

Министерство высшего и среднего специального образования Узбекистана
Андижанский государственный университет имени З. М. Бабура

И. Бадалходжаев

ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ ПО ЦИТОЛОГИИ

(учебное пособие для студентов университетов по биологическим
специальностям бакалавриата-5140100)

**АНДИЖАН
2020**

Бадалходжаев И. Учебное пособие «Практические занятия по цитологии» предназначено для студентов биологических специальностей(5140100) бакалавриата университетов. Дано описание постоянных и временных препаратов также микрофотографий, используемых на практических занятиях. По каждой теме даны задания для самостоятельного выполнения, которые способствуют более глубокому усвоению лекционного материала.

Рецензент: зав. кафедрой «Физиологии человека и безопасности жизненных деятельности», доктор биологических наук **Зайнабиддинов Анваржон Эркинжонович**

Печатается по решению методической комиссии факультета Естественных наук, протокол №5 от 04.05.2020 г.

ПРЕДИСЛОВИЕ

Основная цель руководства - показать морфофизиологические и химико-физиологические особенности клеточных структур. Выполнять эту задачу следует на гистологических препаратах и электронных микрофотографиях - материале, наиболее доступном в практике педагогических вузов. Сравнительное изучение клеточных структур в клетках разных тканей одного и того же животного показывает особенности их функционирования. В связи с этим в руководстве приведены препараты и электронные микрофотографии, даны их описания.

В руководстве приведены основные принципы современных методов исследования клетки и характер информации, получаемой с их помощью, судить о которой предлагается по рентгенограммам, радиоавтографам, электронным микрофотографиям и другим регистрационным материалам.

Перед каждой из тем приведены краткие сведения по той или другой изучаемой структуре и процессам. Они касаются морфологии, функции клеточных компонентов и не заменяют материал лекций учебника.

Руководство предполагает изучение препаратов под световым микроскопом с иммерсионным объективом при максимальном увеличении.

Изучаемую структуру необходимо затем рассмотреть на субмикроскопическом уровне, т. е. на электронно-микроскопических фотографиях. После этого следует зарисовать структуры, видимые под световым микроскопом и суметь сделать схематические перерисовки с определенного участка электронной микрофотографии.

В пособие введен раздел «Методики приготовления препаратов, изучаемых в данном руководстве». Он может быть использован преподавателями, лаборантами, а также студентами в кружковой работе.

ЧАСТЬ I

ВВЕДЕНИЕ

ИЗУЧЕНИЕ СТРОЕНИЯ КЛЕТКИ.

Глава 1. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КЛЕТКИ.

I. ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

А. Световая микроскопия

Объекты исследования - препараты, которые можно рассматривать в проходящем свете. Они должны быть достаточно прозрачны, тонки и контрастны. Биологические объекты не всегда обладают всеми этими качествами. Для изучения их в биологическом микроскопе (рис.1А, Б) необходимо предварительно приготовить соответствующие препараты путем фиксации, обезвоживания, изготовления тонких срезов, окрашивания. Объекты, изучаемые в биологическом микроскопе, мертвы, а реактивы, в которых обрабатывается препарат, могут вызывать деформацию молекулярных комплексов, коагуляцию белков плазмы.

Поэтому структуры препарата не всегда соответствуют истинным структурам живой клетки.

Микроскоп - это прибор, увеличивающий изображение предмета в несколько сотен и даже тысячи раз. Главная часть светового микроскопа - увеличительные стекла или линзы, вставленные в тубус. Тубус - это трубка, по которой свет идет от объектива к окуляру. В верхнем конце тубуса находится окуляр, состоящий из оправы и двух увеличительных стекол - линз. Окуляр создает реальное изображение, увеличивает, но не искажает изображение, получаемое в линзах объектива; в окуляр может быть вставлена измерительная сетка, если необходимо измерить размеры объекта. На нижнем конце тубуса помещается объектив, состоящий из оправы и нескольких линз, он, так же, как и окуляр, увеличивает изображение. Тубус прикреплен к штативу. Для фокусировки изображения тубус поднимается и опускается с помощью винтов. На штативе имеется два винта: макро- и микровинт. Макровинт используется для грубой, а микровинт - точной настройки изображения. Микровинт следует поворачивать не более, чем на оборот в одну или другую сторону. К штативу прикреплен также предметный столик, в центре которого находится отверстие, и под ним последовательно располагаются ирисовая диафрагма, конденсор и зеркало либо осветитель. Конденсор фокусирует лучи от осветителя на объекте исследования. Ирисовая диафрагма позволяет регулировать величину светового потока к объекту. При уменьшении отверстия ирисовой диафрагмы интенсивность светового потока возрастает, при увеличении, соответственно, убывает. Зеркало имеет две стороны - плоскую и вогнутую. Их используют соответственно для рассмотрения объекта при нормальном освещении и рассеянном свете. Около отверстия на предметном столике имеются зажимы для фиксации препарата в определенном положении. В микроскопии важное внимание уделяется освещению.



Рис.1, А. Строение микроскопа.

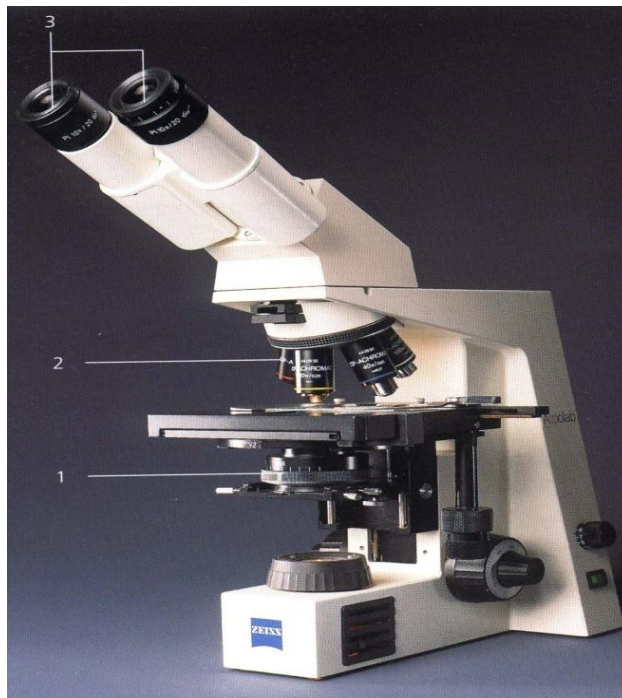


Рис.1,Б. Современный световой микроскоп (Karl Zeiss).
1-конденсор ; 2-объектив; 3-окуляры.

Расчеты показывают, что дальнейшее увеличение разрешения за счет увеличения численной апертуры объектива и значения окуляра невозможно. Оно может идти лишь по линии уменьшения длины волны света. Такими лучами являются ультрафиолетовые, рентгеновские и электронные пучки, применяемые соответственно в ультрафиолетовом, рентгеновском и электронном микроскопах.

Задание. Сравнить строение любого готового препарата и живой клетки (амебы или инфузории), видимое в биологическом микроскопе.

Характер информации о живой клетке в биологическом микроскопе далеко не полный: отдельные структуры клетки не видны, ядрышко едва просвечивает. Изучение фиксированного и окрашенного препарата в биологическом микроскопе обнаруживает структурность ядра и цитоплазмы, что не наблюдается при просмотривании живых объектов.

Б. Темнопольная микроскопия

Метод темнопольной микроскопии основан на принципе рассеивания света на границе между фазами с разными показателями преломления. Достигается это в темнопольном микроскопе или в обычном биологическом микроскопе специальным темнопольным конденсором. При наблюдении в темном поле прямые лучи светового пучка не попадают на объект, используются же краевые лучи пучка. Последние

преломляются на структурах объекта и уклоняются от своего первоначального положения. Они могут попасть в объектив, если между фронтальной линзой конденсора и нижней поверхностью предметного стекла будет нанесена капля воды или масла, играющие роль собирающей линзы. Наблюдатель видит объект в рассеянном свете. На совершенно темном поле видны интенсивно светящиеся структуры, они тем ярче, чем больше светосила красных лучей.

В темном поле можно изучать живые объекты. Разная плотность отдельных структур таких объектов выступает как более или менее интенсивно освещенные пятна. Разрешающая способность такого микроскопа большая.

Задание. Посмотреть в темнопольном микроскопе живые объекты: инфузории, амёбы или ткани, выращенные на культуре, и сравнить с картиной, видимой в световом микроскопе.

Ядро, органоиды, включения, оболочки выглядят как ярко светящиеся пятна, отчетливо выделяющиеся на фоне клетки. Выявляется значительно больше деталей, чем при изучении этих же объектов в обычном биологическом микроскопе.

При рассмотрении парамеции (*Paramecium aurelia*) каплю жидкости из раствора, в котором они находятся, помещают на предметное стекло и покрывают покровным стеклом. Виден макронуклеус как овальное темное пятно. Какие-либо детали, кроме более плотного ядрышка, в нем не выделяются. Ядро кажется оптически пустым. Светящиеся мелкие зерна, просвечивающиеся на фоне ядра, относятся к цитоплазме и лежат над ядром или под ним. В цитоплазме различаются ярко светящиеся пищеварительные вакуоли, разные включения, пульсирующие вакуоли в виде темных круглых образований.

Свечение структур дает представление об их плотности. Плотные структуры, например, включения, ядерная оболочка, светятся ярче, чем ядро, консистенция которого более жидкая.

В. Фазово-контрастная микроскопия

В основу метода положено отличие в показателях преломления отдельных участков прозрачного объекта и окружающей среды, хотя биологические объекты одноклеточные и тканевые, взятые в тонких срезах, очень прозрачны, тем не менее разница в показателях преломления есть. Вследствие этого изменяется скорость распространения света в участках с большим и меньшим преломлением. В первых из них луч запаздывает, и это явление называют изменением по фазе или фазовым рельефом. Однако глаз не может воспринимать разность в скорости распространения света, он может воспринять только изменение интенсивности света, что определяется амплитудой светового

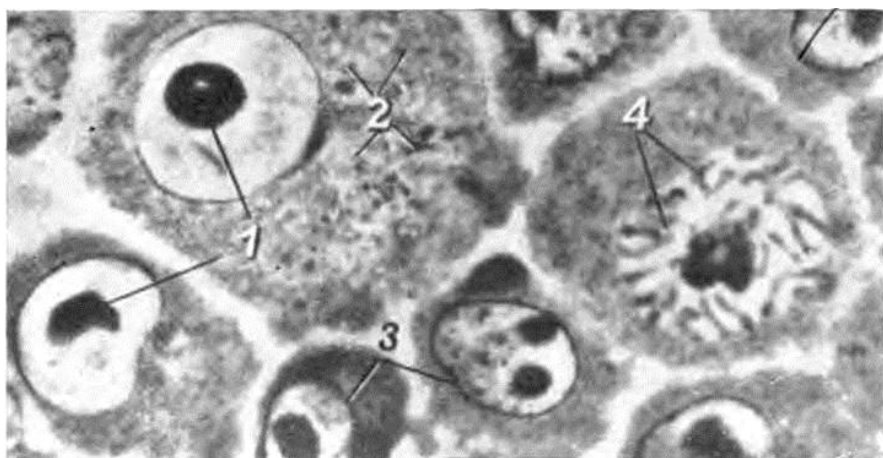


Рис.2. Микрофотография живых клеток из асцитной опухоли (фазово-контрастный микроскоп). 1 - ядрышки; 2 - митохондрии; 3 - ядерная оболочка; 4- хромосомы.

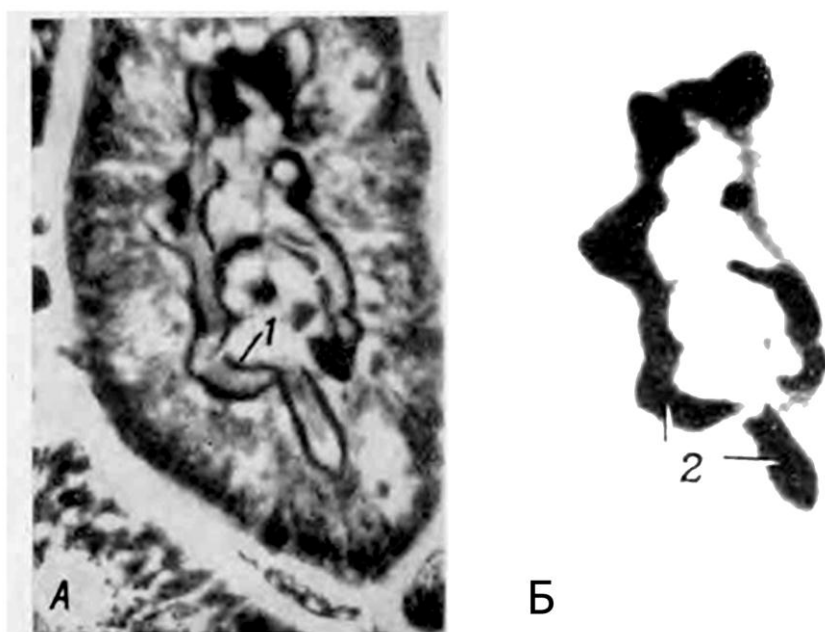


Рис.3. Проксимальные извитые канальцы почки мыши после применения метода замещения в замороженном состоянии. А - наблюдения в фазово-контрастном микроскопе; Б - наблюдения в проходящем свете.
1 - щеточная каемка; 2 - реакция на щелочную фосфатазу (выявляется в области щеточной каемки).

колебания- амплитудным рельефом. Преобразование фазовых изменений в амплитудные достигается в фазово-контрастном микроскопе с кольцевой диафрагмой в конденсоре вместо обычной ирисовой. Она не пропускает центральные лучи, и на объект попадают только красные лучи.

В задней фокальной плоскости объектива располагается кольцевая фазовая пластинка. Это прозрачный диск с кольцевой выемкой, размером соответствующей размеру изображения конденсора. Дно канавки покрыто особым материалом. Через кольцевую выемку пропускаются прямо прошедшие лучи, не отклоненные объектом, дифрагированные же проходят через остальную часть пластинки. Так как фазовое кольцо на 0,5 мкм тоньше всей пластинки, то фаза прямо прошедших лучей опережает фазу дифрагированных лучей на длины волны. В результате незначительные фазовые изменения объекта усиливаются и превращаются в амплитудные.

Частицы с показателем преломления, большим показателя преломления среды, дают темные изображения на светлом фоне, с показателем, меньшим показателя среды, - изображения более светлые, чем окружающий фон.

Фазово-контрастная микроскопия позволяет выявить множество деталей и особенностей живых клеток и срезов тканей. Большое значение имеет этот метод для изучения тканей, культивируемых *in vitro*.

Задание 1. Рассмотреть в фазово-контрастном микроскопе любые живые объекты: амебы, инфузории, ткани, выращенные на культуре, - или понаблюдать за развитием икринки амфибий - лягушки, аксолотля.

Отчетливо видны компоненты клетки - ядро, органоиды, включения. Они хорошо контурируются. В развивающейся икринке можно видеть нарастание бластомеров, появление закладок будущих органов, формирование некоторых органов.

Задание 2. Рассмотреть микрофотографии 2 и 3 живых клеток асцитной опухоли и проксимальных извитых канальцев почки мыши, снятых под фазово-контрастным микроскопом.

Видно множество деталей клеток: ядрышки, митохондрии, ядерная оболочка, хромосомы (рис.2). На микрофотографии проксимальных извитых канальцев почки показано различие картин, на наблюдаемых в фазовом контрасте и проходящем свете(рис.3). В первом случае (А) хорошо выявляются клетки, образующие каналец, видны их структуры- митохондрии, оболочка, щеточная каёмка. Во втором случае (Б) вырисовывается лишь область клетки у щеточной каёмки с выявленной здесь щелочной фосфатазой. Остальные участки клетки не видны.

Г. Интерференционная микроскопия

Метод основан на том, что через объект проходит один из двух поляризованных лучей света, второй проходит мимо. Создается

запаздывание фазы первого луча. Наложение (интерференция) этих лучей приводит к получению изображения предмета, видимого как темное пятно на фоне светлого пятна (если расстояние между двумя волнами двух поляризованных лучей равно целому числу длин волн) или как светлое пятно на фоне темного поля (если расстояние между двумя волнами равно нечетному числу полуволн). Препарат часто выглядит окрашенным вследствие резко выраженной разности оптических путей.

Интерференционная микроскопия позволяет наблюдать живые объекты, а также получать количественные данные о сухом весе, клеточных структур, концентрации сухого вещества и воды в клетке, толщине структур.

II. ЦИТОФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

A. Метод поглощения рентгеновских лучей.

Метод основан на том, что разные вещества в определенной длине волны по-разному поглощают рентгеновские лучи. Спектрорентгенограмма известна для многих веществ. Пропуская рентгеновские лучи через препарат ткани, можно по спектру поглощения определить ее химический состав. Этим же методом можно определить содержание сухого вещества в клетке по микрофотографиям. Чем больше концентрация вещества в фотографируемой структуре, тем меньше засвечивается эмульсия. Концентрация поглощающего вещества определяется по почернению изображения структуры, содержащей это вещество.

Задание. Рассмотреть рентгенограмму, представленную на микрофотографии 4.

Светлые изображения на микрофотографии соответствуют сухому веществу клетки. Это участки клетки, поглощающие рентгеновские лучи. Темные места на фотографии идентичны участкам клетки, не поглощающим рентгеновские лучи. Видно, что на долю ядра приходится 15-20% сухого вещества.

Б. Метод радиоавтографии

Метод основан на том, что радиоактивные изотопы, будучи введенными в организм, вступают в общий клеточный обмен и включаются в молекулы соответствующих веществ. Места их локализации определяют по излучению, даваемому изотопами и обнаруживаемому по засвечиванию фотопластинки при наложении ее на препарат.

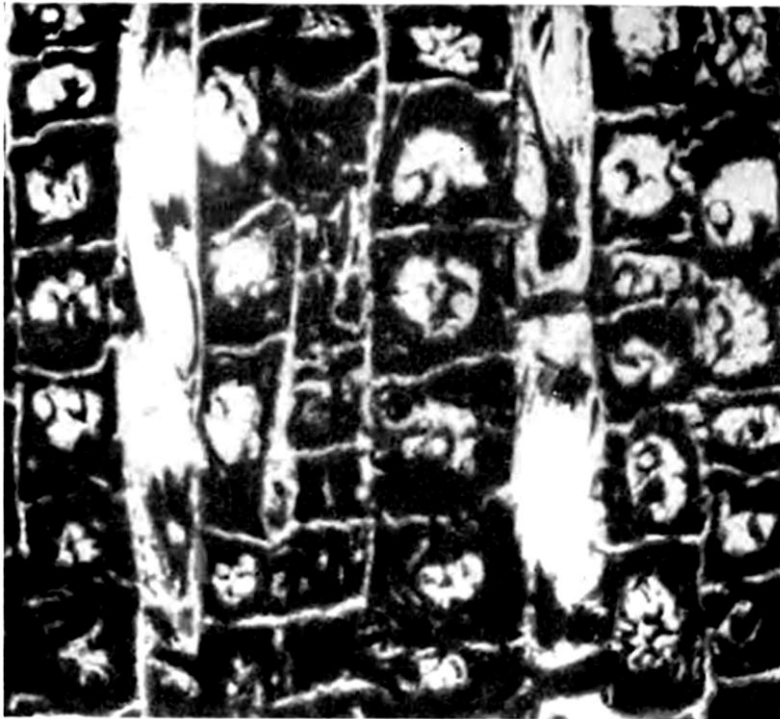
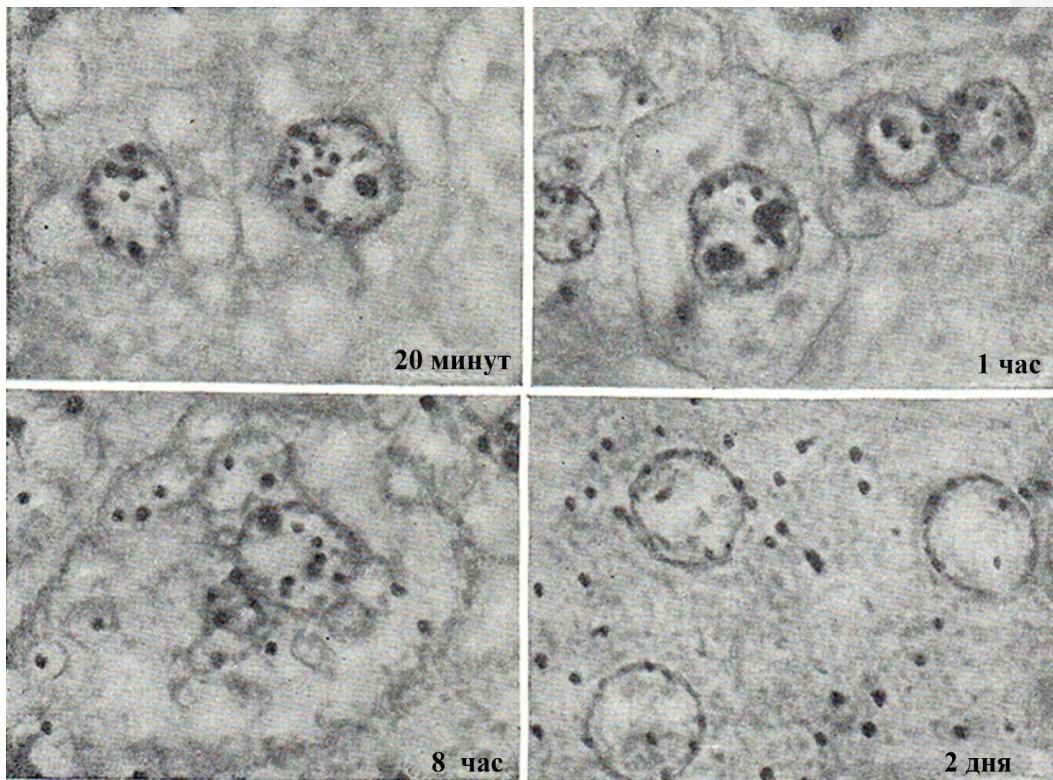


Рис.4. Микрорентгенограмма, показывающая распределение сухого вещества в делящейся клетке *Allium* сера. Белые участки на фотографии соответствуют участкам препарата, поглощающим рентгеновские лучи.

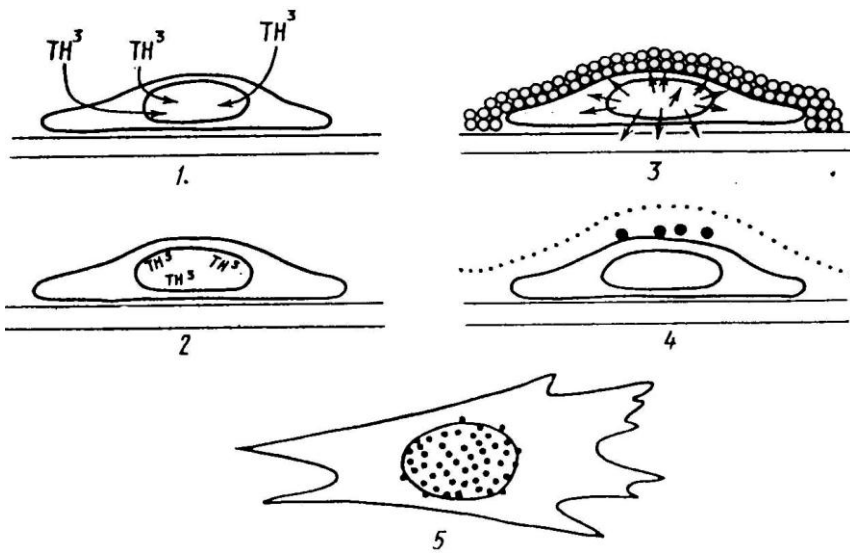
Препарат изготавливается спустя некоторое время после введения изотопа с учетом времени прохождения определенных стадий метаболизма. Распределение веществ выявляется исключительно точно. Этот метод открывает большие перспективы для определения локализации веществ не только в клетке, но и в клеточных мембранах.

Задание. Рассмотреть радиоавтографы, представленные на микрофотографиях 5 А, Б.

На фото 5 тимидин, меченный по водороду (^3H -тимидин), включался в молекулу ДНК хромосом. На автографе хорошо видны места локализации этих молекул по темным точкам - местам засвечивания фотопластинки. На фото 5 сульфат ^{35}S включался в белки фибробластов. Темные точки указывают на распределение этих белков в клетке.



А



Б

Рис.5.Метод радиоавтографии.

А-последовательность образования меченного РНК в клетках печени (сначала видно в ядре, затем и в цитоплазме).

