тРНК может связать аминокислоту только определенного вида. Например, антикодон

тРНК – ГЦУ, это соответствует кодону ЦГА в мРНК, а, следовательно, аминокислоте – аргинину (арг). Транспортная тРНК с аргинином займет свое место в рибосоме, когда в соответствующем участке мРНК в рибосоме будет триплет азотистых оснований – ЦГА.

Итак, допустим, две тРНК с соответствующими аминокислотами занимают свое место в рибосоме. Аминокислоты, принесенные ими, находятся близко друг к другу, и рибосома соединяет их химической связью. Образуется маленькая белковая молекула, состоящая всего из двух аминокислот. Затем первая тРНК освобождается и уходит в цитоплазму, где она опять может присоединить к себе соответствующую аминокислоту. Вторая тРНК удерживает в это время синтезируемую молекулу белка. В этот момент мРНК вместе со второй тРНК и синтезируемой молекулой белка передвигается на три нуклеотида влево, согласно стрелке на схеме (рис. 3.7). Вторая тРНК занимает в рибосоме место первой. Место второй тРНК оказывается свободным, но здесь уже следующий триплет азотистых оснований в молекуле мРНК. Чтобы третья тРНК с соответствующей аминокислотой заняла свое место в рибосоме, у нее должен быть комплементарный антикодон.

Процесс будет продолжаться до тех пор, пока не считается вся информация с мРНК. Весь процесс происходит в рибосоме и называется трансляцией. Язык кодирования в последовательности азотистых оснований переводится на другой

язык – последовательности аминокислот.

Цикл присоединения одной аминокислоты длится доли секунды. Белок из 400 аминокислот синтезируется очень быстро, примерно за 20 секунд. Однако процесс биосинтеза белка требует больших затрат энергии. Для образования одной пептидной связи необходимо 4 молекулы энергоносителя.

Мы рассмотрели основные принципы биосинтеза белка в клетке, но на самом деле этот процесс очень сложен. Существует много форм регуляции как самого процесса биосинтеза, так и его начальной и конечной фаз.

Вопросы

1. Какой процесс в ядре предшествует биосинтезу белка?
2. Какова роль рибосом в биосинтезе белка?
3. В чем значение мРНК в биосинтезе белка?
4. Какова функция тРНК в биосинтезе белка?
5. Сколько тРНК может одновременно находиться в рибосоме?
6. Что такое пептидная связь?
7. Насколько быстро синтезируется белок в клетке?

Глава 4. Ядро эукариотической клетки

Строение и функции ядра

Ядро – это наиболее крупная структура эукариотической клетки; обычно расположено в центральной части животной клетки или сдвинуто к периферии центральной вакуолю в растительной клетке. Впервые ядро было выявлено Р. Броуном в 1833 г. в клетках орхидей под световым микроскопом. Длительное время функция ядра оставалась невыясненной, и только в конце XIX в., когда было описано, как ведет себя ядро в процессах деления клетки, стала проясняться основная функция ядра. Постепенно появились свидетельства того, что в ядре сконцентрирована генетическая, наследственная информация клетки, которую переносят хромосомы в процессе деления. Экспериментальные доказательства о формообразующей роли ядра были получены только ближе к середине XX в.

Не все эукариотические клетки имеют ядро. Известно несколько видов клеток как растений, так и животных с конечным этапом дифференцировки, которые утрачивают ядро по мере приобретения узкой специализации. Такие клет-

ки не могут делиться. Примером безъядерных клеток могут служить клетки хрусталика глаза и эритроциты млекопитающих. И те, и другие являются носителями преимущественно одного типа белка. В эритроцитах накапливается гемоглобин, обеспечивающий газообмен, а в клетках хрусталика – кристаллин, благодаря чему сохраняется его прозрачность. У цветковых растений безъядерными клетками являются проводящие элементы флоэмы – ситовидные трубки. Они состоят из тяжёлых удлинённых клеток, соединённых друг с другом. Каждая клетка имеет перфорации на концах в клеточной оболочке. Через перфорации проходят тяжёлые цитоплазмы из одной клетки в другую, за счёт чего образуется единая система проведения веществ. Ядро утрачивается в процессе созревания ситовидных трубок.

Конец ознакомительного фрагмента.

Текст предоставлен ООО «ЛитРес».

Прочитайте эту книгу целиком, [купив полную легальную версию](#) на ЛитРес.

Безопасно оплатить книгу можно банковской картой Visa, MasterCard, Maestro, со счета мобильного телефона, с платежного терминала, в салоне МТС или Связной, через PayPal, WebMoney, Яндекс.Деньги, QIWI Кошелек, бонусными картами или другим удобным Вам способом.