Б -схема получения автордиографа. 1-введение меченного тимидина; 2-включение его в ДНК ядра; 3-клетка покрыта фотоэмульсией; 4-гранулы серебра над местами расположения изотопа в клетке; 5-то же, вид сверху.

III. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ

A. Электронная микроскопия

Вместо светового пучка используется пучок электронов, получаемый от катодной лампы в электронном микроскопе. Изображение дают электроны, прошедшие через объект и не отклоненные им. Чем большей плотностью и толщиной обладает объект, тем контрастнее будет изображение. Под электронным микроскопом просматриваются неживые объекты - препараты(Рис.6). Живые объекты изучать пока не удастся, так как объекты помещаются в вакуум, губельный для живых организмов. В вакууме электроны, не рассеиваясь, попадают на объект.

Фокусировка электронов в плоскости объекта, отклонение прошедших через объект электронов - увеличение изображения, и дальнейшее увеличение изображения производится магнитными полу катушками. Объекты, изучаемые под электронным микроскопом, должны иметь очень малую толщину, не больше 400-500 Å, иначе они оказываются непроницаемыми для электронов. Для этих целей применяются ультрамикротомы (прибор для получения сверхтонких срезов), принцип работы которых построен на тепловом расширении стержня, подающего нож к объекту или, наоборот, объект к ножу. Тепловое расширение стержня происходит за счет его электрического нагревания. Степень расширения регулируется силой тока, подаваемого на систему через реостат.

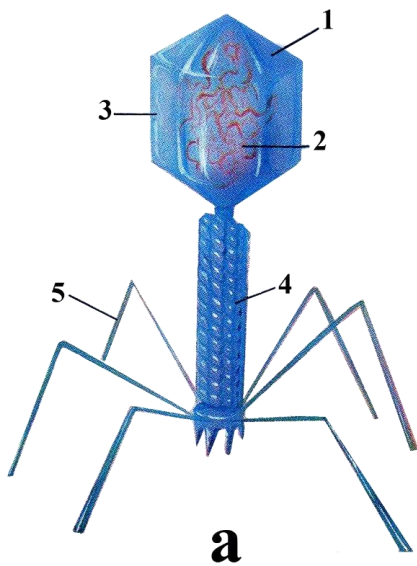
Биологические объекты, особенно вирусы, фаги, нуклеиновые кислоты, тонкие мембраны, обладают слабой способностью рассеивать электроны. Контрастность их увеличивают путем напыления тяжелых металлов: золота, платины, хрома - на объект. Метод состоит в том, что объект на подложке (пленке, мало задерживающей электроны) в вакууме располагают под углом к испарителю металлов, пары последних, двигаясь прямолинейно, оседают на выступах частиц объекта.

Усиление контрастности достигается и при помощи осмиевой или вольфрамовой кислоты и некоторыми солями тяжелых металлов, которые связываются отдельными участками препарата. Эти вещества вводятся в препарат во время фиксации и заливки.

Метод позволяет изучить структуру на субмикроскопическом уровне - на уровне макромолекул (рис.7).



Рис.6. Современный электронный микроскоп.



7-рис.Схематическое строение вируса (а) и фото в бактерии *Escherichia coli* (b).
1-головка; 2- ДНК; 3-протеиновая оболочка; 4-хвостовая часть; 5-отростки хвоста.

Задание. Просмотреть электронные микрофотографии 8, 9, 10.

Обратить внимание, как выглядят объекты под электронным микроскопом.

Изображения, полученные на них-темные и светлые пятна большей или меньшей плотности. Они соответствуют более плотным и менее плотным участкам препарата. Срезы очень тонкие, и отдельные ультраструктуры перерезаются. На фотограмме видны лишь профили структур.

На фото 8 дана шванновская клетка. Видны разрезы через профили канальцев, пузырьков, цистерн эндоплазматической сети. Очень плотны гранулы рибонуклеотидов на наружной поверхности мембран эндоплазматической сети. Внутренняя структура цистерн сети неоднородна по плотности.

Срезы тоньше, чем ячейки сети и некоторые ее компоненты, поэтому видны только разрезы и профили канальцев, пузырьков, цистерн. Сетчатую структуру и непрерывность вакуольярной системы удастся проследить лишь на серийных срезах. Отчетливо видна внутренняя фаза эндоплазматической сети, электронная плотность которой отличается от электронной плотности матрицы гиалоплазмы.

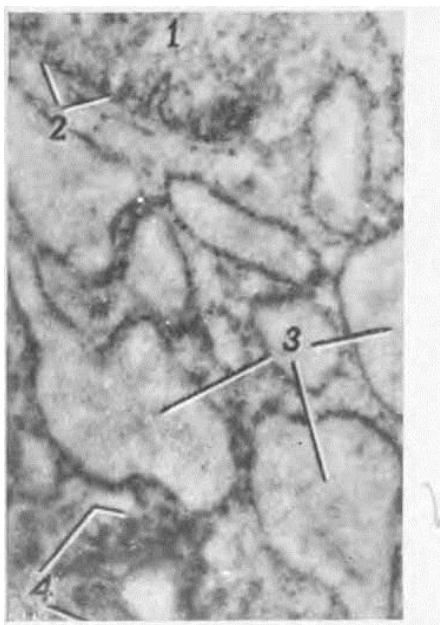


Рис.8

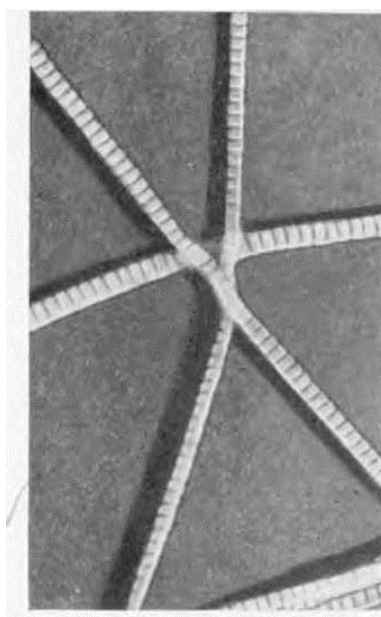


Рис.9

Рис.8. Электронная микрофотография шванновской клетки (X57 000). 1 - ядро; 2 - ядерная оболочка; 3 - эндоплазматическая сеть; 4 - комплекс Гольджи.

Рис.9. Электронная микрофотография коллагеновых волокон кожи человека (X28 000). Видна их типичная исчерченность.

На фото 9 показано коллагеновое волокно кожи человека. Видна поперечная исчерченность волокна.

На фото 10 - ДНК из селезенки крысы. Препарат получен с помощью контрастирования углеродом и сплавами платины и палладия. Производилось напыление. Видны тени, отбрасываемые молекулой ДНК. Одиночные молекулы ДНК расходятся от сгустка молекул, образовавшегося в результате высыхания на подложке микрокапли раствора высокополимерной ДНК (вверху слева).

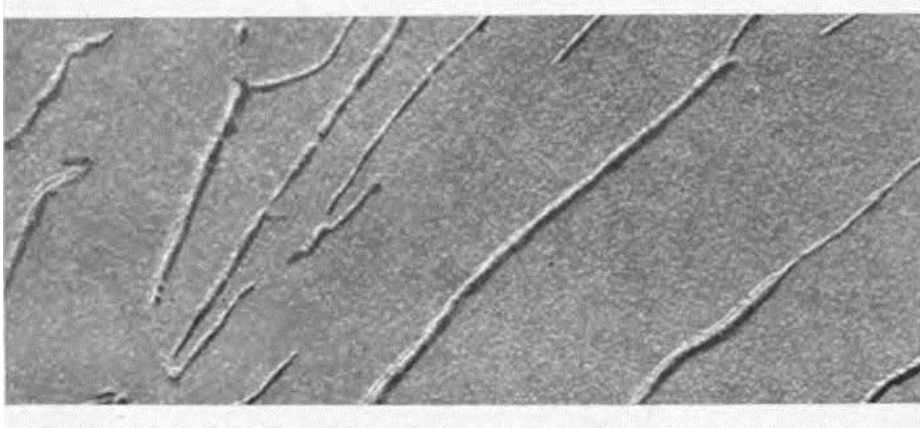


Рис.10. ДНК из селезенки крысы (электронная микрофотография). Углеродная реплика с предварительным оттенением сплавом платины с палладием.

IV. МИКРОХИРУРГИЧЕСКИЙ МЕТОД

Впервые цитологи проводили микрооперации на животных организмах. Микрооперации проводили на специальных аппаратах микроманипуляторе. Первые микроманипуляторы сконструировали в 1901 году Схоутен (1901) и Барбер(1904) году. В дальнейшем этот аппарат был усовершенствован (рис.11). По методу предложенным Командоном и Фонбрюном была осуществлена пересадка ядер у различных видов амёб. (Рис.12).



Рис.11. Современный микроманипулятор.

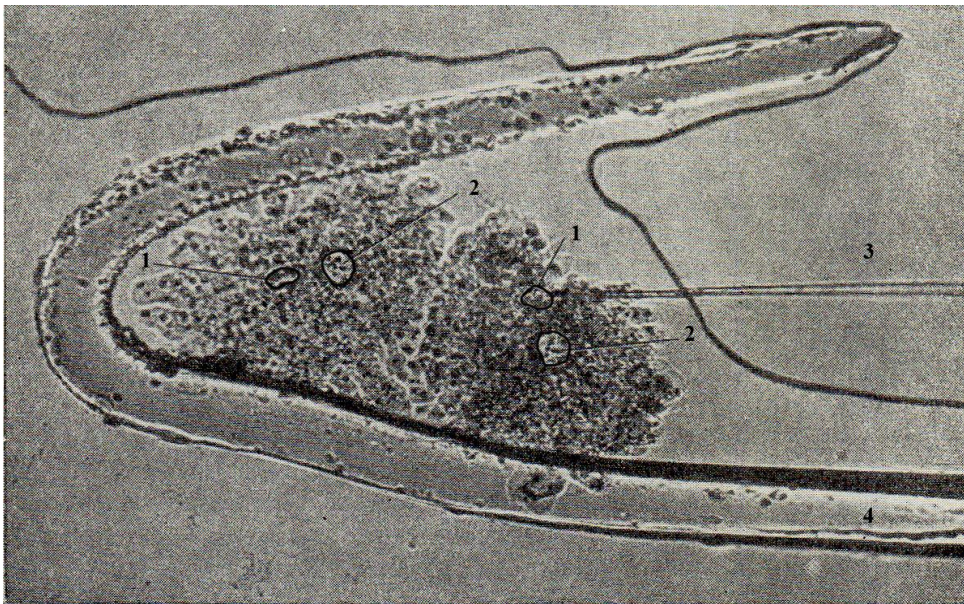


Рис.12. Пересадка ядер у амёб. 1-ядра; 2-сократительные вакуоли; 3- микроигелька; 4 –стеклянный крючок.

V. МЕТОД УЛЬТРАЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ.

Этот метод также называется фракционированием клеточных гомогенатов для этого используется Ультрацентрифуга, которая была сконструирована Сведбергом. (рис.13).

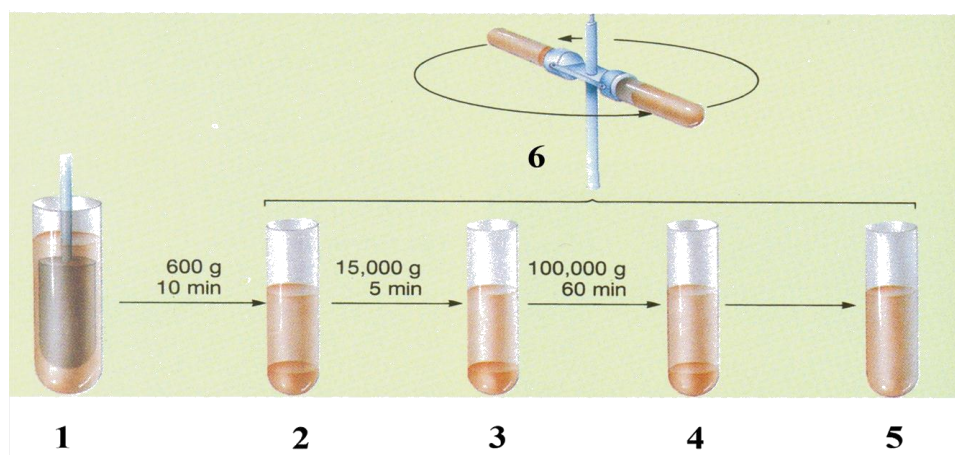


Рис.13. Метод центрифугирования.

1-гомогенизатор; 2-центрифуга; 3-ядра; 4- митохондрии и лизосомы в осадке; 5-рибосомы и эндоплазматический ретикулум; 6-жидкая часть цитоплазмы(цитозол).

Глава 2. ОБЩИЙ ПЛАН СТРОЕНИЯ КЛЕТОК ПРОКАРИОТ И ЭУКАРИОТ

Элементарной единицей структуры и функции всех живых организмов является клетка. По своему химическому составу клетки всех живых существ очень сходны, однако изучение тонкого строения различных типов клеток позволило выявить заметные различия между бактериями с одной стороны, животными и растениями - с другой. Различия между теми и другими настолько глубоки, что эти две группы организмов противопоставляются друг другу как **прокариоты** (рис.14) и **эукариоты** (рис. 16, 17) (табл. 1). **Прокариоты** (доядерные) – бактерии и сине-зеленые водоросли. Появились прокариоты примерно 4 или 3,5 млрд. лет назад в результате спонтанной агрегации органических молекул. Это наиболее простые по строению организмы. Форма бактерий сферическая или удлинённая. Размер в несколько микрометров. У всех есть жесткая защитная оболочка (клеточная стенка).

Основной компонент – гликопептид **муреин**. Под клеточной стенкой находится **плазматическая мембрана, плазмалемма**, ограничивающая единый цитоплазматический компартмент, содержащий ДНК, РНК, белки и малые молекулы. ДНК прокариот располагается в центральной зоне цитоплазмы в виде плотно уложенных тонких кольцевидных молекул, содержащих до $5 \cdot 10^6$ азотистых оснований. Длина молекулы – несколько мкм. В процессе транскрипции реплицируется как единое целое, поэтому является одним репликоном. Иногда называют «**бактериальной хромосомой**» - нуклеоид.

Прокариотические клетки не имеют в цитоплазме высокоспециализированных органоидов. В цитоплазме у них находятся в виде мельчайших структур лизосомы и рибосомы прокариотического типа **70S**. **Состоит из большой и малой субъединиц, 50S и 30S соответственно.**

Для протекания энергетических и биохимических процессов плазмалемма бактерий образует внутренние **впячивания**, которые называются **мезосомы**. На этих впячиваниях фиксируются ферменты.

Основные способы получения энергии – гликолиз, дыхание, фотосинтез.

В природе бактерии занимают все экологические ниши. Среди них различают две группы – эубактерии, которые населяют почву и воду, и архибактерии, которые живут в экстремальных условиях среды. Архибактерии: анаэробные условия, горячие кислые среды, в очень соленых условиях, анаэробы, вырабатывающие металл. Эубактерии: есть грамположительные и грамотрицательные и др.

Эукариоты (ядерные). Они крупнее, сложнее организованы и эволюционно более поздние. К ним относятся растения, животные и грибы. Самый главный отличительный признак – наличие оформленного ядра, отделенного от гиалоплазмы двойной мембраной. В гиалоплазме есть органоиды. Есть цитоскелет. Он организует цитоплазму, обеспечивает циклоз (движение цитоплазмы). Мембрана мембранных органоидов организована липопротеинами. Все мембраны закрытые. Внутренние мембраны ограничивают полости или участки клетки, закрывая их со всех сторон, ограничивая от цитоплазмы. Такое разделение цитоплазмы на отсеки называется **компарментализацией**.

Для чего это нужно. Это необходимо для изоляции различных химических реакций и продуктов. Также внутренние мембраны являются местом прикрепления ферментов.

Основные компартменты эукариотической клетки:

1) Ядро – место хранения и синтеза нуклеиновых кислот- 6% от объема клетки.

2) Цитозоль – окружающая его цитоплазма с цитоплазматическими органоидами- 45-55%.

3) ЭПР. Гранулярный и агранулярный. На гранулярном располагаются рибосомы, синтезирующие мембранные и экспортные белки- 10%.

4) Комплекс Гольджи. Осуществляется процесс сегрегации (обособления), накопления, созревания и выведения органических веществ- 6%.

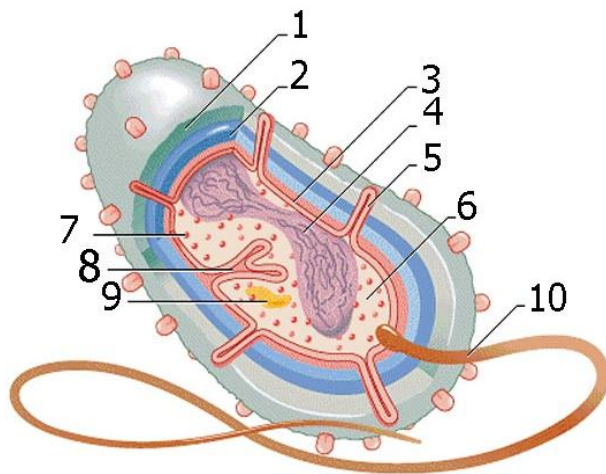
- 5) Митохондрии и пластиды, осуществляющие синтез АТФ- 22%.
 6) Лизосомы осуществляют расщепление веществ- 1%.
 7) Пероксисомы – обеспечивают проведение окислительных реакций с помощью ферментов (каталаза – 40%) -1%.

Таблица 1

Отличие прокариотической от эукариотической клетки

№	Структура	Эукариотическая клетка	Прокариотическая клетка
1	Ядро	Окружено двойной мембраной. Процессы транскрипции и синтеза белка отделены друг от друга по времени и пространственно	Имеется нуклеарная область, содержащая ДНК, (нуклеоид), мембраной не окружен. Транскрипция и синтез белка проходят почти одновременно.
2	Хромосомы	Линейные; представляют собой комплекс ДНК с щелочными белками – гистонами, - по структуре напоминающий нитку жемчуга; содержат преобладающую часть генома клетки.	Имеется одна кольцевая так называемая бактериальная хромосома; ДНК в ней не образует комплекса с гистонами; часть ДНК находится в виде замкнутых в кольцо самореплицирующихся элементов – плазмид
3	Отделенные мембранами органеллы	Имеются; компартментализация выражена сильно	Отсутствуют; компартментализация выражена слабо
4	Клеточная стенка	Отсутствует у животных, имеется у растений (содержит целлюлозу) и у грибов (содержит хитин).	Имеется (отличается по химическому составу от КС растений – содержит муреин, а не целлюлозу)
5	Рибосомы	Имеются; 80 S	Имеются; 70 S

6	Реснички и жгутики	Имеются у всех организмов, за исключением высших растений. Состоят из субъединиц белка тубулина, обладают сократительной активностью.	У некоторых бактерий имеются жгутики, но они отличаются по строению (белок флагеллин) и механизму движения от жгутиков эукариот, сократительной активностью не обладают.
7	Синтез энергии в клетке	У животных – митохондрии, у растений – митохондрии и хлоропласты.	Мезосомы – внутренние складки мембраны (аналог митохондрий). У фотосинтезирующих бактерий – еще и фотосинтезирующие мембраны



14-рис. Схема строения бактериальной клетки: 1-капсула; 2-клеточная оболочка; 3-клеточная мембрана; 4-нуклеоид (хромосома); 5-цитоплазматические выросты; 6-цитоплазма; 7-рибосома; 8-мезосома; 9-включения; 10-жгутик.

I. ОТЛИЧИЯ В СТРОЕНИИ РАСТИТЕЛЬНОЙ И ЖИВОТНОЙ КЛЕТКИ

Клетки различных растений и животных и разных органов одного и того же растения или животного поразительно разнообразны в отношении своих

размеров, формы, окраски и внутреннего строения, но все они имеют ряд общих особенностей. Существуют клетки с изменчивой формой (например, амебы и лейкоциты) и клетки с постоянной формой (например, сперматозоиды, инфузории, эритроциты, нервные клетки). Для клеток, принадлежащих ко второй категории, характерна более или менее устойчивая и специфическая для каждого данного типа форма. Рис.15: схема I, II.

Схема I

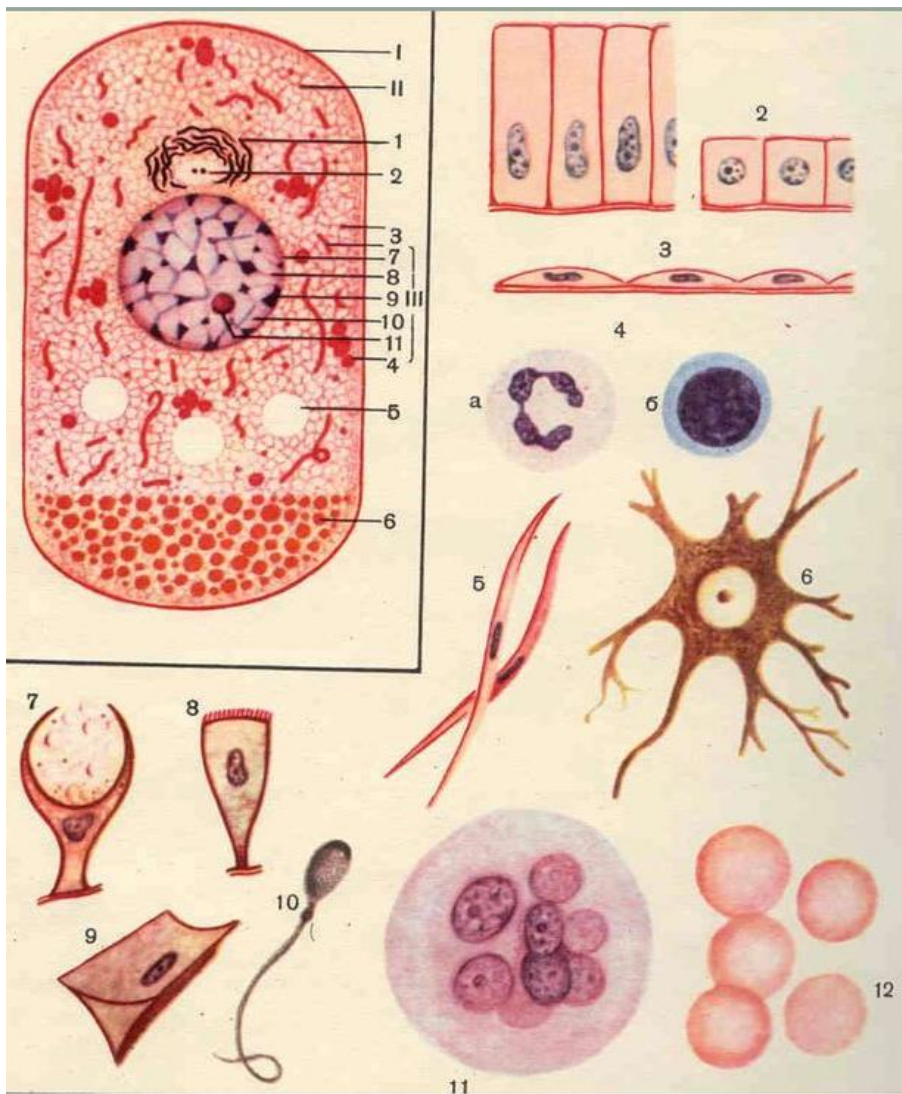


Схема II

Рис.15. Животные клетки. 1. Фиксированная клетка. Схема I.

I-клеточная оболочка, II-цитоплазма. Органеллы: 1-аппарат Гольджи; 2-центросома; 3-митохондрии; 4-протеиновые гранулы; 5-клеточная вакуоль; 6-

липоидные гранулы. III-ядро: 7-ядерная оболочка; 8-ахроматическая сеть; 9-хромоцентры; 10-ядерная жидкость; 11-ядрышко.

2. Форма фиксированных клеток. Схема II.

1-цилиндрические клетки канальца почки; 2-кубические клетки канальца почки; 3-плоские клетки мезотелия; 4-округлые (сферические) клетки: а- с сегментированным (дольчатым) ядром-нейтрофильный гранулоцит, б-с округлым(сферическим) ядром-лимфоцит; 5-веретенновидные клетки с палочковидным ядром-гладкие мышечные клетки; 6-отросчатая клетка-нервная клетка; 7-бокаловидная железистая клетка; 8-анизопразматическая реснитчатая эпителиальная клетка; 9-крылатая сухожильная клетка; 10-жгутиковая клетка-сперматозоид; 11-многоядерная клетка костного мозга-мегакариоцит; 12-безъядерная клетка-эритроцит.

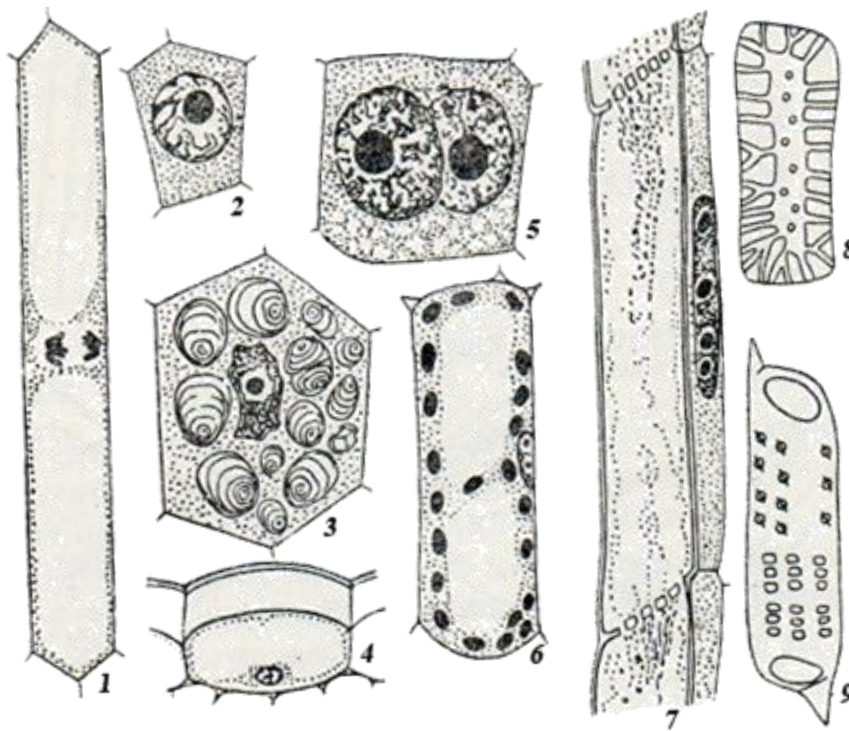
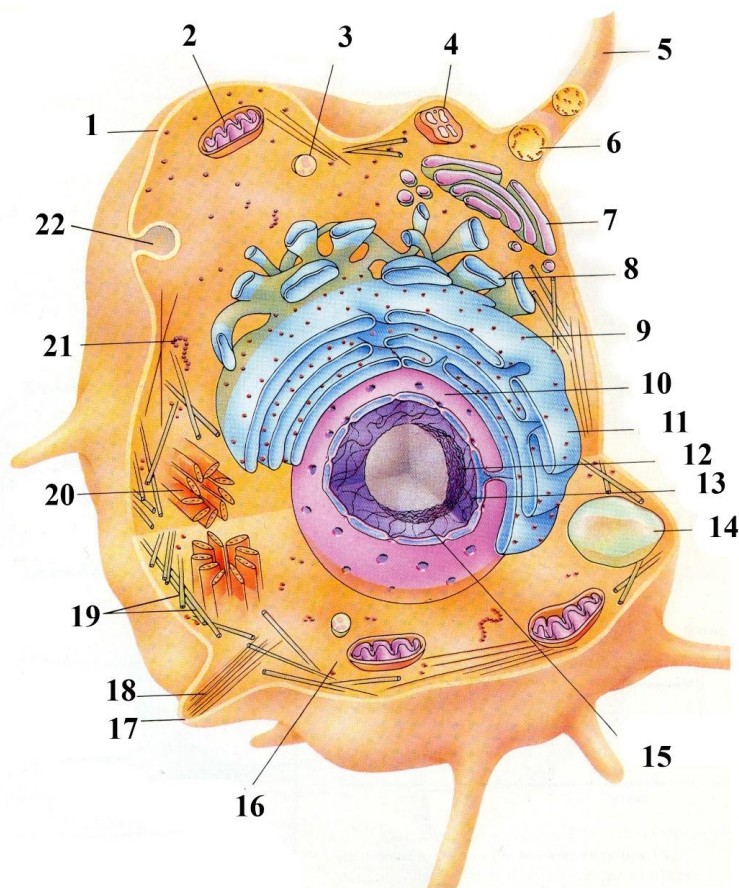


Рис. 16. Растительные клетки.

1,2-меристематические клетки; 3-клетки паренхимы с крахмальными зернами; 4-клетки эпидермиса; 5-двухядерная клетка; 6-клетка ассимиляционной ткани листа; 7-клетки ситовидной трубки, с клеткой спутник; 8-каменистая клетка; 9-клетка трубчатой ткани.

Форма клетки зависит от поверхностного натяжения и вязкости протопласта, от механического воздействия со стороны соседних клеток и от функциональной адаптации клетки (рис.16). Многие клетки, подчиняясь закону поверхностного натяжения, при помещении их в жидкую среду стремятся принять сферическую форму. Так обстоит дело с лейкоцитами, которые в циркулирующей крови имеют сферическую форму, но под влиянием соответствующих стимулов могут выпускать псевдоподии (амебoidное движение) и приобретать совершенно неправильную форму.



17-рис. Схема строения животной клетки.

1-мембрана; 2-митохондрия; 3-микротело; 4-лизосома; 5-ресничка; 6-базальное тело; 7-аппарат Гольджи; 8-гладкая эндоплазматическая сеть; 9-рибосома; 10-ядерная оболочка; 11-гранулярная эндоплазматическая сеть; 12-ядрышко; 13-ядро; 14-вакуола; 15-хроматин; 16-цитозол; 17-микроворсинка; 18-актиновый филамент; 19-микротрубочки; 20-центросома; 21-полисома; 22-пузырек.

Клетки многих растительных и животных тканей имеют форму многогранников, определяемую главным образом их взаимным давлением. В этих случаях первоначально сферическая форма изменяется при соприкосновении с другими клетками, подобно тому как это наблюдается в мыльной пене, где каждый пузырек сдавливается соседними пузырьками. В большой массе клеток отдельные клетки ведут себя, по-видимому, как многогранные твердые образования с минимальной поверхностью, прилегающие друг к другу очень плотно, без промежуточных пространств.

Объем клетки изменчив и колеблется в широких пределах. У растений и животных встречаются клетки, которые видны невооруженным глазом и обладают огромным объемом. Так, у некоторых птиц яйцо, представляющее собой единую клетку, имеет в диаметре несколько сантиметров. Это, однако, исключение из общего правила, так как огромное большинство клеток обладает микроскопическим размером-диаметр их составляет всего лишь несколько тысячных миллиметра (микроны). Как правило, объем клетки в пределах данной ткани отличается относительным постоянством и не зависит от общих размеров тела, характерных для данного вида. Так, клетки почек или печени быка, лошади или мыши обладают почти одинаковым размером, а различия в общей массе органа обусловлены числом, а не объемом клеток.

Современные данные о структуре и различных компонентах растительной клетки(рис.18) говорят о том, что общий план организации животной клетки(рис.17), включая простейших, очень сходен. Это сходство распространяется не только на клеточное ядро, хромосомы и процессы митоза, которые часто иллюстрируются на примере растительного материала, также и на строение и субмикроскопическую организацию цитоплазмы и органоиды.

Другим характерным признаком клеточного строения растений служит наличие твердых стенок, которые окружают растительную клетку и защищают пограничный слой цитоплазмы, или плазмалемму.

Сильное развитие вакуолярной системы во время дифференцировки растительной клетки представляет собой другую ее отличительную особенность, связанную с большим содержанием воды в цитоплазме. Этот процесс может привести к появлению крупных заполненных жидкостью вакуолей, которые сливаются друг с другом, в результате чего цитоплазма образует тонкий прилегающий к целлюлозной оболочке слой, где можно наблюдать движение цитоплазмы-так называемый циклоз (рис.18).

Как и в клетках беспозвоночных животных, у растений комплекс Гольджи имеет вид дискретных частиц, рассеянных по всей цитоплазме,-это так называемые **диктиосомы**, или **гольджиосомы**. Они имеют пластинчатую дугообразную форму и равномерно рассеяны по всей цитоплазме.

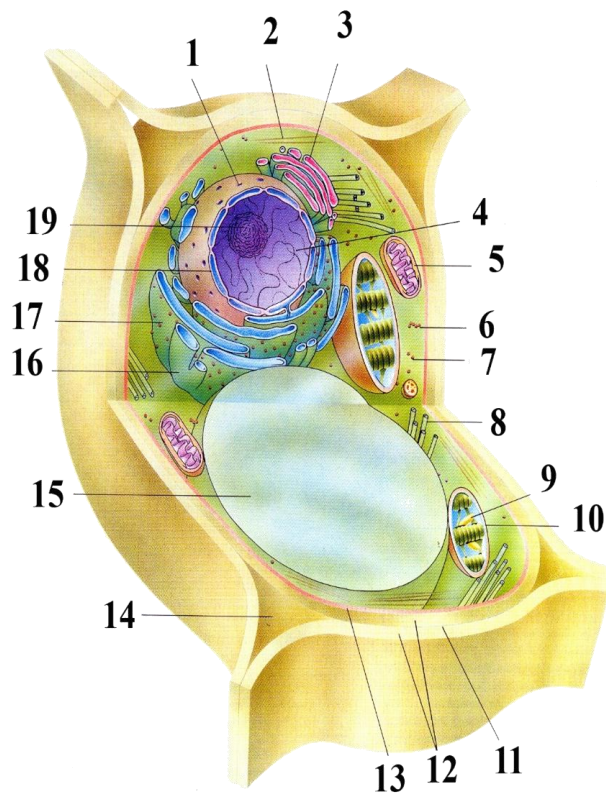


Рис-18. Схема строения растительной клетки. 1-ядерная пора; 2-скелетные микротрубочки; 3-аппарат Гольджи; 4-ядро; 5-митохондрия; 6-полирибосома; 7-рибосома; 8-микротрубочки; 9-хлоропласт; 10-оболочка хлоропласта; 11-срединная пластинка; 12-целлюлозная оболочка; 13-плазматическая мембрана; 14-межклеточное пространство; 15-вакуола; 16-гладкая эндоплазматическая сеть; 17-гранулярная эндоплазматическая сеть; 18-ядерная мембрана; 19-ядрышко.

В строении клеток растений и животных имеются существенные различия (табл. 2).

Таблица 2

Отличия в строении растительной и животной клетки

№	Структура	Растительная клетка	Животная клетка
1	Способ питания	Автотрофный	Гетеротрофный
2	Пластиды (хлоропласты, хромопласты, лейкопласты)	Имеются	Отсутствуют
3	Синтез АТФ	В митохондриях и хлоропластах	В митохондриях
4	Расщепление АТФ	В хлоропластах и тех частях клетки, где необходима энергия	В тех частях клетки, где необходима энергия
5	Клеточная стенка	Имеется, содержит целлюлозу	Отсутствует
6	Центриоли	Имеются только у низших растений	Имеются у всех организмов
7	Вакуоль	Имеется, заполнена клеточным соком	У низших животных имеются только небольшие вакуоли, выполняющие пищеварительную функцию
8	Реснички и жгутики	Отсутствуют у высших растений	Имеются
9	Запасные углеводы	В виде крахмала	В виде гликогена

Задание. Изучить таблицу 2, посмотреть рисунки 15,16,17 и 18. Рисовать рисунки 17,18 и ставить соответствующие обозначения. Сравнить растительные и животные клетки, обозначить их структурные части на рисунках.

II. ИЗУЧЕНИЯ ЖИВЫХ КЛЕТОК.

А. Клетки кожицы листа валлиснерии (*Vallisneria spiralis* L.)

Для приготовления препарата на любой из сторон линейного листа валлиснерии скальпелем или препаровальной иглой надрезают кожицу, кусочек которой сдирают с листовой пластинки, кладут в каплю воды на предметное стекло, осторожно накрывают покровным стеклом и рассматривают при малом и большом увеличении микроскопа (рис. 19).

Клетки кожицы либо вытянуты по длине листа, либо имеют квадратные или многоугольные очертания. Оболочки клеток тонкие, прозрачные, плотно примыкающие одна к другой. В клетках видны многочисленные зеленые тельца - хлоропласты, или хлорофилловые зерна. Хлоропласт имеет форму двояковыпуклой линзы, фронтальная сторона которой всегда обращена к клеточной стенке.

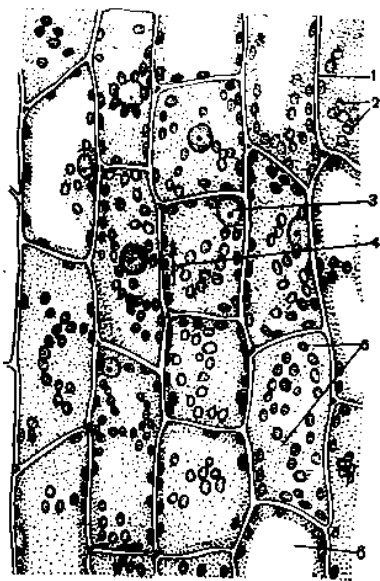


Рис. 19. Кожица листа валлиснерии:
1 - оболочка клетки; 2 - хлоропласты; 3 - ядро; 4 -
направления движения цитоплазмы; 5 -
цитоплазма; 6 - вакуоль

Работая микрометренным винтом и меняя таким образом фокусировку объектива, можно рассмотреть клетку с поверхности (в плане) или на некоторой глубине (в оптическом разрезе). В первом случае хлоропласты, прилегающие к верхней или нижней стенке, видны в плане. Очертания их округлые, иногда слегка угловатые. При рассмотрении клетки в оптическом сечении четкие контуры имеют только хлоропласты, расположенные у боковых стенок. В боковой проекции они овальные или эллипсовидные. В некоторых клетках видно ядро. Оно представляет собой светло-серое тельце с одним сильно преломляющим свет и поэтому хорошо заметным ядрышком. Ядро в клетке может занимать разные положения. Если ядро находится в середине клетки, оно обычно округлое, если расположено близко к стенке клетки - оно плоско-выпуклое, причем плоская сторона его прижата к стенке. Цитоплазма не видна, не удастся также различить границы находящейся в клетке вакуоли с клеточным соком. Это объясняется тем, что показатели преломления света цитоплазмы и клеточного сока более или менее одинаковы.

При внимательном наблюдении можно видеть, что пластиды перемещаются вдоль клеточных стенок. Это происходит вследствие движения вокруг

центральной вакуоли цитоплазмы. Такое движение называют круговым или ротационным (циклоз).

Движение цитоплазмы играет важную роль в осуществлении «обменных процессов и распределении веществ внутри клетки. В естественных условиях цитоплазма движется очень медленно, под влиянием физических или химических раздражителей движение обычно ускоряется. Это движение называют вторичным. Довольно быстрое движение цитоплазмы в клетках валлиснерии вызвано механическим повреждением листа в связи со снятием кожицы. Сначала оно заметно лишь в некоторых, а затем почти во всех клетках. Движение можно ускорить, если лист на несколько минут положить в теплую воду или добавить в нее каплю спирта.

Б. Строение клеток развивающихся листьев элодеи канадской (*Elodea canadensis*).

Элодея - пресноводное растение с мутовками продолговато овальных листьев на тонком стебле. Наиболее молодые клетки, структура которых еще не сформирована, составляют мелкие зачатки листьев, расположенные на верхушке побега под конусом нарастания. Для приготовления препарата верхушку побега (не более 1 см длиной) кладут на предметное стекло в большую каплю воды и осторожно под биноклем или лупой двумя препаровальными иглами удаляют крупные листья. Самые мелкие чешуевидные листья, скученные на верхушке побега, отрывают от стебля, расправляют, накрывают покровным стеклом и рассматривают при малом, а затем при большом увеличении микроскопа. Размеры и форма клеток зависят от размеров развивающейся листовой пластинки. Самые молодые листовые зачатки, которые удается отделить от стебля, состоят из клеток, очертания которых довольно сильно варьируют. Большинство клеток многоугольные, некоторые - узкие, удлинённые. Часто встречаются клетки только что возникшие в результате деления. Оболочки клеток очень тонкие, плотно сомкнутые. Клетки заполнены густой цитоплазмой, окружающей крупное, хорошо заметное ядро.

Мелкие тельца, также расположенные в цитоплазме, представляют собой хлоропласты (рис. 20: А, Б, В). В нижерасположенных листьях по мере увеличения размеров клеток число пластид и их размеры увеличиваются, содержимое клеток становится более светлым, прозрачным вследствие появления вакуолей с водянистым клеточным соком; ядра заметны не во всех клетках. Чтобы их увидеть, листья можно обработать раствором йода в водном растворе йодида калия (убивающего клетку), от этого реактива ядра становятся бурыми.

В. Строение клеток сформированного листа элодеи

Оторванный от стебля лист кладут нижней стороной в каплю воды на предметное стекло, накрывают покровным стеклом и рассматривают при малом и большом увеличении микроскопа. Лист элодеи значительно больше поля зрения микроскопа, поэтому даже при работе с малым увеличением препарат

приходится передвигать. Лист состоит из двух слоев клеток, причем клетки верхнего слоя, обращенного к наблюдателю, крупнее клеток нижнего слоя.

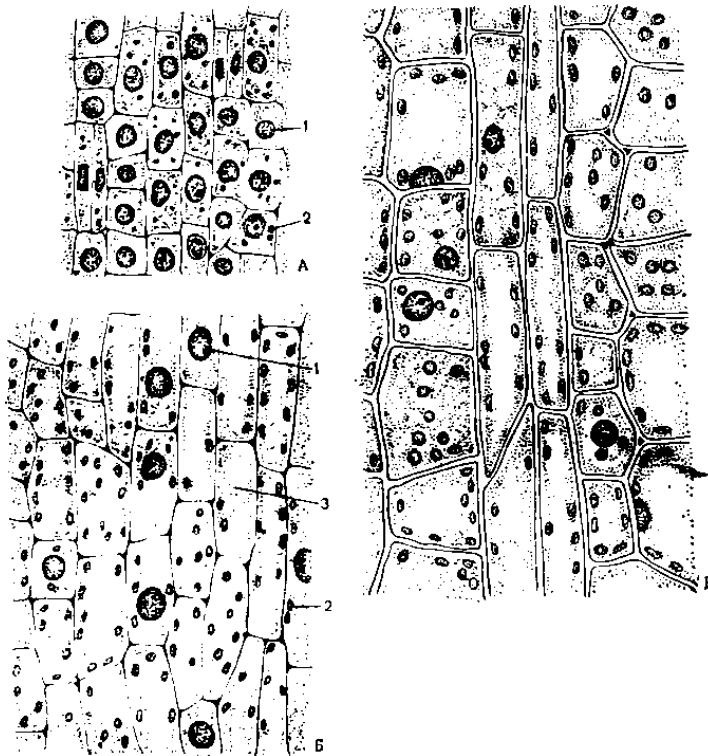


Рис. 20. Строение клеток листа элодеи: А, Б, В - последовательные стадии развития клеток: 1 - ядра; 2 - пластиды; 3 - вакуоли

Уже при малом увеличении обращает на себя внимание неравномерная окраска листовая пластинки, в середине которой вдоль листа располагается «средняя жилка», состоящая из более светлых клеток. Краевые клетки листа почти прозрачные. Некоторые клетки выступают наружу в виде острых зубцов (рис. 21, А) с концами, обращенными к верхушке листа. В клетках основания листовая пластинки зубцов нет. Наружные стенки зубцов очень толстые, красновато-бурые.

Параллельно «средней жилке» вдоль листа проходят узкие темные полосы разной длины. Они представляют собой систему межклетников - пространств между клетками верхней и нижней сторон листа, заполненных воздухом. Под микроскопом межклетники выглядят темными из-за большой разницы в показателях преломления света воздуха ($n=1$) и клеточных оболочек ($n=1,5$). Когда вода, показатель преломления света которой близок показателю преломления оболочек ($n=1,33$), войдет в межклетники через поврежденные места и вытеснит из них воздух, межклетники станут незаметными.

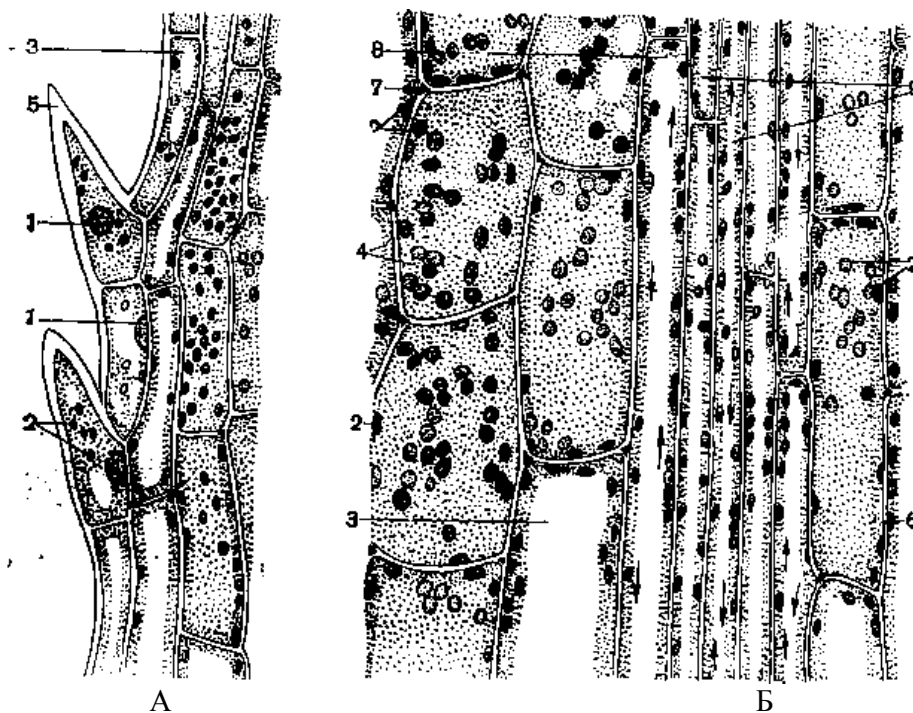


Рис. 21. Клетки сформированного листа элодеи (А, Б):

1 - ядро; 2 - хлоропласты; 3 - вакуоль; 4, 8 - цитоплазма; 5 - зубчик листа; 6 - оболочка клетки; 7 - межклетник; 9 - клетки «средней жилки»

Ознакомившись с общим планом строения листа, следует более детально рассмотреть особенности слагающих его клеток при большом увеличении. Клетки имеют тонкие прозрачные стенки, плотно соединенные между собой. Размеры, форма клеток, а также число содержащихся в них зеленых пластид - хлоропластов варьируют.

Клетки «средней жилки» узкие, сильно вытянутые по длине листа, пластид в них немного, большинство из них располагается вдоль боковых стенок. Очертания этих пластид овальные.

Клетки, прилегающие к «средней жилке», более широкие, квадратные, многоугольные или продолговатые. В клетках Много пластид, в плане они округлые, в боковой проекции - овальные или эллиптические. Ядро, цитоплазма и вакуоль в клетке не видны, так как показатели преломления света всех этих структур примерно одинаковы. Ядро становится заметным, если лист обработать раствором йода в водном растворе йодида калия, однако следует помнить, что этот реактив убивает клетку.

О наличии цитоплазмы и условных границах клеточной вакуоли можно судить лишь по перемещению пластид, происходящему вдоль клеточных стенок по часовой или против часовой стрелки, что характерно для кругового, или ротационного движения. В таких клетках цитоплазма, окружающая крупную

центральную вакуоль, занимает постоянное положение. В клетках только что оторванного листа цитоплазма обычно не движется или движется очень медленно, но спустя несколько минут движение становится хорошо заметным сначала в клетках средней жилки, а затем и в прилегающих к ней клетках.

Клетки, расположенные по краю листовой пластинки, вытянуты в длину, но значительно короче клеток средней жилки. Их наружные стенки толще внутренних. Клетки бедны содержимым, находящиеся в них немногочисленные пластиды значительно мельче, чем в остальных клетках. При внимательном рассмотрении в краевых клетках, в том числе и в зубцах, можно видеть ядра, представляющие собой светлые мелкозернистые тельца.

Ядро, расположенное в середине клетки, обычно шаровидное, ядро, прижатое к стенке клетки - полусферическое.

Г. Клетки плоского эпителия полости рта человека (временный препарат).

Для того чтобы приготовить препарат, достаточно стерильным стеклянным шпателем провести с легким нажимом по небу или по деснам. При этом на кончике шпателя в капельке слюны окажутся слущенные клетки эпителия, выстилающего полость рта. Такие клетки лучше всего рассматривать в фазово-контрастном или темнопольном микроскопе, можно использовать и обычный микроскоп с сильно закрытой конденсорной диафрагмой.

На препарате видны плавающие в жидкости отдельные крупные плоские клетки, содержащие ядра. Большая часть клеток мертвые, они имеют сильно

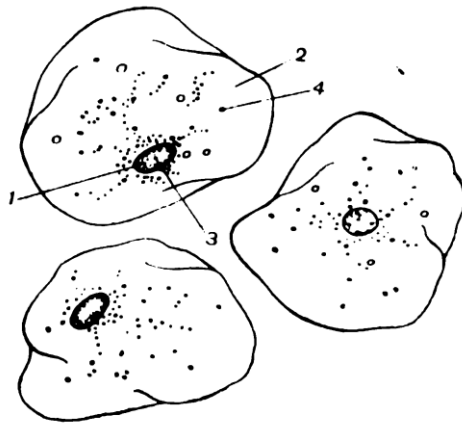


Рис. 22. Клетки плоского эпителия полости рта человека: 1 - ядра клеток; 2 - цитоплазма клеток; 3 - половой хроматин; 4 - митохондрия.

структурированное ядро. Так как поверхностные клетки покровного эпителия являются высокодифференцированными клетками, в которых затухают синтетические процессы, в ядрах этих клеток отсутствуют ядрышки или они очень мелкие (рис.22).

Д. Клетки кожицы чешуи лука репчатого (временный препарат).

Снять эпидермис с блестящей поверхности чешуи лука, капнуть одну-две капли воды, накрыть покровным стеклом.

Клетки кожицы лука репчатого многоугольные, с тонкими оболочками. В некоторых местах оболочки пересечены порами. Центральная часть клеток заполнена крупной вакуолью. Цитоплазма располагается тонким слоем вдоль стенок. Во многих клетках хорошо заметно ядро с ядрышком(Рис.23)

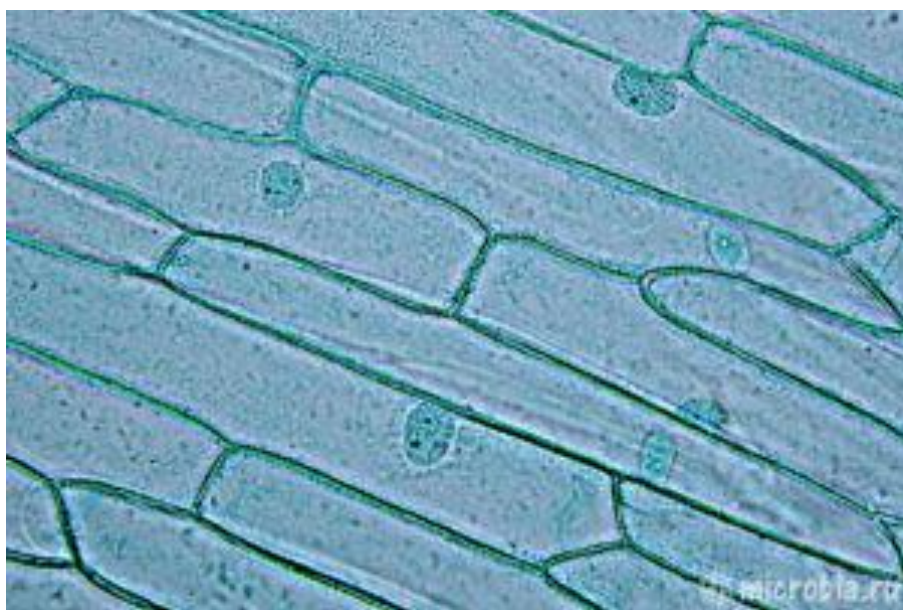


Рис.23. Клетки свежей пленки лука.

Задание. Рассмотреть рисунки 19-23. Рисовать рисунки 22 и 23. Обратите внимания на форму и ядра клеток.

III. МЕМБРАННЫЕ СТРУКТУРЫ КЛЕТКИ

Мембраны клетки.

Мембранные структуры были обнаружены под электронным микроскопом в наружных члениках зрительных клеток, в колбочках и палочках, в хлоропластах растительных клеток, в мякотной оболочке нервного волокна и в цитоплазме клеток. Построенные из двух белковых

и среднего между ними бимолекулярного липидного слоев, они представляют собой пластины, различным образом упакованные. Обычно упаковку из тысячи мембран, очень плотно расположенных, имеют структуры, в которых протекают наиболее сложные процессы превращения.

Большинство из молекул белкового слоя представляют ферменты, катализирующие химические процессы. Вследствие этого на мембранах совершается сложнейшая перестройка химических веществ. Включение ферментов в мембраны - относительно плотный субстрат, а не диффузное их расположение в клетке, обеспечивает: во-первых, их последовательное расположение, чем объясняется последовательность химических реакций; во-вторых, последовательное расположение целых ферментных систем, пространственное отделение одной системы от другой, что определяет направленное прохождение разных химических процессов; в-третьих, при очень небольших концентрациях ферментов обеспечивается полная утилизация вещества субстрата, при этом не образуется избыточного накопления продуктов промежуточных реакций. Следовательно, благодаря мембранной структуре в клетках исключено случайное столкновение ферментов с веществами жидкостной среды цитоплазмы, вещество изменяется, проходя вдоль мембран.

Открытие мембран, расшифровка их роли в клетках позволили подойти к пониманию механизмов, регулирующих направленный ход химических процессов, т. е. того, что определяет жизнь. Вот почему малейшее нарушение структуры мембран ведет к нарушению этих процессов, т. е. к смерти клетки.

Биохимические данные послужили основой для создания модели мембраны с мозаичной укладкой: мембрана состоит из неплотно упакованных белковых глобулярных белков, свободное пространство между которыми заполнено липидными молекулами (рис. 28). При этом часть белков может быть связана только с полярными группами липидов и может находиться на поверхности билипидного слоя; другие белки могут быть частично или даже полностью погружены из-за гидрофобных свойств своих участков в липидный слой; третьи-могут пронизывать мембрану насквозь. Интересно, что большая часть липидных молекул не связана с белками, так что белковые молекулы как бы плавают в «липидном озере». Поэтому вдоль довольно жидкого липопротеидного слоя могут перемещаться не только молекулы липидов, но и белков.

Принцип компартментализации

Цитоплазматические и другие мембраны клеток состоят из липидов (от 20% до 80%) и белков. Суммарная толщина плазматической мембраны составляет 7 – 21 нм. По своему строению мембраны бактериальных, животных

и растительных клеток очень сходны. Это дает основание говорить об универсальной «элементарной мембране».

В 1975 г. Николсоном и Сингером была предложена **жидкостно-мозаичная** структура мембран. Мембрана состоит из двойного слоя липидов с плавающими в них молекулами белка, а на ее наружной поверхности имеется полисахаридный слой гликокаликс. Белки мембран делятся на **периферические (внешние) и интегральные (внутренние)**. Некоторые мембранные белки часто погружены в мембрану, образуя гидрофильный канал – пору. Некоторые выполняют еще и функцию переносчика, транспортируя через мембрану те или иные вещества. В мембранах также имеются гликопротеины. Биологические мембраны в эукариотических клетках образуют мембранные органоиды – эндоплазматический ретикулум, комплекс Гольджи, лизосомы, митохондрии, хлоропласты. Ядро в эукариотической клетке также имеет двойную мембранную оболочку. Таким образом, каждая мембранная органелла представляет собой структуру цитоплазмы, ограниченную мембраной. Вследствие этого внутри нее образуется пространство, отграниченное от гиалоплазмы. Цитоплазма оказывается, таким образом, разделенной на отдельные отсеки со своими свойствами – **компарменты**. Наличие компарментов – одна из важных особенностей эукариотических клеток.

Задание. Рассмотреть электронные микрофотографии 24-28.

На фотографиях представлены мембранные структуры миелиновой оболочки нервного волокна, наружного членика зрительных клеток, хлоропластов. Видны профили мембранных пластин.

Два темных слоя и один светлый между ними составляют мембрану. Поэтому интенсивно выкрашенные темные слои на фотографиях соответствуют белковым слоям, а светлые – липидным.



Рис.24. Мембранное строение оболочки миелинового волокна (X145 000).

Видна правильная слоистость. 1 - аксон; 2 - цитоплазма шванновской клетки, ограниченная плазматической мембраной. Фиксация осмием.

На фото 24, 25 мембраны настолько плотно прилегают друг к другу, что темные слои двух соседних мембран сливаются и темные линии на фотографиях фактически представляют белковые слои не одной, а двух соседних мембран.

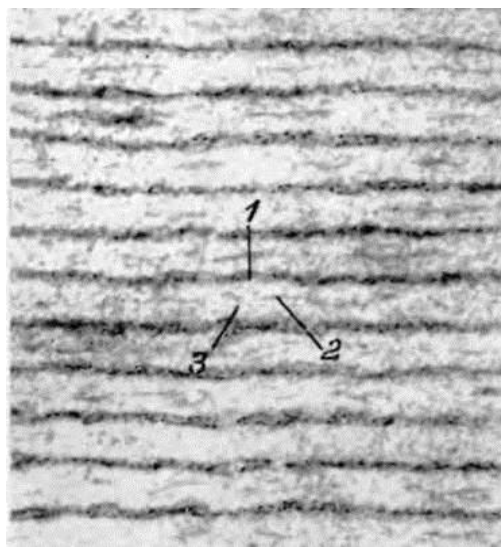


Рис.25. Структура миелиновой оболочки при большом увеличении (X50 000).

1-темные, белковые слои мембраны (мембраны настолько плотно прилегают друг к другу, что темные слои двух соседних мембран сливаются в один слой); 2 - стык между двумя мономолекулярными слоями липидов; 3- светлый, липидный слой мембраны.

На фото 26, сделанной при большем разрешении микроскопа, в светлом липидном слое виден еще легкий темный контур, разделяющий этот слой на два. Это стык между двумя мономолекулярными липидными слоями, образованный неполярными пограничными поверхностями, включающими глицериды и сложные эфиры холестерина. Полярные же концы липидных молекул, обращенные к белковому слою, состоят из жирных кислот и фосфолипидов.

Пластины мембран образуют своеобразную складчатую структуру, на что указывают закругления с краев.

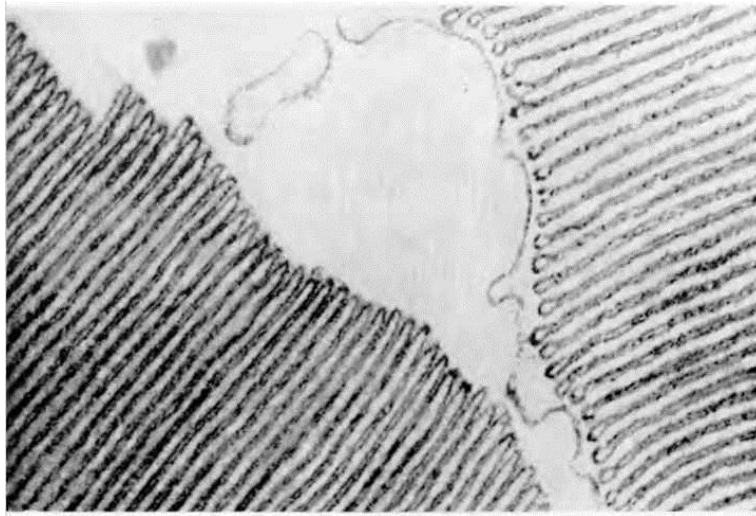


Рис.26. Продольный срез наружных членков двух колбочек из сетчатки окуня (X14 600). Фиксация осмием.

На фото 27 демонстрируется мембранная структура хлоропластов. Видно, что так же, как и в предыдущих объектах, система обладает большой сложностью организации. Это связано с функцией хлоропластов-превращение энергии света в химическую энергию. Последняя используется для осуществления синтетической деятельности.

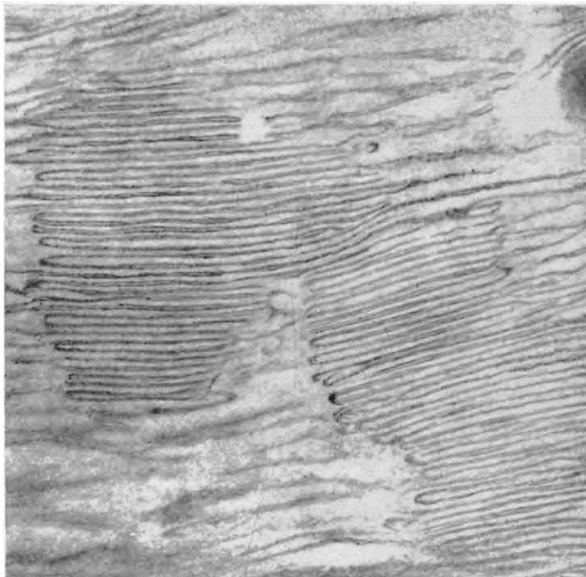


Рис.27. Срез через хлоропласт *Aspidistra elatior* (X100 000).

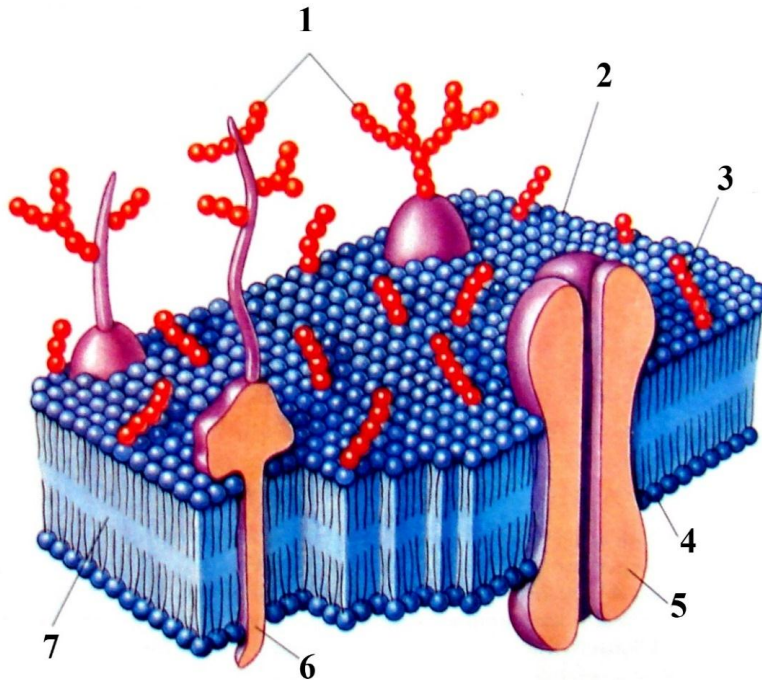


Рис.28. Жидкотно-мозаичная модель цитоплазматической мембраны: 1-цепочка карбогидрата; 2-внешняя поверхность мембраны; 3-гликолипид; 4-внутренняя поверхность мембраны; 5-протеин транспортный канал; 6-плоскость протеинового рецептора; 7-неполярная зона.

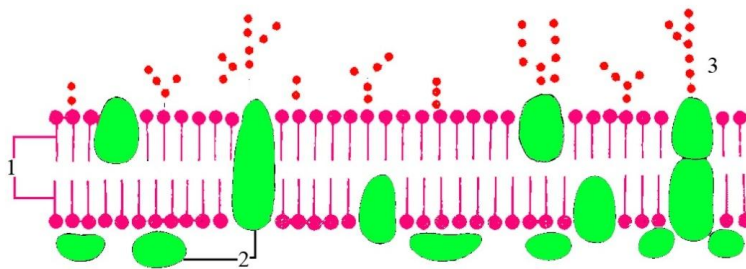


Рис.29. Схема молекулярной организации плазматической мембраны: 1-липидные молекулы; 2-молекулы белка; 3-слой гликокаликса.

Задание. Изучить жидкотно-мозаичную модель и молекулярное строения цитоплазматической мембраны.

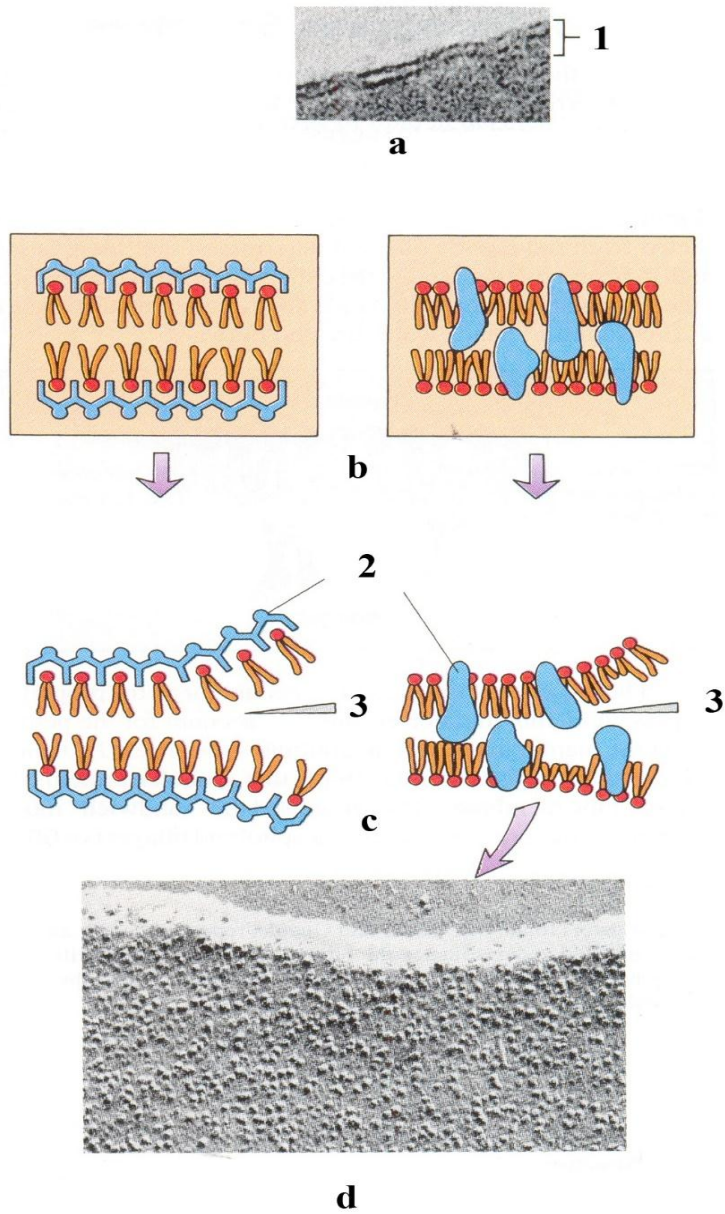


Рис.30. Цитоплазматическая мембрана: а-электронно-микроскопическое фото; б-жидкостно-мозаичная модель элементарной мембраны; с-схема мембраны, полученная методом замораживания-травления; д-её фото: 1-плазматическая мембрана; 2-молекулы белка; 3-фактор, скалывающий мембраны.

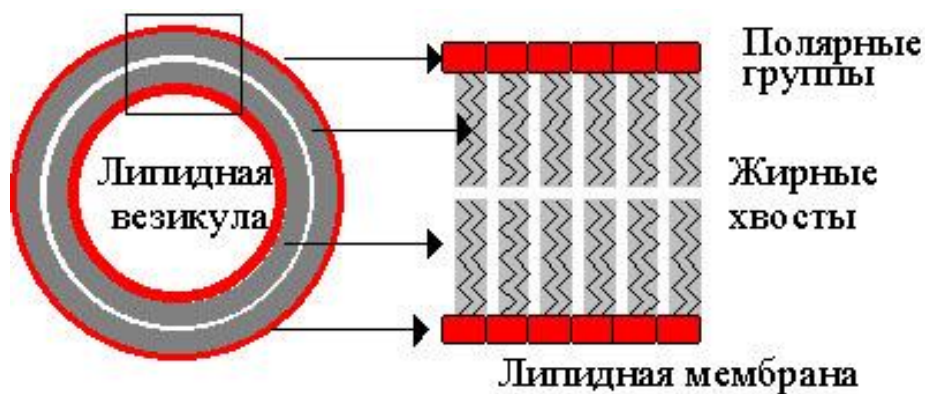
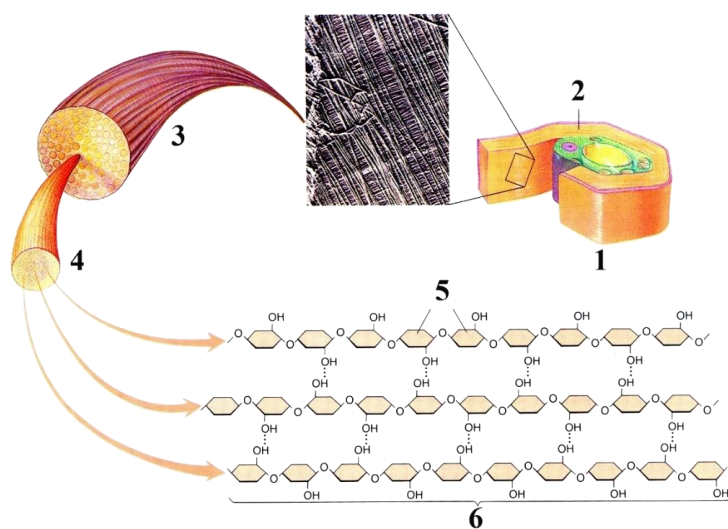


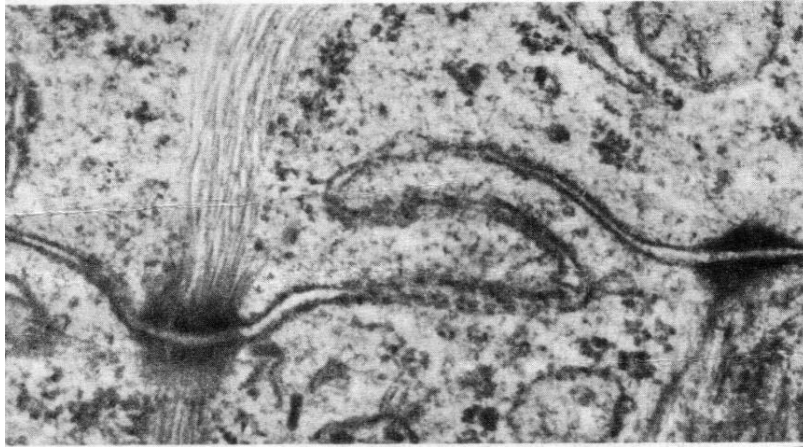
Рис. 31. Полярность липидной молекулы элементарной мембраны.



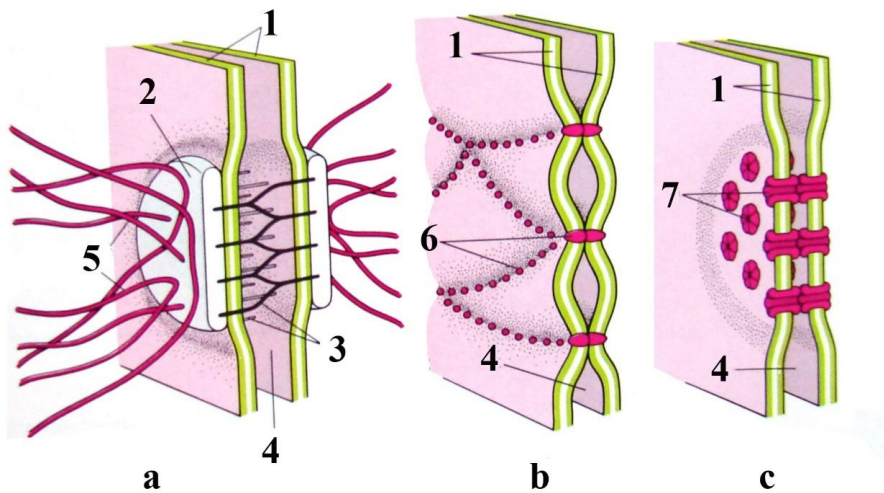
33-рис. Строение целлюлозного фибрилла клеточной оболочки растительной клетки. 1-растительная клетка; 2-клеточная оболочка; 3-фибрилла; 4-микрофибрилл; 5-молекула целлюлозы; 6-полимер целлюлозы.

Глава 3. МЕЖКЛЕТОЧНЫЕ КОНТАКТЫ.

У многоклеточных организмов за счет межклеточных взаимодействий образуются сложные клеточные ансамбли, поддержание которых может осуществляться разными путями.



34-рис. Десмосомный контакт-фото.



35 рис. Клеточные связи

животных: а-десмосомный; б-плотный; с-щелевидный контакты. 1-плазматическая мембрана; 2-цитоплазматический диск; 3-межклеточные филаменты; 4-межклеточное пространство; 5-цитоскелет; 6-плотный контакт; 7-щелевой контакт-коннексоны.

Межклеточные связи животных клеток.

А. Плотный-десмосомный контакт образующаяся между двумя цилиндрическими клетками(рис.34- фото, 35,а). Десмосомы образуются в результате уплотнения цитоплазматической мембраны соседних клеток и не

позволяет свободному движению веществ между ними. Десмосомы прикрепляют друг другу двух соседних клеток.

Б. Плотный контакт-это зона, где внешние слои двух плазматических мембран максимально сближены. Слияние мембран происходит не по всей площади плотного контакта а представляет собой ряд точечных сближений мембран(рис.35,b). Они получили название **замыкающих пластинок**. Оказалось, что в данном случае роль замыкающего плотного контакта заключается не только в механическом соединении клеток друг с другом. Эта область контакта непроницаема для макромолекул и ионов, и тем самым она запирает, перегораживает межклеточные полости, изолируя их от внешней среды.

В. Щелевые контакты считаются коммуникационными соединениями клеток; это структуры, которые участвуют в прямой передаче химических веществ из клетки в клетку, что может играть большую физиологическую роль не только при функционировании специализированных клеток, но и обеспечивать межклеточные взаимодействия при развитии организма, при дифференцировке его клеток. Характерным для этого типа контактов является сближение плазматических мембран двух соседних клеток на расстояние 2-3 нм. Оказалось, что в зоне щелевых контактов усеяны гексагонально расположенными частицами 7-8 нм в диаметре, имеющими в центре канал около 2 нм шириной. Эти частицы получили название **коннексонов**(рис.35-с,7). Отдельные коннексоны встроены в плазматическую мембрану так, что пробивают ее насквозь. Одному коннексоны на плазматической мембране клетки точно противостоит коннексон на плазматической мембране соседней клетки так, что каналы двух коннексонов образуют единое целое. Коннексоны играют роль прямых межклеточных каналов, по которым ионы и низкомолекулярные вещества могут диффундировать из клетки в клетку.

Г. Плазмодесменные связи растительных клеток. Пирами называют отверстия во вторичной оболочке, где клетки разделяют лишь первичная оболочка и срединная пластинка. Участки первичной оболочки и клетку, разделяющие соседствующие поры смежных клеток называют поровой мембраной или замыкающей пленкой поры. Замыкающую пленку поры пронизывают плазмодесменные каналцы. Плазмодесмы представляют собой тонкие трубчатые цитоплазматические каналы, соединяющие две соседние клетки.

Поры облегчают транспорт воды и растворенных веществ от клетки к клетке. В стенках соседних клетках, как правило, одна против другой, образуются поры(рис.36,37).

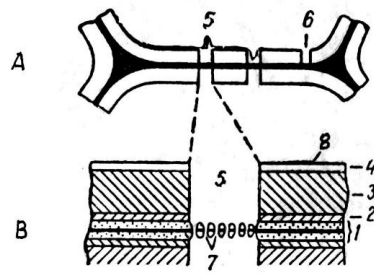


Рис.36. Схема строения клеточной оболочки растений. А-общее строение; В-часть оболочки в увеличенном виде: 1-срединная пластинка; 2-внешний, 3-срединный, и 4-внутренние слои; 5-пора; 6-слепая пора; 7- плазмодесменные каналцы; 8-плазматическая мембрана.

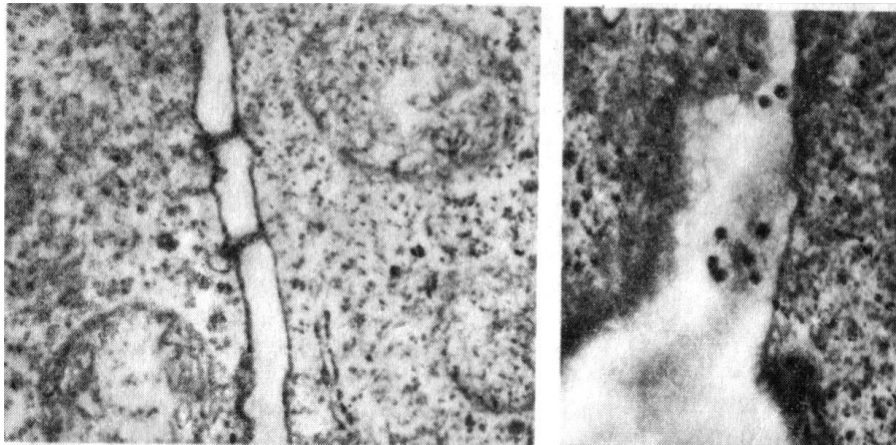


Рис.37. Плазмодесменные связи растительных клеток. А-продольный срез; В-поперечный срез.

Ограничивающая эти каналы мембрана непосредственно переходит в плазматические мембраны соседствующих клеток. Плазмодесмы проходят сквозь клеточную стенку, разделяющую клетки. Таким образом, у некоторых растительных клеток плазмодесмы соединяют гиалоплазму соседних клеток(рис.37,38).

Функциональная роль плазмодесм очень велика: с их помощью обеспечивается межклеточная циркуляция растворов, содержащих питательные вещества, ионы и другие соединения.

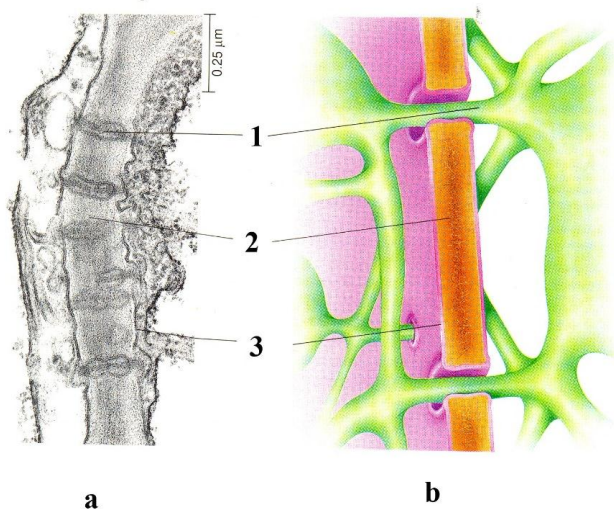
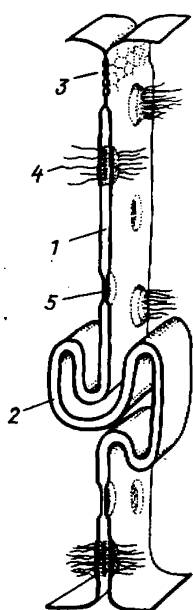


Рис.38. Межклеточные связи растительных клеток: а-электронная микрофотография; б-схематическое строение. 1-плазмодесма; 2-клеточная мембрана; 3-мембрана.



Г. Зубчатый контакт (замок) представляет собой выпячивание поверхности плазматической мембраны одной клетки в инвагинат(впячивание) другой. Такой тип межклеточных соединений характерен для эпителия. Такое разнообразие контактов может встречаться при объединении и однородных клеток. Например, в печени встречаются все основные типы контактов(рис.39,2).

Рис. 39. Общая схема строения межклеточных контактов: 1- простой контакт, 2 –зубчатый контакт- замок, 3 - плотный замыкающий контакт, 4 - десмосома, 5 - щелевидный контакт.

Д. Синаптический контакт (синапсы). Синапсы-участки контактов двух клеток, специализированных для односторонней передачи возбуждения или торможения от одного элемента к другому (рис.40).

Синапсы образуются на отростках нервных клеток-это терминальные участки дендритов и аксонов. Мембраны этих клеток разделены межклеточным пространством синаптической щелью. Мембрана в области синаптического контакта одной клетки называется пресинаптической, другой, воспринимающий импульс, - постсинаптической. Между ними выявляется огромное количество мелких вакуолей, синаптических пузырьков, заполненных медиаторами.

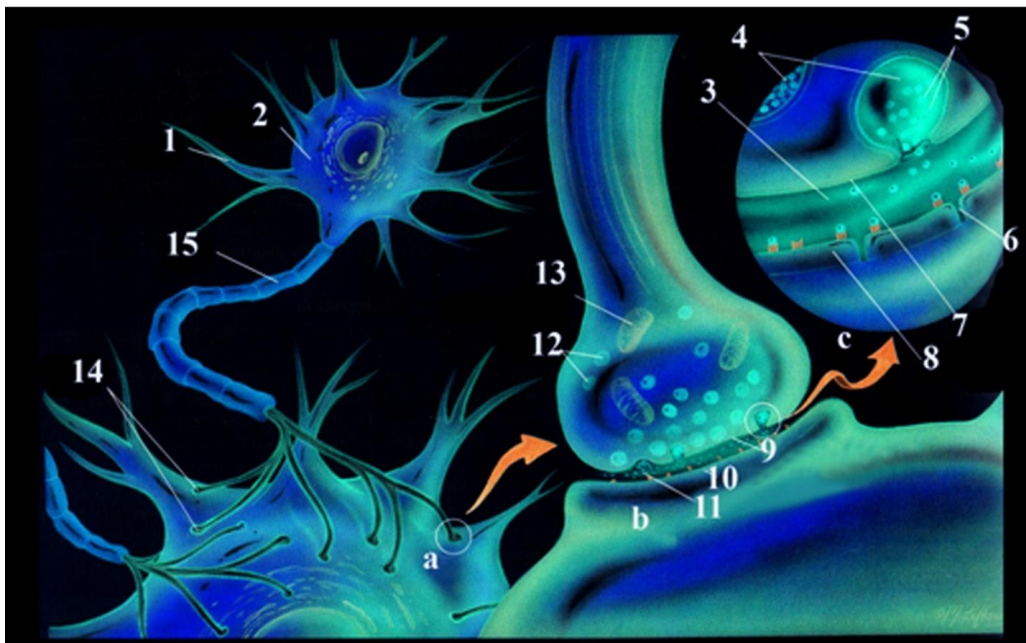


Рис.40. Синапсы: а-общий вид; б-синапс; с-увеличенный вид синапса. 1-дендрит; 2-тело клетки; 3,11-синаптическое пространство; 4,12-синаптические пузырьки; 5-вещества проводящие импульса-медиаторы; 6-ионный канал; 7,9-пресинаптическая мембрана; 8,10-постсинаптическая мембрана; 13-митохондрии; 14-синаптические концы; 15-аксон.

Глава 4. Функции мембраны.

А. Транспортные функции мембраны.

Плазматическая мембрана является полупроницаемой. Максимальной проникающей способностью обладает вода и растворимые в ней газы, значительно медленнее проникают сквозь мембрану ионы. Поэтому если клетку, например эритроцит, поместить в среду, где концентрация солей будет ниже, чем в клетке (гипотония), то вода снаружи устремится внутрь клетки, что приведет к увеличению объема клетки и к разрыву плазматической мембраны (“гипотонический шок”). Наоборот, при помешении эритроцита в растворы солей более высокой концентрации, чем в клетке, произойдет выход воды из клетки во внешнюю среду. Клетка при этом сморщится, уменьшится в объеме (рис.41).

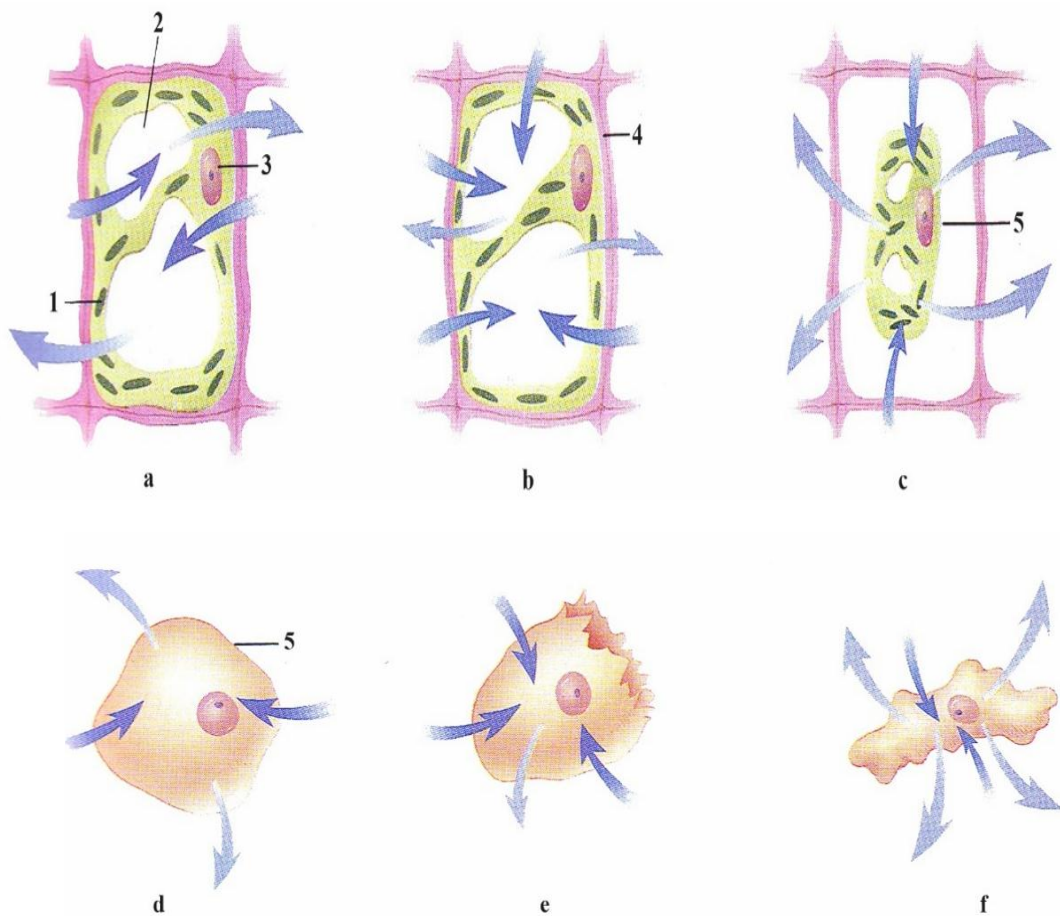


Рис.41. Осмотические явления в растительной (a, b, c) и животной (d, e, f) клетках. Клетки в изотонических (a, d), гипотонических (b, e) и гипертонических (c, f) растворах. 1-хлоропласт; 2-вакуола; 3-ядро; 4-клеточная оболочка; 5-плазматическая мембрана.

Пассивный транспорт воды из клетки и в клетку идет с низкой скоростью, что в 100000 раз меньше скорости диффузии молекул воды. Проницаемость для ионов еще меньше, причем более высокая скорость прохождения для катионов и значительно ниже для анионов. Такой транспорт ионов осуществляется с помощью переносчиков ионов, ионофоров, имеющих, по-видимому, белковую природу(рис.42).

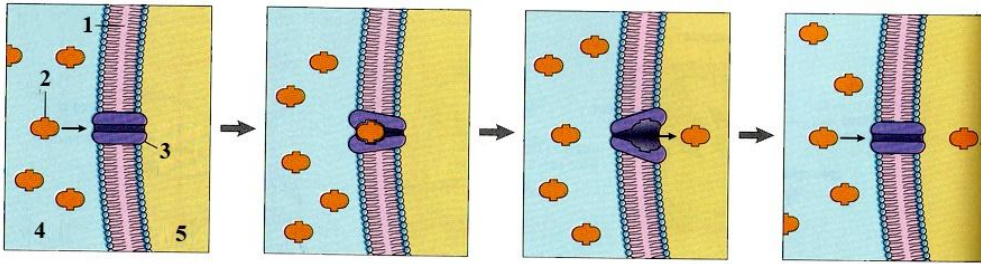


Рис.42. Пассивный перенос веществ. 1-мембрана; 2-вещества в растворе; 3-белок переносчик; 4-раствор; 5- цитоплазма.

Активный перенос ионов и веществ происходит против градиента концентрации(рис.43).

Активный перенос ионов.

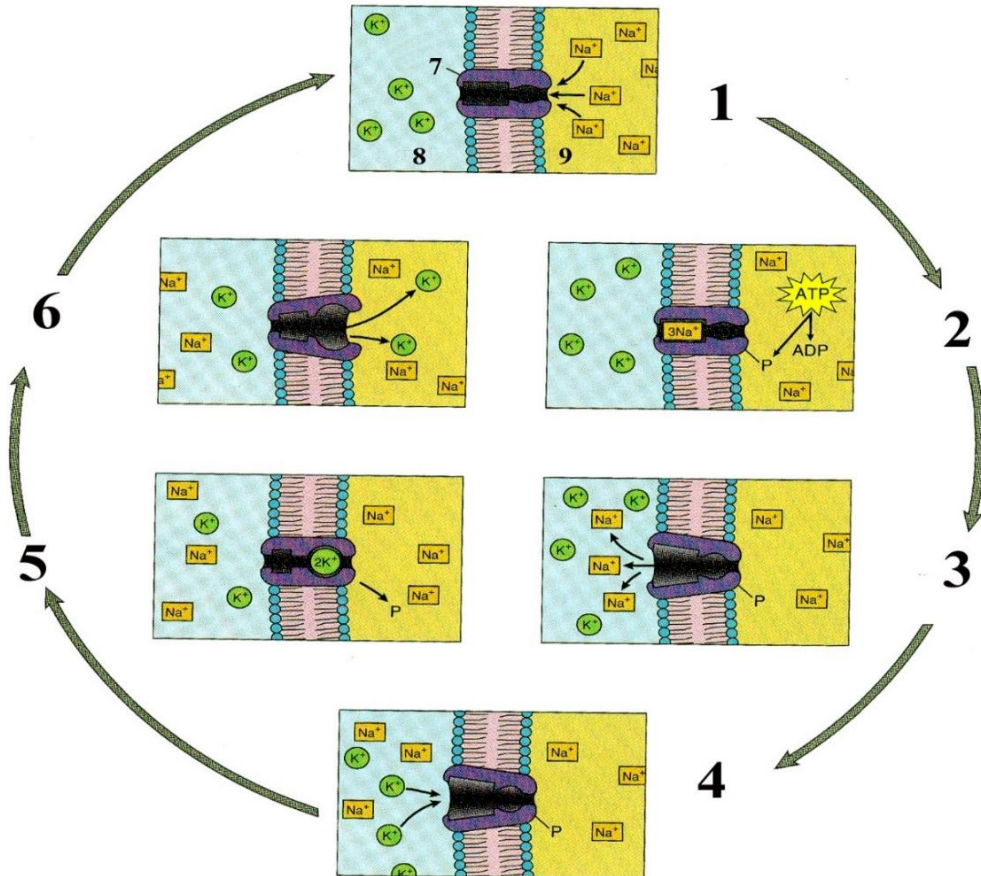


Рис.43. Перенос ионов при помощи натрий-калиевого насоса: 1-белковый канал переносчика в закрытом состоянии, 3 готов к выходу из клетки; 2-отделение от АТФ фосфатной кислоты, соединения 3 белку; 3-отделения 3Na^+

от белка переносчика; 4-открытие канала белка переносчика и готовое состояние $2K^+$ к входу в клетку; 5-вход $2K^+$ в канал белка переносчика; 6-отделения $2K^+$ от белка переносчика; 7-белок переносчик; 8-раствор; 9-цитоплазма.

В ряде случаев макромолекулы и крупные частицы попадают внутрь клетки в результате процессов **эндоцитоза** и **экзоцитоза**. Эндоцитоз разделяют на пиноцитоз и фагоцитоз. Общее для этих процессов то, что поглощенные вещества на поверхности плазматической мембраны окружаются мембраной в виде вакуоли, которая перемещается внутрь клетки.

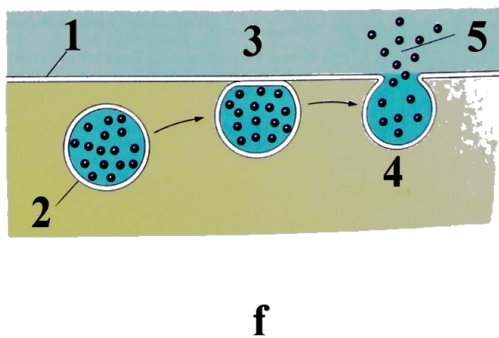
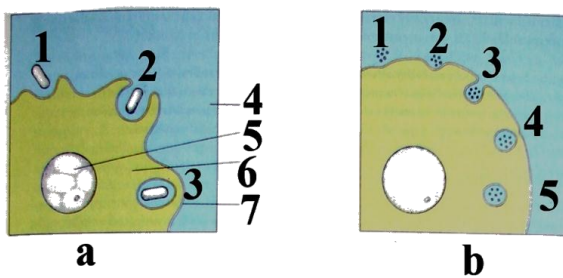


Рис.44. Эндоцитоз и экзоцитоз. А-фагоцитоз: 1,2,3-этапы фагоцитоза; 4-среда; 5-ядро; 6-цитоплазма; 7-плазматическая мембрана; в-пиноцитоз; 1-5-этапы пиноцитоза; с-момент глотания инфузорию крупным простейшим-*Didinium nasutum*; d-фагоцитоз трёх клеток макрофагом; е-экзоцитоз-электронно микроскопическое фото; f-схема экзоцитоза; 1-плазматическая мембрана; 2-секреторный пузырьк; 3-среда; 4-цитоплазма; 5-секреторное вещество.

Б. Рецепторные функции плазмалеммы.

Эти функции связаны с локализацией на плазматической мембране специальных структур, связанных со специфическим узнаванием или химическими, или физическими факторами. Клеточная поверхность обладает большим набором компонентов-рецепторов, определяющих возможность специфических реакций с различными агентами. В качестве таких рецепторов на поверхности клетки могут выступать белки мембраны или элементы гликокаликса(рис.45).

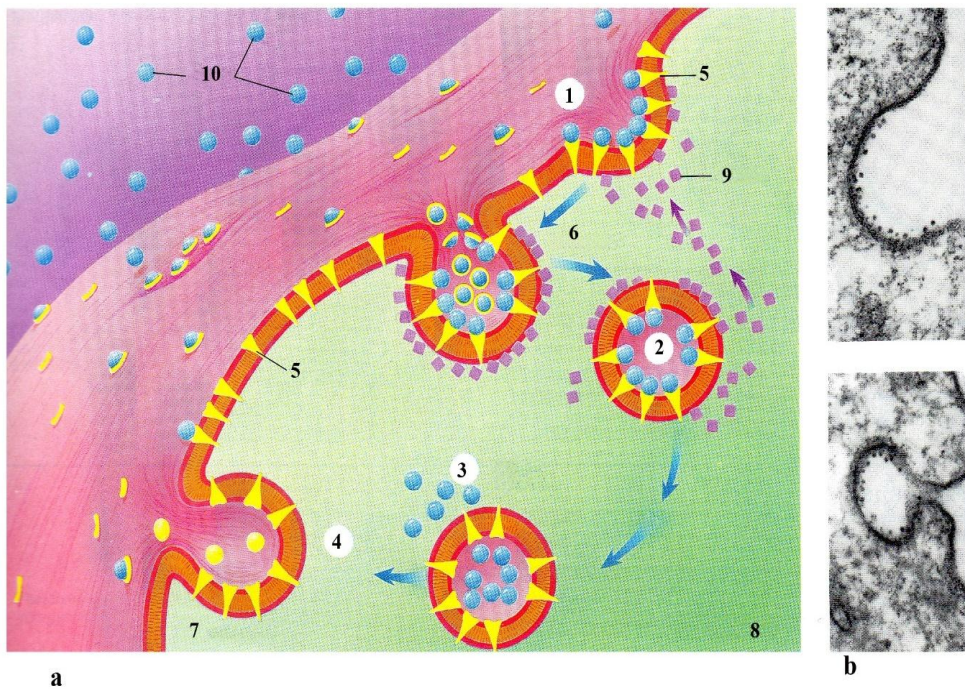


Рис.45. Рецепторная функция мембраны: а-рецептор в экзо-и эндоцитозе(схема); в-формирование эндоцитозных пузырьков(электронно-микроскопическое фото). 1-рецептор и вещество проникающее в клетки – лиганда; 2-пузырёк, отделённый из мембраны, содержащий лиганду; 4-экзоцитозный пузырёк; 5-рецептор; 6-эндоцитоз; 7-экзоцитоз; 8-цитоплазма; 9-вещество клатрин, передающее импульса рецептору; 10-лиганда в среде.

Глава 5. СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЕ СТРУКТУРЫ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ.

А. Микроворсинки. Это выросты цитоплазмы, ограниченные плазматической мембраной, имеющие форму цилиндра и с закругленной вершиной (рис.46). Микроворсинки характерны для клеток эпителия, но обнаруживаются и среди соединительнотканых клеток (фибробласты, лейкоциты).

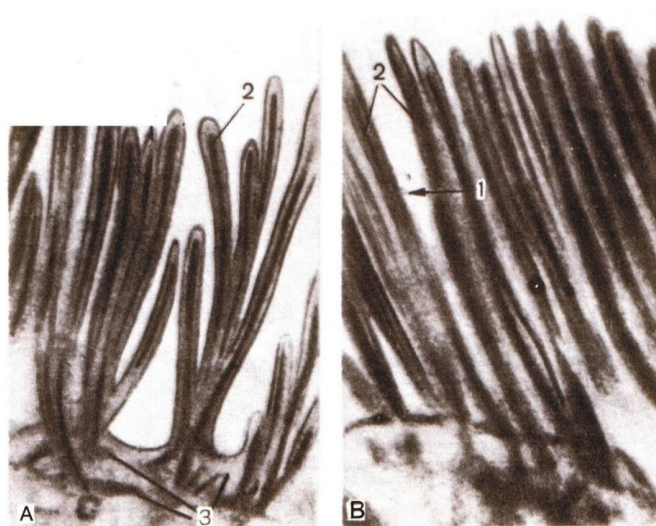


Рис.46. Схема электронно-микроскопического строения всасывающей каемки эпителия тонкой кишки обезьяны. А-кустиковое распределение микроворсинок; Б-равномерное распределение микроворсинок. 1-микроворсинки, 2-микроканальцы, 3-эргастоплазма.

Б. Реснички и жгутики. Другой класс плазматических выростов-реснички и жгутики (рис. 47.). Они покрыты также плазматической мембраной и содержат систему микротрубочек, связанных с базальным тельцем. Диаметр реснички равен примерно 200 нм, длина может достигать 20 мкм. Количество ресничек на клетку варьирует. Если ресничка одна, то ее называют жгутиком, его длина может быть от 1 мкм до 2 мм (рис.34). У инфузорий каждая клетка снабжена сотнями и даже тысячами ресничек (рис.48). Функции ресничек и жгутиков связаны с движением.

Реснички от основания до самой их верхушки покрыты плазматической мембраной. Внутри выроста расположена аксонема, сложная структура, состоящая в основном из микротрубочек. Нижняя, проксимальная часть реснички, базальное тельце, погружена в цитоплазму. Базальное тельце по своей структуре совершенно сходно с центриолью.

На поперечном сечении реснички видна плазматическая мембрана, окружающая **аксонему**. Она в своем составе имеет девять дублетов микротрубочек, образующих внешнюю стенку цилиндра аксонемы. Дублеты микротрубочек слегка повернуты по отношению к радиусу аксонемы. Кроме того, в центре аксонемы располагается пара центральных микротрубочек. В целом систему микротрубочек реснички описывают как $(9 \times 2) + 2$, в отличие от $(9 \times 3) + 0$ системы центриолей. В дублетах микротрубочек также различают

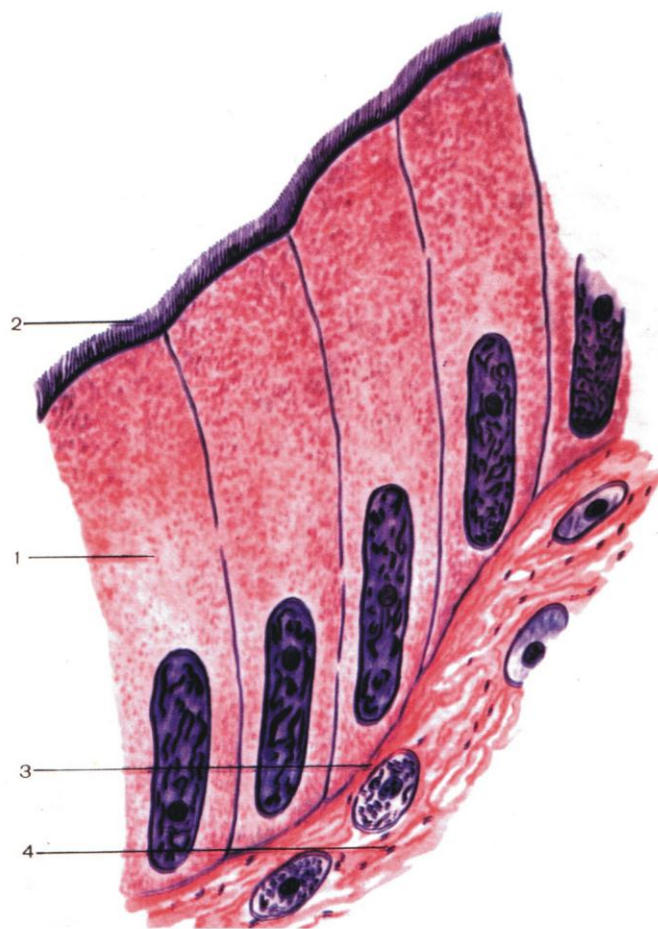


Рис.47. Однорядный реснитчатый (мерцательный) эпителий яйцевода. 1-цилиндрическая клетка, 2-реснички, 3-базальная мембрана, 4-соединительная ткань. 5-ядро эпителия.

А-микротрубочку, состоящую из 12 субъединиц, и В-микротрубочку, неполную, содержащую 11 субъединиц. А-микротрубочка несет на себе ручки, которые направлены к В-микротрубочке соседний дублет. От А-микротрубочки к центру аксонемы отходит радиальная связка, или спица, оканчивающаяся головкой, присоединяющейся к центральной муфте, имеющей диаметр около 70 нм, окружающей две центральные микротрубочки. Таким образом, в аксонеме располагается 20 продольных микротрубочек (сравните строения ресничка и жгутика) (рис.47,48,).



Рис.48. Расположение ресничек на теле инфузории.

Строение жгутика.

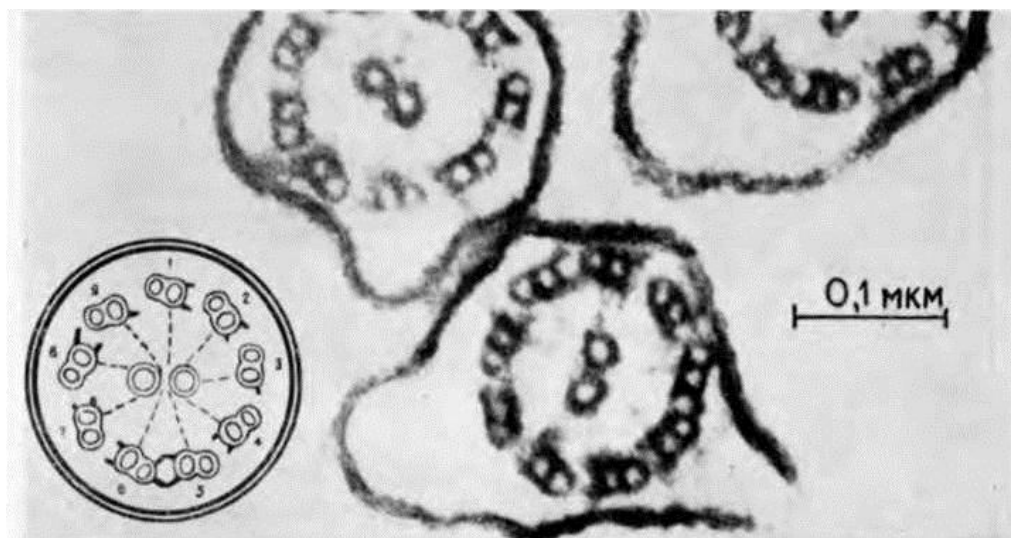


Рис.49. Поперечный разрез через хвост трех сперматозоидов (электронная микрофотография). Видно расположение 9 парных и 2 непарных центральных нитей. Слева схема с этих фотографий, показаны радиальные проекции и выросты, которых снабжена каждая пара периферических нитей.

Задание 1. Рассмотреть и изучить препараты, демонстрирующие строение специализированные структуры цитоплазматической мембраны. Обратит внимание на своеобразия этих структур в связи их выполняемой функции. Рисовать и обозначить рисунки 46 и 47 рисунки и все детали строения обозначить соответственно.

Глава 6. ВАКУОЛЯРНАЯ СИСТЕМА. ЦИТОПЛАЗМА.

Как известно, сама цитоплазма, отделенная от окружающей клетку среды цитоплазматической мембраной, неоднородна по своей структуре. В ней кроме кажущейся бесструктурной протоплазмы различают разнообразные **мембранные и не мембранные** компоненты. К **не мембранным** компонентам относятся микротрубочки и органеллы, построенные из них, и кроме того, различные микрофиламенты и микрофибриллы. Мембранные структуры цитоплазмы представляют собой отдельные или связанные друг с другом отсеки, содержимое которых отделено мембранами как от собственно

гиалоплазмы, так и от плазматической мембраны. Мембранные структуры цитоплазмы можно разделить на две группы. Одна из них-**вакуолярная система**. К ней относятся эндоплазматический ретикулум, гранулярный и гладкий, и различные вакуоли, возникающие из этого ретикулума (вакуоли растительных клеток, микротельца, сферосомы и др.). Кроме того, к этой системе нужно отнести вакуолярный комплекс аппарата Гольджи и лизосомы. Для них характерно наличие **одинарной ограничивающей мембраны**. К другой группе мембранных компонентов цитоплазмы относятся **двумембранные органоиды**-митохондрии и пластиды. В этом случае они имеют замкнутые и независимые, не переходящие друг в друга, внешние и внутренние мембраны.

I. Одно мембранные органоиды

A. Эндоплазматическая сеть

В 1945 г. К. Портер увидел в электронном микроскопе, что зона эндоплазмы заполнена большим числом мелких вакуолей и каналов, стенки их ограничены тонкими мембранами. Так был обнаружен эндоплазматический ретикулум, или эндоплазматическая сеть. Позднее, при использовании метода ультратонких срезов удалось выяснить структуру этого образования и обнаружить его неоднородность. Самым же главным оказалось, что эндоплазматический ретикулум (ЭР) встречается практически у всех эукариотов.

Подробный электронно-микроскопический анализ позволил выделить два типа ЭР: гранулярный (шероховатый) и гладкий.

1. Шероховатая эндоплазматическая сеть, или эргастоплазма.

Шероховатая эндоплазматическая сеть, или эргастоплазма, занимает те участки клетки, которые окрашиваются основными красителями. Эти участки клетки получили название базофильных, а вещество, окрашивающееся основными красителями- базофильное вещество, или эргастоплазма.

На ультратонких срезах этот тип ЭР представлен замкнутыми мембранами, которые образуют на сечениях вытянутые мешки, цистерны или же имеют вид узких каналов.

Отличительной чертой этих мембран является то, что они со стороны гиалоплазмы покрыты мелкими (около 20 нм) темными, почти округлыми частицами, гранулами. Впервые эти гранулы описаны Дж. Паладе и в настоящее время их называют рибосомами.

Задание 1. Рассмотреть субмикроскопическое строение эргастоплазмы на электронных микрофотографиях 50-52.

На фото 50 представлены базофильные участки печеночной клетки. Видно, что они состоят из параллельно расположенных мембран, образующих уплощенные мешочки. На поверхности мембран располагаются темные плотные для электронов гранулы. Они сплошь

выстилают наружную поверхность мембран, а также имеются в матриксе между мембранами. Это рибонуклеопротеидные гранулы, или рибосомы.

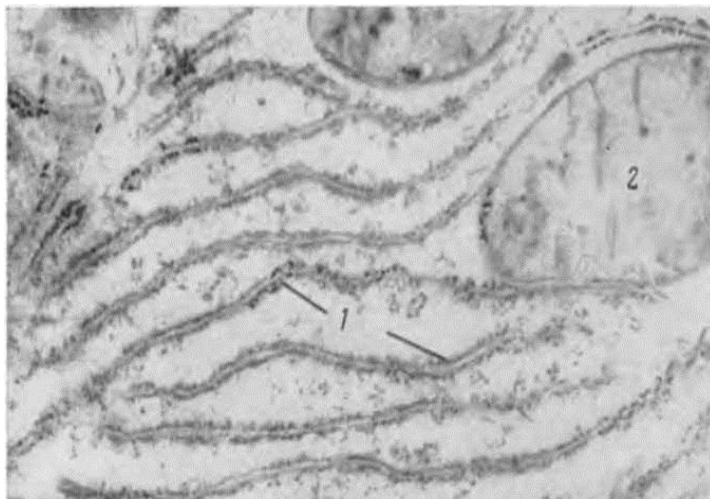


Рис.50. Участок цитоплазмы печеночной клетки, который соответствует базофильной области. 1 - рибосомы; 2- митохондрии.

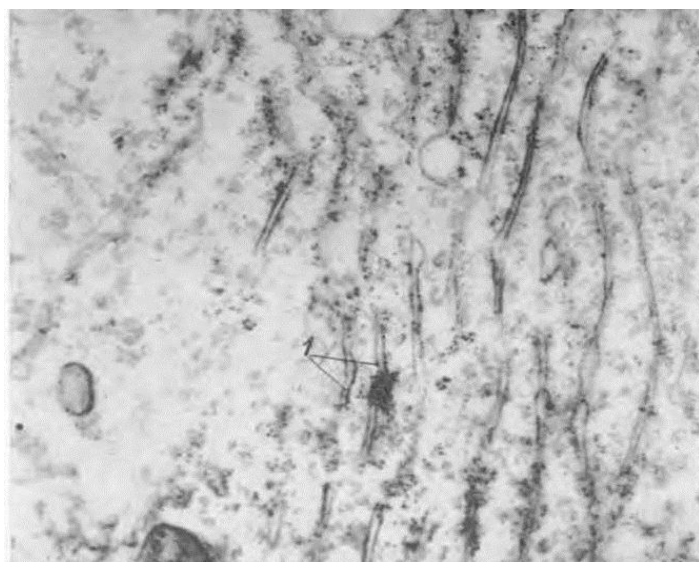


Рис.51. Участок цитоплазмы нервной клетки из ядра отводящего нерва (электронная микрофотография). Участок соответствует веществу Ниссля (тигроиду).

1 - шероховатая эндоплазматическая сеть. Рибосомы прикреплены к наружным поверхностям мембран, а также свободно лежат в цитоплазме.

На фото 51 представлен базофильный участок цитоплазмы нервной клетки. Под световым микроскопом здесь видно вещество Ниссля, или тигроид. Вещество Ниссля представляет собой шероховатую эндоплазматическую сеть. На наружной поверхности мембран находятся рибосомы. Имеются свободные рибосомы, не прикрепленные к мембранам. На фотографии видны места перехода плоских мешочков в расширенные цистерны эндоплазматической сети.

Таким образом, каждый участок базофильной цитоплазмы, видимый под световым микроскопом, имеет вышеописанное субмикроскопическое строение. Наличие рибосом на мембранах придает последним вид шероховатой поверхности, отчего такая мембранная система и получила название шероховатой эндоплазматической сети.

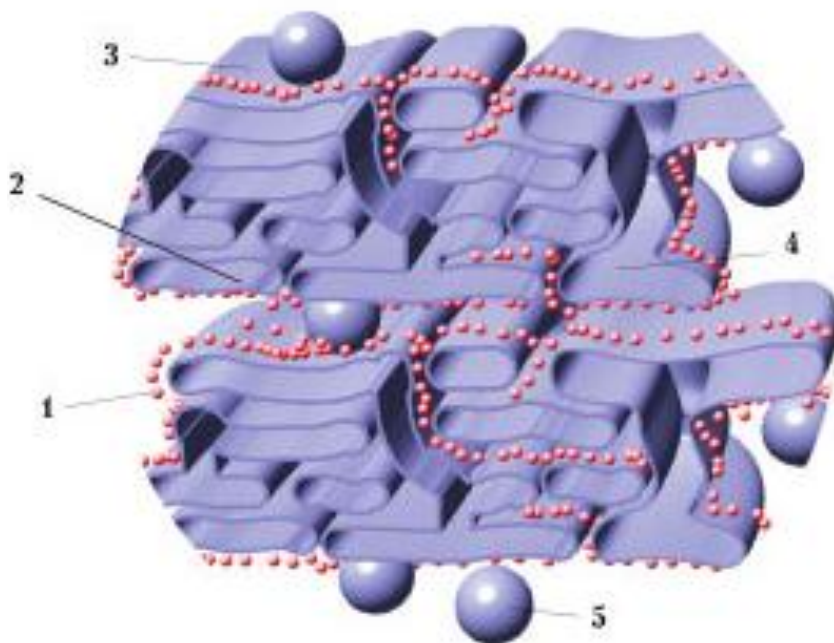


Рис.52. Гранулярная эндоплазматическая сеть (схема). 1-рибосомы; 2-цистерны; 3-наружная сторона; 4-полость; 5-пузырьки эндоплазматической сети.

2. Гладкая эндоплазматическая сеть

Цитоплазма клетки заполнена сложной системой канальцев, пузырьков, уплощенных мешочков, трубочек, сообщающихся друг с другом и имеющих трехмерное пространственное расположение. Она

названа эндоплазматической сетью. Стенка канальцев образована мембраной, аналогичной по строению тем, которые есть в миелиновой оболочке нерва или наружном членике колбочки, палочки сетчатки. Однако здесь они не образуют сложной пластинчатой системы.

На микрофотографиях, представляющих собой срезы через клетку, видны лишь профили этих канальцев, имеющие разную форму. Нередко форма профилей канальцев зависит от типа клетки, принадлежности ее к той или другой ткани или от функции клетки. Часто клетки разных тканей, близких по функционированию, имеют сходные профили эндоплазматической сети. Система мембран образует две части в клетке: одна внутри мембран, другая (цитоплазматический матрикс) - снаружи от них. Некоторые участки клетки заполнены так называемой-гладкой эндоплазматической сетью. В отличие шероховатой она не содержит на наружной поверхности рибосомы.

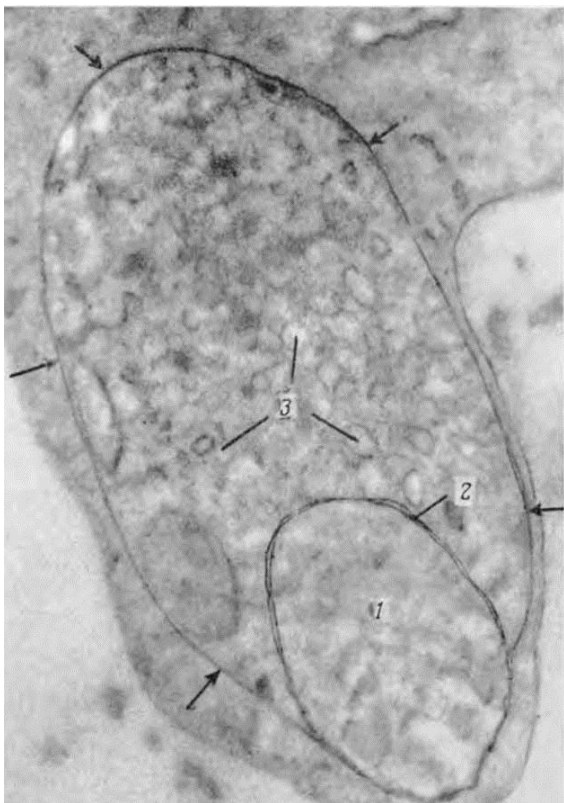


Рис.53. Тонкий срез малярийного плазмодия в эритроците крысы. Границы паразита указаны стрелками. 1-ядро; 2-двойная мембрана оболочки ядра;3-мелкие пузырьки гладкой эндоплазматической сети цитоплазмы.

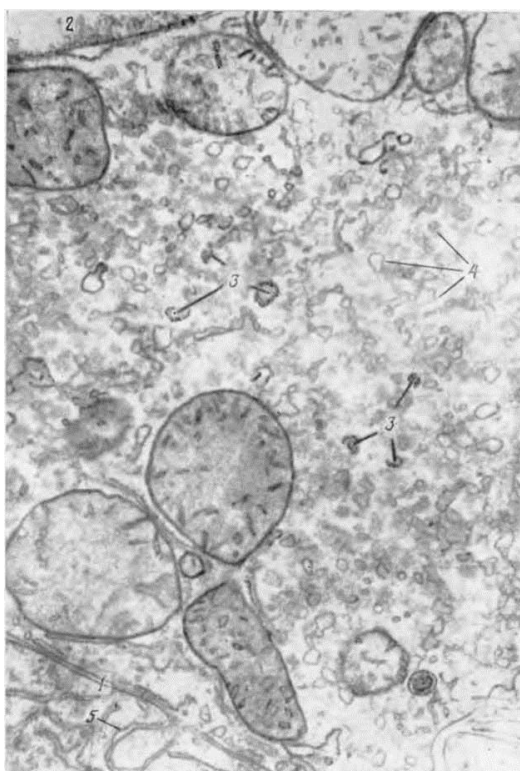
Задание 1. Рассмотреть электронные микрофотографии 53-55.

На электронных микрофотографиях представлена гладкая эндоплазматическая сеть. Видны срезы через системы трубочек, цистерн, мешочков. Стенки их образованы мембранами, имеющими трехслойное строение.

На фото 53 - клетка малярийного плазмодия. Эндоплазматическая сеть - в виде множества мелких пузырьков.

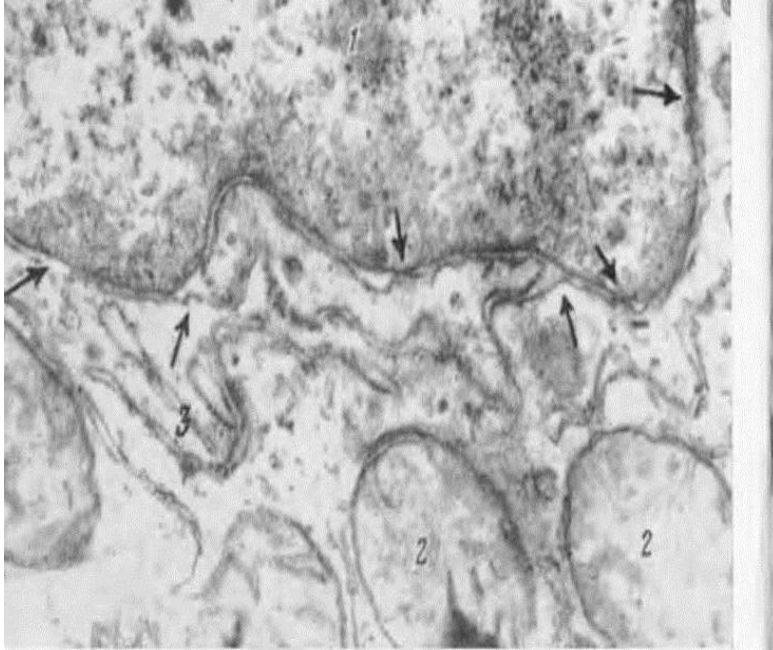
На фото 54 виден переход эндоплазматической сети в плазматическую мембрану; на фото 55 - переход эндоплазматической сети в перинуклеарное пространство.

Связь эндоплазматической сети с ядерной и плазматической оболочками указывает на возможность единого генезиса этих образований. Одновременно вырисовывается роль эндоплазматической сети как эндо-целлюлярной проводящей системы. Не исключено, что по эндоплазматической сети вещества передвигаются из внешней среды в перинуклеарное пространство и из ядра в цитоплазму, а также распространяются по всей цитоплазме, попадая в цитоплазматический матрикс.



54. Краевой участок печеночной клетки, фиксированной через 2 часа после кормления животного, голодавшего в течение 5 дней (X26 000).

1- край клетки; 2 - ядро; 3 - небольшие очаговые скопления гликогена среди профилей эндоплазматической сети; 4 - эндоплазматическая сеть; 5 - связь канальцев эндоплазматической сети с плазматической мембраной.



55. Часть печеночной клетки (электронная микрофотография).

1- ядро; 2 - митохондрии; 3 - канальца эндоплазматической сети. Видна структурная непрерывность между канальцами эндоплазматической сети и перинуклеарным пространством (указано стрелками).

Задание 2. Рисовать фото 53, 54, 55 и обозначить основные части фотографии.

Б. Аппарат Гольджи

Аппарат Гольджи, или сетчатый аппарат, встречаются во всех животных и растительных клетках. На препаратах он имеет вид пластинок, соединенных между собой, колечек, полу колечек, сети. Азотнокислым серебром он выкрашивается в черный цвет вследствие способности восстанавливать серебро(Рис.56).



Рис.56. Аппарат Гольджи в нервных клетках (по данным светового микроскопа). 1-ядро и ядрышко; 2-цитоплазма; 3-аппарат Гольджи.

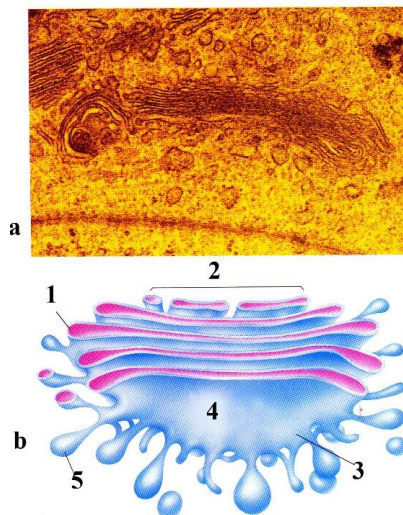
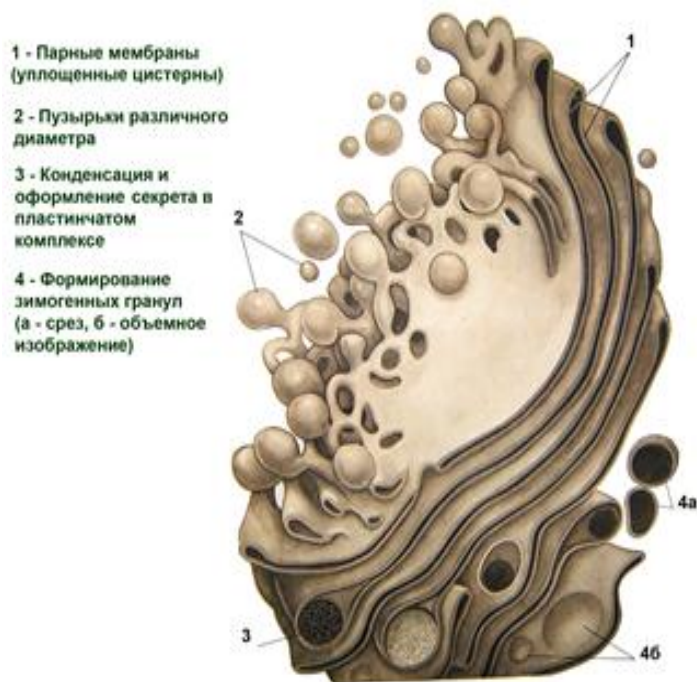
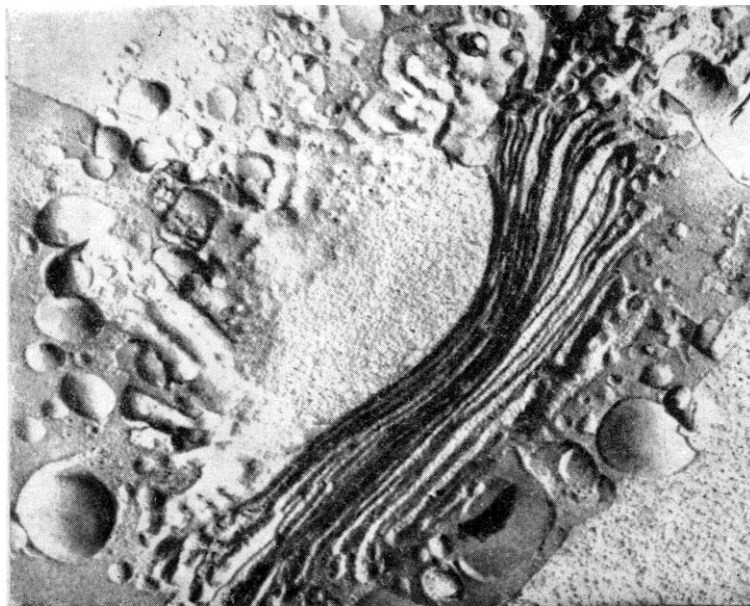


Рис 57. Формирование лизосом в аппарате Гольджи животной клетки: а-электронно-микроскопическое фото; б-схематическое строение. 1-цистерны; 2-формирование лицевой стороны; 3-созревающая лицевая часть; 4-центральная часть; 5-секреторный пузырек-лизосом.



А



Б

Рис.58. А-схема; Б-снимок аппарат Гольджи в сканирующем электронном микроскопе (X 52000). Видно большое скопление параллельных двойных мембран, замкнутых на концах, и мелких пузырьков около них.

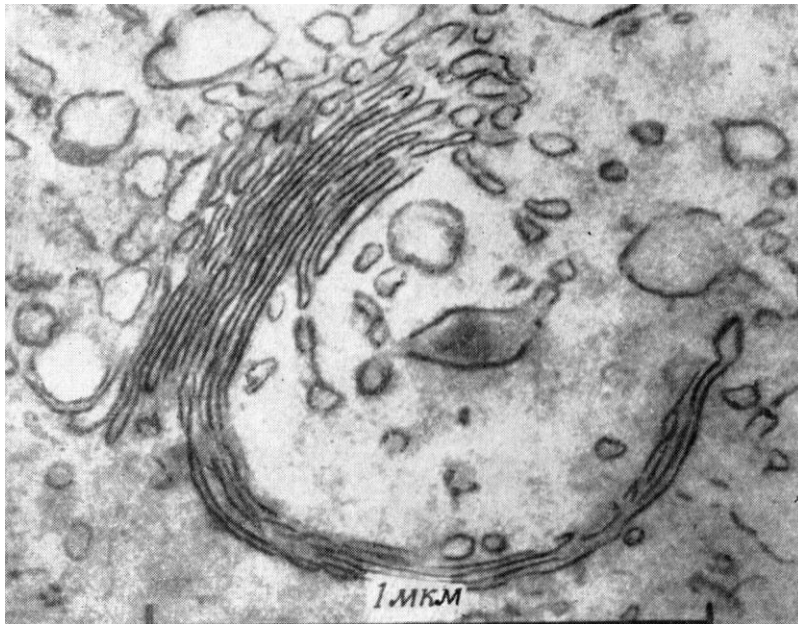


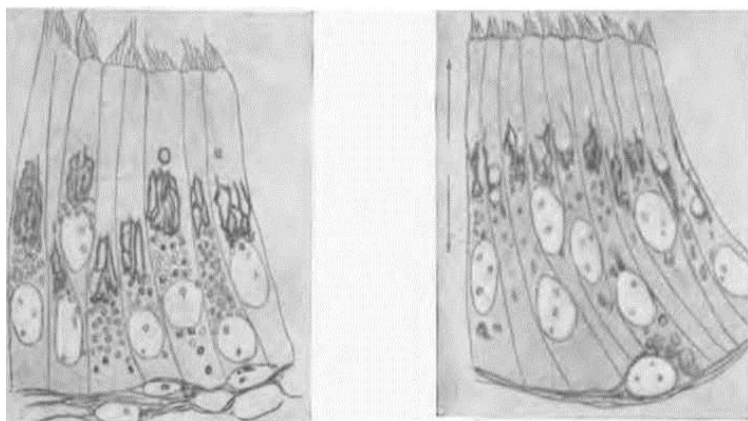
Рис.59. Аппарат Гольджи. Виден сферолит (сферическая диктиосома) в момент разрыва.

Полагают, что аппарат Гольджи имеет отношение к конечному формированию секрета, вырабатываемого в других частях клетки. Ему приписывают роль конденсационной мембраны, где молекулы и макромолекулы веществ собираются в отдельные гранулы. Не исключена его роль в обезвоживании секрета. Существует мнение, что аппарат Гольджи имеет отношение к регуляции водного баланса клетки. Было обнаружено, что морфология АГ меняется в зависимости от стадий клеточной секреции, что послужило основанием Д. Н. Насонову выдвинуть гипотезу о том, что АГ является органоидом, обеспечивающим сепарацию и накопление веществ в самых различных клетках. Аппарат Гольджи способствует выделению секрета.

Задание 1. Рассмотреть фото 60 и 61 из работ Д. Н. Насонова, демонстрирующие работу аппарата Гольджи в клетках начального отдела ductus epididymis (семявыносящий проток) кролика и среднего отдела ductus epididymis морской свинки.

В клетках начального и среднего отделов ductus epididymis секрет накапливается в области расположения диктиосомы аппарата Гольджи. На фото 60 крупные гранулы секрета передвигаются в сторону ядра. На фото 61 видно, что они имеют двойное направление: к апикальному концу передвигаются гранулы более светлые и крупные (прямая секреция - в сторону просвета), к ядру и к базальному концу клетки направляются более плотные и мелкие гранулы (обратная секреция). Д. Н. Насонов

считает, что в первом случае в аппарате Гольджи изменяются вещества, поступающие из соседних тканей, во втором - в нем изменяются вещества, поступающие из просвета. Подвергшиеся обработке те и другие вещества продвигаются к противоположным концам клетки, по-видимому, с помощью диктиосомы аппарата Гольджи.



60

61

Рис. 60,61. Аппарат Гольджи в эпителии среднего отдела ductus epididymis морской свинки (световой микроскоп).

Характерная форма аппарата Гольджи для эпителия ductus epididymis кролика, начальный отдел (световой микроскоп). Видно накопление секрета в области аппарата Гольджи. Крупные капли секрета передвигаются в сторону ядра.

Задание 2. Рассмотреть электронные микрофотографии 57а,58Б,59 на которых показано субмикроскопическое строение аппарата Гольджи. На фотографиях видна система расположенных параллельно плоских мешочков, стенки которых образованы мембранами. Срез профильный. Кнаружи от сплюснутых мешочков лежат более расширенные вакуоли, окруженные мембранами. Они входят в ту же систему аппарата Гольджи. Эти вакуоли становятся более широкими к периферии.

На фото 59 - сферолит в момент разрыва. Видно множество отщепившихся вакуолей.

Рисовать 56,58А, 60, 61 рисунки и 59 фото.

В. Лизосомы

Это органеллы диаметром 0,2-2,0 мкм, окруженные простой мембраной, способные принимать самые разные формы. ... Деградация достигается за счет присутствия в лизосомах около 40 типов различных расщепляющих ферментов гидролаз с оптимумом действия в кислой среде. Главный фермент лизосом-кислая фосфатаза. Этот органоид был открыт в 1955 г. Де Дюв в гомогенате печени крысы.

Под электронным микроскопом лизосомы выглядят как пузырьки, ограниченные мембраной. В них найдено около двенадцати основных ферментов - кислых гидролаз: кислая фосфатаза, кислая рибонуклеаза, кислая дезоксирибонуклеаза, глюкуронидаза и акрилсульфатаза.

Они не активны, пока находятся внутри мембраны. При разрушении мембраны ферменты активируются, выходят в цитоплазму и воздействуют на наиболее важные составные части самой клетки. Роль лизосом в клетке определяется содержащимися в них ферментами. Они участвуют в процессах кислотного гидролиза. Сюда относятся переваривание инородных материалов, проникающих в клетку путем пиноцитоза или фагоцитоза, физиологический автолиз-инволюция, метаморфоз, голокриновая секреция, патологический автолиз, или некроз.

Среди различных по морфологии лизосомных частиц можно выделить четыре типа: первичные лизосомы, вторичные лизосомы, аутофагосомы и остаточные тельца (рис.62, Б). Пестрота морфологии лизосом вызвана тем, что эти частицы участвуют в процессах внутриклеточного переваривания, образуют сложные пищеварительные вакуоли как экзогенного (внеклеточного), так и эндогенного происхождения.

Первичные лизосомы представляет собой мелкие мембранные пузырьки размером около 100 нм, заполненные бесструктурным веществом, содержащим активную кислую фосфатазу,- маркерный для лизосом фермент. Местом его синтеза является гранулярный ретикулум, затем этот фермент появляется в проксимальных участках диктиосомы, а потом-в мелких вакуолях по периферии диктиосомы и, наконец, выявляется в первичных лизосомах (рис.62, Б).

С помощью ряда точных экспериментов установили, что в дальнейшем первичные лизосомы сливаются с пиноцитозными вакуолями, образуя вторичную лизосому или внутриклеточную пищеварительную вакуоль. По своей морфологии такая вакуоль представляет собой лизосому, содержащую компоненты, захваченные в процессе эндоцитоза. Это **вторичная лизосома**. Однако расщепление, переваривание биогенных макромолекул внутри лизосом может идти в



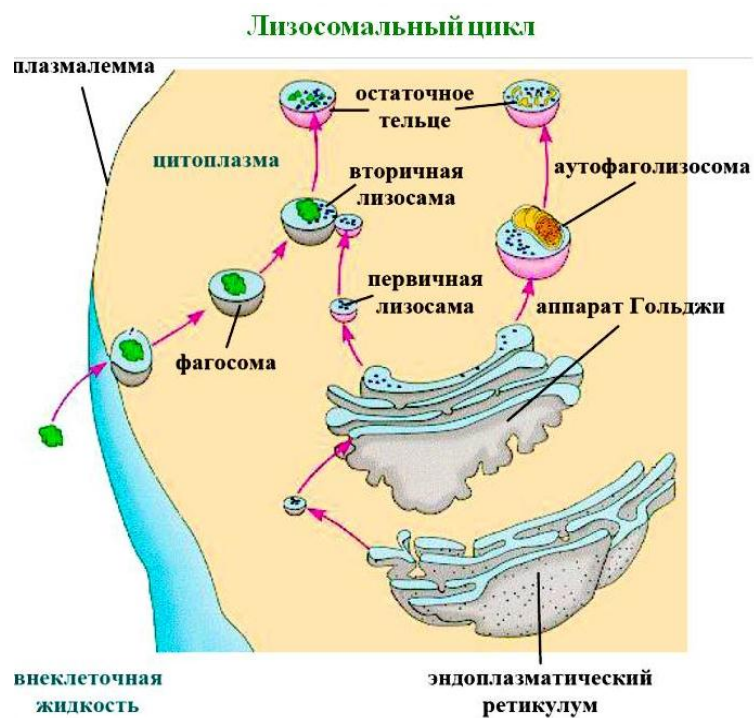
➤ **Строение:**

- Пузырьки овальной формы (снаружи – мембрана, внутри – ферменты)

➤ **Функции:**

- Расщепление органических веществ,
- Разрушение отмерших органоидов клетки,
- Уничтожение отработавших клеток.

А



Б

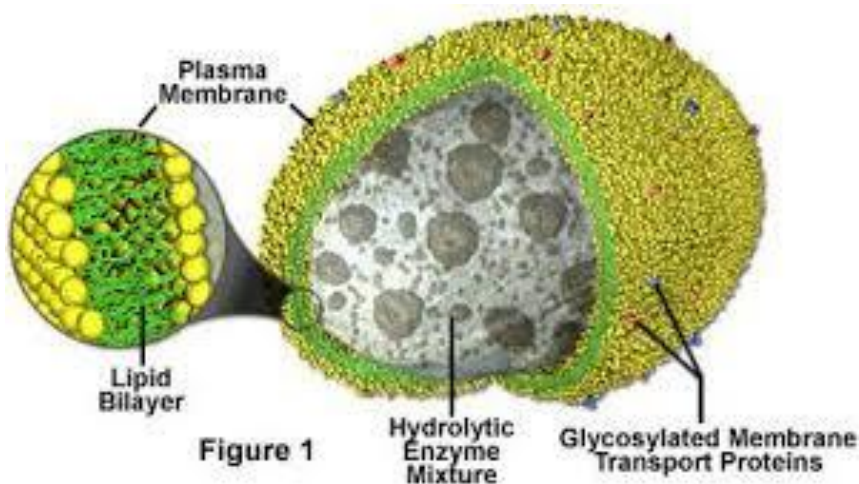
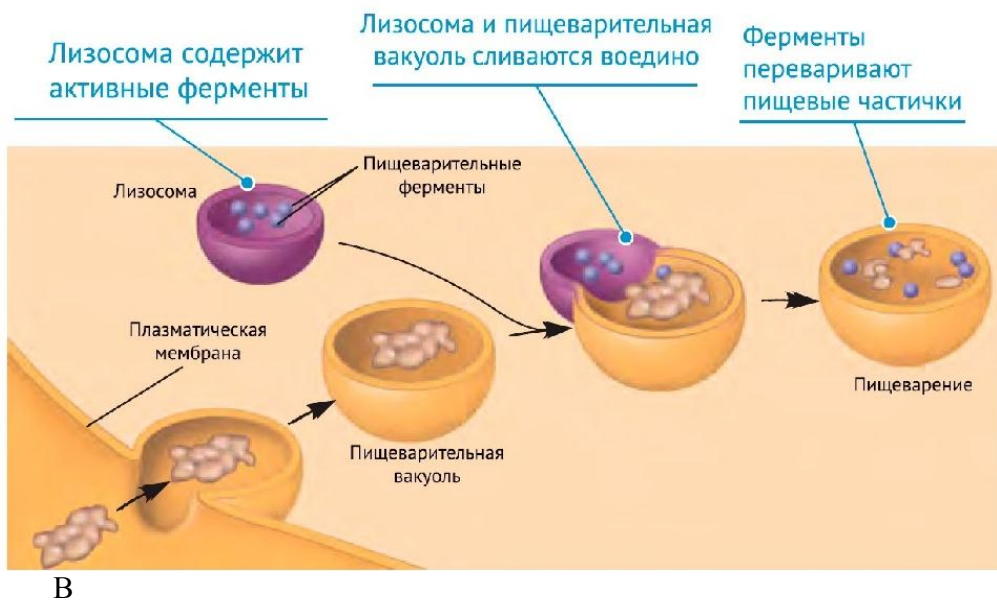


Рис.62. А-строение, функции и формы лизосом; Б-лизосомальный цикл; В, Г-схематическое изображение функции лизосом.

ряде клеток не до конца. В этом случае в полостях лизосом происходит накопление непереваренных продуктов, происходит переход вторичных лизосом в телолизосомы, или **остаточные тельца**. Они выбрасываются из клетки путем экзоцитоза, или остаются до гибели клетки.

Аутолизосомы (аутофагосомы) постоянно встречаются в клетках простейших, растений и животных. По своей морфологии их относят к вторичным лизосомам, но с тем отличием, что в составе этих вакуолей встречаются фрагменты или даже целые цитоплазматические структуры, такие, как митохондрии, пластиды, элементы ЭР, рибосомы, гранулы гликогена и т. д.

Функциональное значение этого процесса еще неясно. Есть предположение, что процесс аутофагоцитоза связан с отбором и уничтожением измененных, «сломанных» клеточных компонентов. В этом случае лизосомы выполняют роль внутриклеточных чистильщика.

Задание 1. Изучить строение и формы лизосом (рис. 62, А).

Лизосомы представлены в виде круглых темных пузырьков, окруженных мембраной. Внутри лизосом можно обнаружить более или менее плотные участки.

Задание 2. Изучить рисунки 62 Б, В, Г, ставить соответствующие обозначения, составить конспект по функциям лизосом. **Пероксисомы, сферосомы и вакуоли растительных клеток.**

Г. Пероксисомы

Это небольшие вакуоли (0,3-1,5 мкм), одетые одинарной мембраной(рис.73). Они обнаружены у простейших, у низших грибов, у высших растений в некоторых эмбриональных тканях (эндосперм) и в зеленых частях, способных к фото респирации, у высших позвоночных животных они обнаруживаются главным образом в печени и почках. В печени крыс на клетку число пероксисом колеблется от 70 до 100.

Пероксисомы бывают тесно связаны с мембранами ЭР и, вероятно, образуются из расширенных концов цистерн ЭР, которые заполняются плотным материалом. У зеленых растений пероксисомы часто находятся в тесном контакте с митохондриями и пластидами.

Впервые пероксисомы были выделены из печени и почек. Во фракциях пероксисом обнаруживаются ферменты, связанные с метаболизмом перокси водорода. Это ферменты (оксидазы, уратоксидаза, оксидаза d-окислительного дезаминирования аминокислот, при работе которых образуется H_2O_2 и каталаза, разрушающая ее. В пероксисомах печени каталаза составляет до 40% всех белков и локализована в матриксе. Так как перекис водорода является токсическим веществом для клеток, то каталаза пероксисом может играть важную защитную роль. Пароксизмы цыплят и лягушек кроме уратоксидаза содержат ряд ферментов катаболизма пуринов.

У животных и некоторых растений пероксисомы играют важную роль при превращении жиров в углеводы.

Пероксисомы (микротельца) - органеллы, обладающие ферментативной системой образования и утилизации пероксида водорода, глиоксилата и других реакционноспособных соединений, они регулируют окислительно-восстановительное равновесие внутри клетки и концентрацию активных форм кислорода. Различные типы пероксисом

участвуют в окислении жирных кислот, фотодыхании, деградации пуринов.

Заключение. Пероксисомы находятся на перекрестках метаболических путей, замыкая биохимические циклы, функционирующие между компартментами. Осуществляя реакции, сопровождающиеся снижением свободной энергии, пероксисомы связывают окислительный метаболизм с конструктивным и генерируют пути синтеза разнообразных соединений. Специализация микротелец определяется переносом в них ферментных систем, на более ранних этапах эволюции, функционировавших только в других клеточных компартментах, благодаря чему эти органеллы осуществляют разнообразные функции в разных органах и на различных стадиях онтогенеза. У растений основными функциями пероксисом являются осуществление процесса фотодыхания в фотосинтезирующих тканях, мобилизация запасных жиров в прорастающих семенах, окисление пуринов в клубеньках бобовых. Пероксисомы регулируют окислительно-восстановительное равновесие и концентрацию активных форм кислорода в клетке.

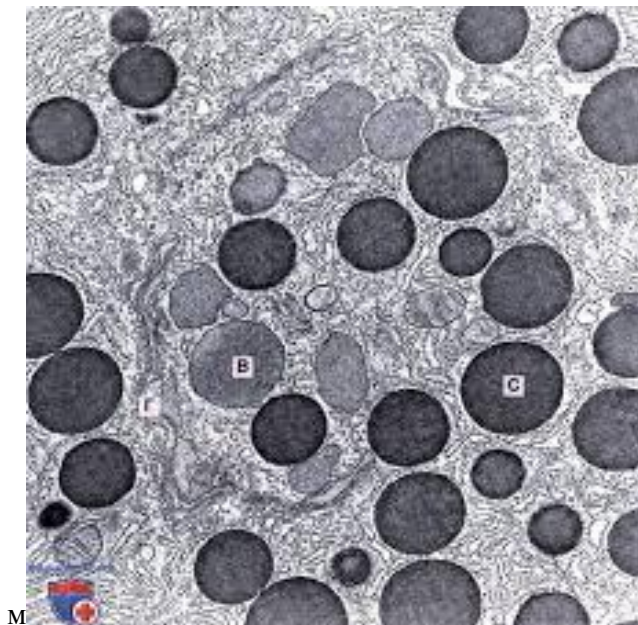


Рис. 73. Пероксисомы

Д. Сферосомы

Сферосомы (микросомы) были впервые обнаружены в 1880 г. Ганштейном. Они, как свидетельствует само название, представляют собой шаровидные тельца (рис.74). На препаратах, фиксированных осмием, сферосомы имеют размеры 0,55—0,9 мкм, они хорошо окрашиваются

кристаллвиолетом в пурпуровый цвет, в то время как митохондрии и пластиды этим же препаратом в бледно-сиреневый. В отличие от митохондрий сферосомы не окрашиваются янусом зеленым. Поскольку показатель преломления света у этих органелл выше, чем у цитоплазмы, они хорошо просматриваются под световым микроскопом. При темнопольной микроскопии сферосомы представляются в виде блестящих гранул, а при фазово-контрастной они кажутся черными. При извлечении из них липидов сохраняется остов, окрашивающийся пиронином, что указывает на существование белковой стромы у сферосом. Полагают, что высокая способность сферосом к преломлению света обусловлена содержанием в них ароматических аминокислот (тирозина и др.). Сферосомы морфологически почти не отличаются от капель масла и других липидов. Были проведены специальные сравнительные исследования с использованием электронной микроскопии клеток эпидермиса чешуй лука (*Allium sera*), колеоризы кукурузы (*Zea mays*) и запасающих тканей семян сурепицы белой (*Sinapis alba*) и рапса (*Brassica napus*). Они показали, что размеры жировых включений и сферосом почти одинаковы. Только при фиксации сферосом четырехокисью осмия или перманганатом калия была обнаружена тонкая зернистость, отсутствующая в оптически пустых каплях масла (рис. 19). Зернистая структура этих органелл обусловлена наличием в них белковой стромы, характеризующейся определенным сродством к некоторым красителям. Сферосомы формируются системой эндоплазматической сети. На конце цистерны ЭР начинает накапливаться осмиофильный материал, затем от этого участка отшнуровывается и начинает расти мелкий пузырек, достигающий диаметра 100-150 нм. Это «просферосома», окруженная одинарной мембраной. Рост сферосом и перестройка их содержимого связаны с накоплением в них масла, так что сферосома постепенно превращается в масляную каплю. Кроме жиров в составе сферосом обнаруживают белки и среди них фермент липазу, встречающуюся во всех изученных сферосомах. Поскольку сферосомы синтезируют жиры, они должны содержать необходимые для этого ферменты. В сферосомах чешуй лукович *Allium* была обнаружена кислая фосфатаза. При этом оказалось, что из всех компонентов эпидермальных клеток *Allium* лишь одни сферосомы способны расщеплять глицерофосфат, освобождая фосфорную кислоту, чего никогда не наблюдается в митохондриях или •пластидах.

Олеосомы (сферосомы)

- Имеются только у растений
- Содержат жиры
- Их особенно много в семенах масличных растений

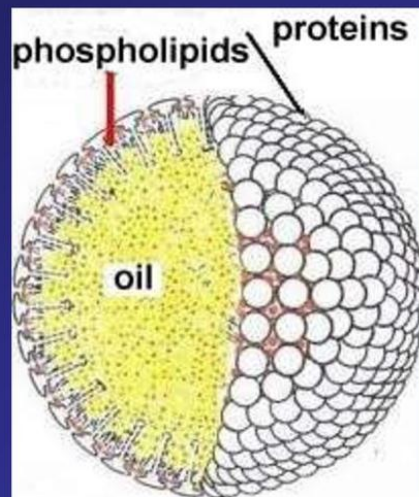


Рис. 74. Сферосомы.

Е. Вакуоли растительных клеток

Клетки как низших, так и высших растительных организмов содержат в цитоплазме вакуоли, несущие ряд важных физиологических нагрузок. У молодых клеток может быть несколько мелких вакуолей, которые по мере роста и дифференцировки клетки сливаются друг с другом и образуют одну или несколько крупных вакуолей, занимающих до 80% объема всей клетки. Центральные вакуоли отделены от цитоплазмы одинарной мембраной, сходной по толщине с плазмолеммой. Мембрана, ограничивающая центральные вакуоли, носит название **тонопласта**. Возникают центральные вакуоли из мелких пузырьков, отщепившихся от эндоплазматической сети и в конце концов образуют одну или несколько крупных вакуолей, оттесняющих цитоплазму с ядром и органоидами к периферии клетки. Полость вакуоли заполнена так называемым **клеточным соком**, представляющим собой водный раствор, в который входят различные неорганические соли, сахара, органические кислоты и их соли и другие низкомолекулярные соединения, а также некоторые высокомолекулярные вещества (рис.75)

Вакуоли растительных клеток выполняют многообразные и важные функции. Одной из главных ее функций является поддержание тургорного давления клеток. Вода путем осмоса через ее мембрану поступает в вакуоль, клеточный сок которой является более концентрированным, чем цитоплазма, и оказывает давление на

цитоплазму, а, следовательно, и на оболочку клетки. В результате в клетке развивается тургорное давление, определяющее растяжение клеток во время их роста. Через вакуоль, как и через плазматическую мембрану, активный транспорт различных молекул. Поэтому вакуоли могут использоваться клетками как накопительные резервуары не только для отложения запасных веществ, но и для выброса метаболитов, для экскреции.

Другой обширный ряд функций вакуолей связан с накоплением запасных веществ, таких, как сахара и белки. В вакуолях происходит запасание белков, что характерно для семян. Это происходит в алейроновых вакуолях, которые заполняются альбуминами и глобулинами, после чего вакуоли обезвоживаются, превращаясь в твердые алейроновые зерна. При прорастании семян здесь происходит переваривание запасных белков.

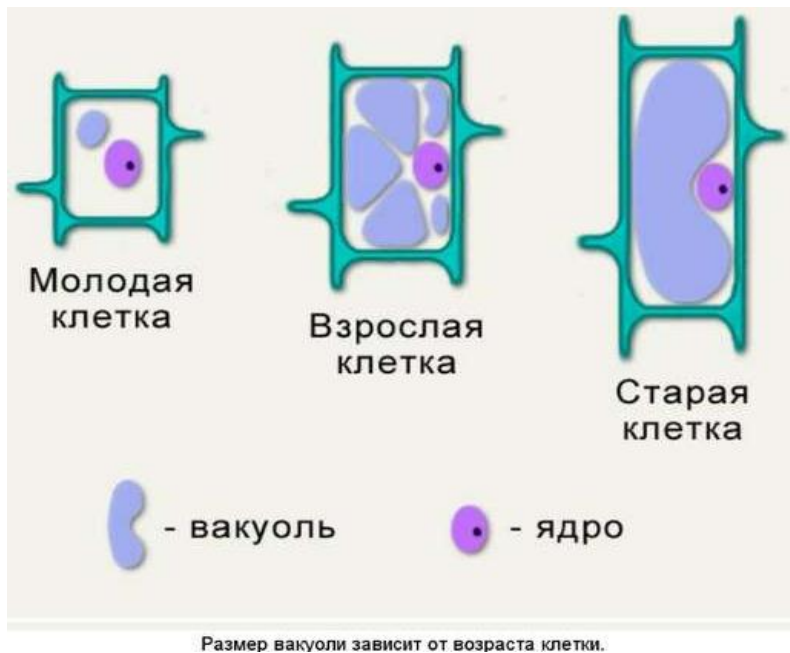


Рис.75. Вакуоли растительных клеток

II. Двумембранные органоиды.

А. Пластиды.

Пластиды являются основными цитоплазматическими органеллами клеток автотрофных **растений**. Название происходит от греческого слова «plastos», что в переводе означает «вылепленный». Главная функция пластид – синтез органических веществ, благодаря наличию собственных ДНК и РНК и структур белкового синтеза. В пластидах также содержатся пигменты, обуславливающие их цвет. Все виды данных органелл имеют сложное внутреннее строение. Снаружи пластиду покрывают две элементарные мембраны, имеется система внутренних мембран, погруженных в строму или матрикс.

Классификация пластид по окраске и выполняемой функции подразумевает деление этих органоидов на три типа: **хлоропласты, лейкопласты и хромопласты**. Пластиды водорослей именуется **хроматофорами**.

Хлоропласты

Это зеленые пластиды высших растений, содержащие хлорофилл – фотосинтезирующий пигмент. Представляют собой тельца округлой формы размерами от 4 до 10 мкм. Химический состав хлоропласта: примерно 50% белка, 35% жиров, 7% пигментов, малое количество ДНК и РНК. У представителей разных групп растений комплекс пигментов, определяющих окраску и принимающих участие в фотосинтезе, отличается. Это подтипы хлорофилла и каротиноиды (ксантофилл и каротин).

При рассматривании под световым микроскопом видна зернистая структура пластид – это **граны**. Под электронным микроскопом наблюдаются небольшие прозрачные уплощенные мешочки (цистерны, или граны), образованные белково-липидной мембраной и располагающиеся непосредственно в строме. Причем некоторые из них сгруппированы в пачки, похожие на столбики монет (тилакоиды-гран), другие, более крупные находятся между тилакоидами (рис.76). Благодаря такому строению, увеличивается активная синтезирующая поверхность липидно-белково-пигментного комплекса гран, в котором на свету происходит фотосинтез (рис. 77: А, Б).

Задание 1. Рассмотреть и изучить препараты, электронно-микроскопические и схематические рисунки строения пластид.

На фото (рис. 76) видно, что пластиды имеют многочисленные граны и сложные ламеллы. На 77:А,Б схематических рисунках кроме этих структур

хорошо изображены внутренняя и наружная мембраны, расположение тилакоидов, нуклеиновых кислот и рибосомы в строме.

Задание 2. На схематических рисунках 64, 65, 66 изображены строение хромопластов, хлоропластов и лейкопластов. По рисункам установите сходство и различия их.

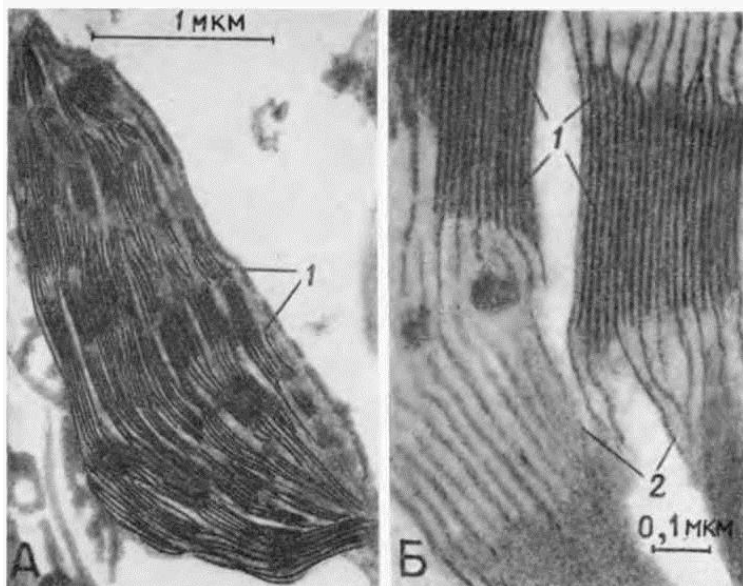
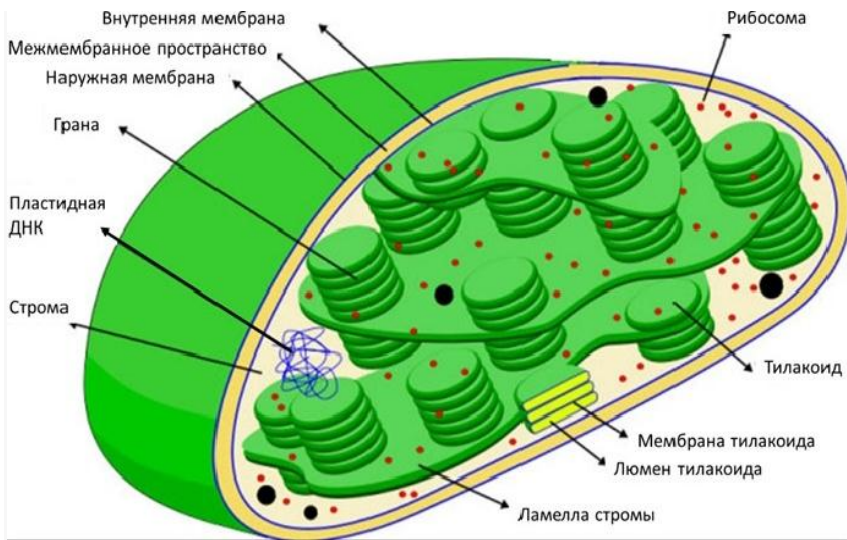


Рис.76. Срез через хлоропласт мезофилла кукурузы. *А*- хлоропласт виден целиком, имеет многочисленные граны (X30 000); *Б*-часть хлоропласта при большом увеличении (X105 000): 1-граны; 2- сложная ламелла.

Задание 3. По 67-му рисунку изучите взаимопревращение различных видов пластид.



А

Рис.77, А. Схематическое строение хлоропласта.

Хлоропласт, как и все пластиды – двумембранная органелла клетки. Наружная мембрана – исходно эукариотическая, по составу похожа на

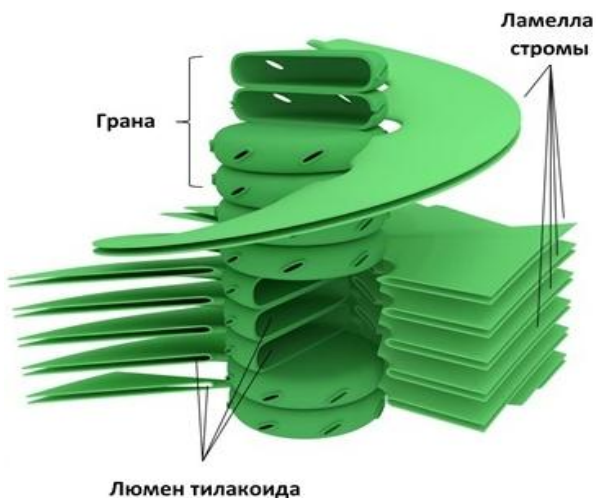


Рис.77, Б. Схематическое строение грана хлоропласта.

мембраны эндоплазматического ретикулума, она высоко проницаема для многих органических соединений и низкомолекулярных пептидов. В наружной мембране содержится большое количество рецепторов и транслокаторов, за счет которых осуществляется обмен с внешней средой. Внутренняя мембрана, о которой речь будет идти и далее, обладает высокой избирательностью проницаемости, контролирует транспорт, является основным барьером,

разделяющим внутреннее содержимое пластиды от цитоплазмы и разграничивающим различные **компартменты** самого хлоропласта. Внутренняя мембрана образует обширную мембранную сеть внутри хлоропласта, образуя тилакоиды (небольшие мембранные пузырьки), часто собранные в стопки или граны и крупные свободные ламеллы стромы. Внутреннее пространство тилакоида и ламеллы называется **люменом** (рис.77, Б).

Хромопласты

Это пластиды, окраска которых бывает желтого, оранжевого или красного цвета, что обусловлено накоплением в них каротиноидов. Благодаря наличию хромопластов, характерную окраску имеют осенние листья, лепестки цветов, созревшие плоды (помидоры, яблоки). Данные органоиды могут различной формы – округлой, многоугольной, иногда игольчатой(рис.78).

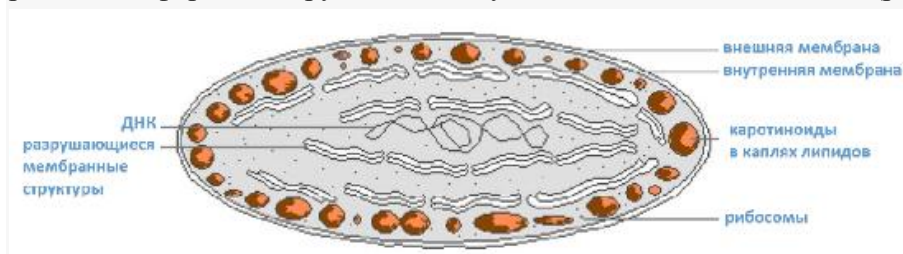


Рис.78. Строение хромопласта.

Лейкопласты

Представляют собой бесцветные пластиды, основная функция которых обычно запасная. Размеры этих органелл относительно небольшие. Они округлой либо слегка продолговатой формы, характерны для всех живых клеток растений. В лейкопластах осуществляется синтез из простых соединений более сложных – крахмала, жиров, белков, которые сохраняются про запас в клубнях, корнях, семенах, плодах. Под электронным микроскопом заметно, что каждый лейкопласт покрыт двухслойной мембраной, в строме есть только один или небольшое число выростов мембраны, основное пространство заполнено органическими веществами(рис.79). В зависимости от того, какие вещества накапливаются в строме, лейкопласты делят на амилопласты, протеинопласты и элеопласты.

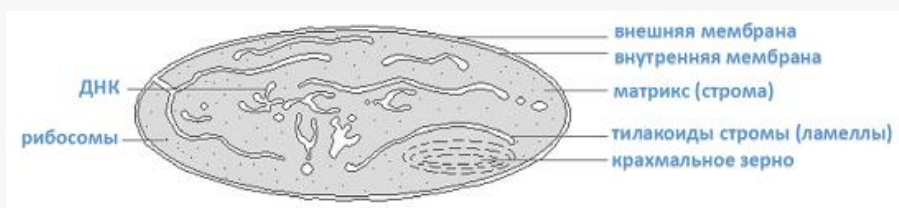


Рис.79. Строение лейкопласта.

Все виды пластид имеют общее происхождение и способны переходить из одного вида в другой. Так, превращение лейкопластов в хлоропласты наблюдается при позеленении картофельных клубней на свету, а в осенний период в хлоропластах зеленых листьев разрушается хлорофилл, и они трансформируются в хромопласты, что проявляется пожелтением листьев. В каждой определенной клетке растения может быть только один вид пластид. В высших растениях может быть большое разнообразие различных пластид, но в одной клетке только один тип. При этом многие типы пластид могут обратимо друг в друга превращаться (рис.80).

Взаимопревращения пластид

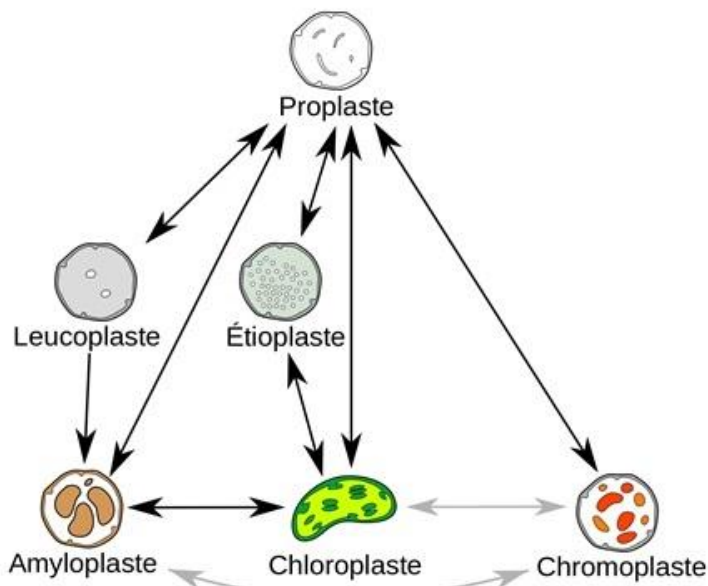


Рис.80. Взаимопревращения пластид.

Б. Митохондрии

Митохондрии на обычных цитологических препаратах выглядят как короткие палочки, гранулы (термин «**Митохондрия**» ввел 1897 г. Бенда). Их размеры варьируют от 0,5 до 1 мкм, длина может достигать до 7 мкм. В зависимости от функционального состояния они могут быть очень тонкими (0,2 мкм) и очень толстыми (до 2 мкм). Распределение митохондрий в клетке связано с их функцией как источника энергии. В некоторых клетках они

свободно перемещаются в клетке, в других имеют постоянную ориентацию. Обычно они сосредоточиваются в тех участках клетки, где протекают активные процессы, нуждающиеся в энергии. Количество митохондрий в клетках и внутренняя организация связаны с их физиологической активностью.

Задание 1. Рассмотреть и изучить препараты. Обратит внимание на количество митохондрий в изучаемых клетках в связи с активностью клеточных процессов.

Митохондрии в клетках кишечного эпителия крысы(рис.81).

Продольный срез проходит через кишечную ворсинку. Ядро слегка сдвинуто к базальному концу клетки. Митохондрии в форме маленьких палочек, гранул располагаются у апикального конца между ядром и периферией клетки. Их меньше у основания клетки. Через апикальный конец клетки происходит всасывание веществ из кишечной полости. Известно, что на процессы всасывания затрачивается энергия. Она идет на отрыв пиноцитозных пузырьков. Именно около всасывающей поверхности клетки видно большое скопление митохондрий - поставщиков энергии.

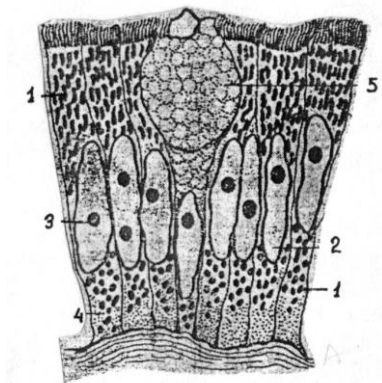


Рис. 81. Митохондрии в клетках кишечного эпителия крысы.1- палочковидные митохондрии; 2-ядро; 3-ядрышка; 4- всасывающая клетка; 5-бокаловидная железистая клетка.



Рис. 82. Продольный срез электронно-микроскопического строения митохондрии. 1-внешняя мембрана; 2-внутренняя мембрана; 3-кристы; 4-матрикс; 5-межмембранное пространство; 6-рибосома.

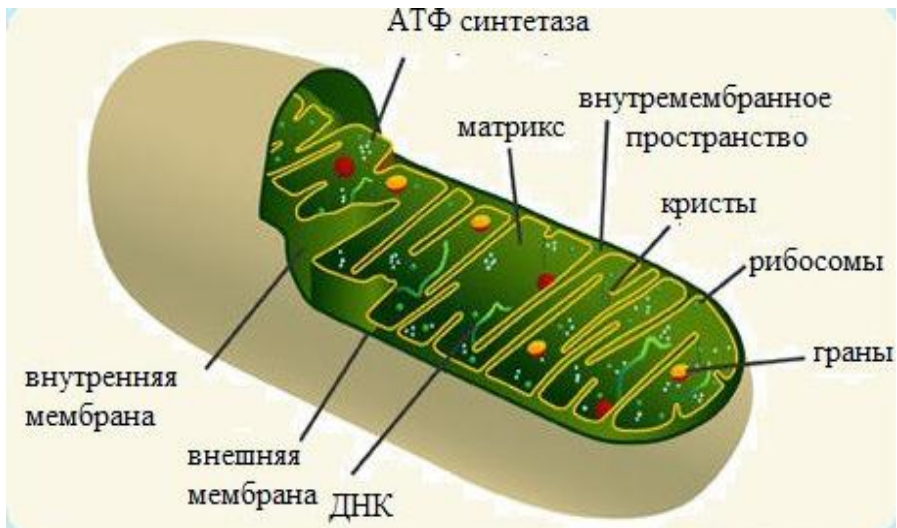


Рис.83. Схематическое строение митохондрии.

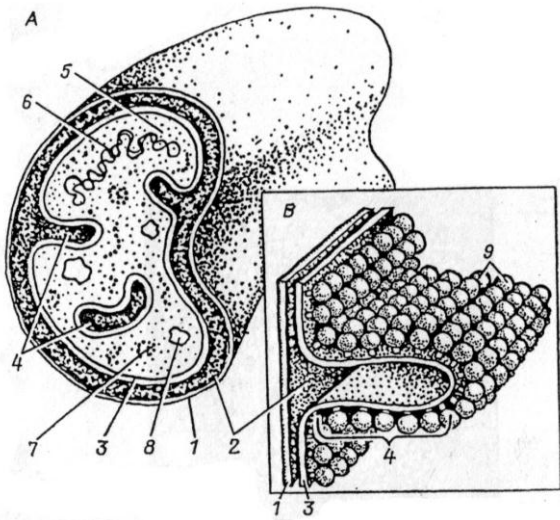


Рис. 84. Схема ультраструктуры митохондрии. А-поперечный разрез митохондрии; В-крист с многочисленными грибовидными тельцами. 1-внешняя мембрана; 2-межмембранное пространство; 3-внутренняя мембрана; 4-кристы; 5-матрикс; 6-ДНК; 7-рибосомы; 8-конкреция фосфата кальция; 9-грибовидное тело.

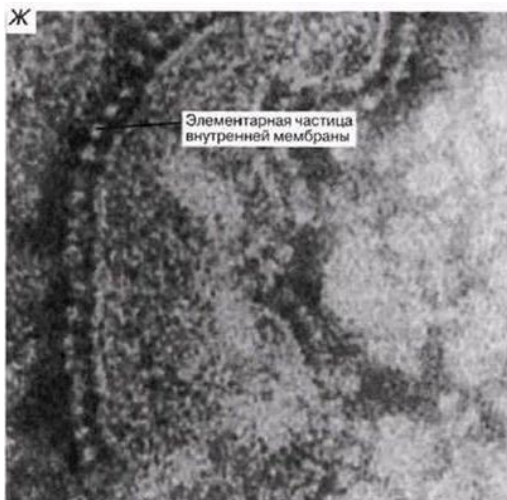


Рис.85. Строение митохондрий: ж-субмитохондриальные частицы (грибовидные тельца) при негативном контрастировании; м-мембраны; стрелка указывает на сферические частички («элементарная частица внутренней мембраны»).

При изучении субмитохондриальных частиц методом негативного контраста в электронном микроскопе было обнаружено, что вся внешняя поверхность этих пузырьков сплошь покрыта мелкими сферическими частицами, имеющими как бы головку (диаметром 8-9 нм) и ножку («грибовидные тельца»), расположенных на расстоянии 10 нм друг от друга. Сферические частицы представляют собой АТФазу (или АТФ-синтетазу), участвующую в сопряжении окисления и фосфорилирования.

Задание 2. Рассмотреть электронные микрофотографии, демонстрирующие субмикроскопическое строение митохондрий.

На фото 82-срез через митохондрию. Она окружена двойной мембраной. Между двумя мембранами остается свободное пространство. Внутренняя мембрана образует кристы - складки, которые вдаются глубоко в матрикс митохондрий. Вещества матрикса могут свободно передвигаться по митохондрии вдоль крист. Внутренняя часть кристы светлая и переходит в свободное пространство между двумя мембранами. Рисовать 83,84 рисунки и указать детали строения.

III. Не мембранные компоненты клетки.

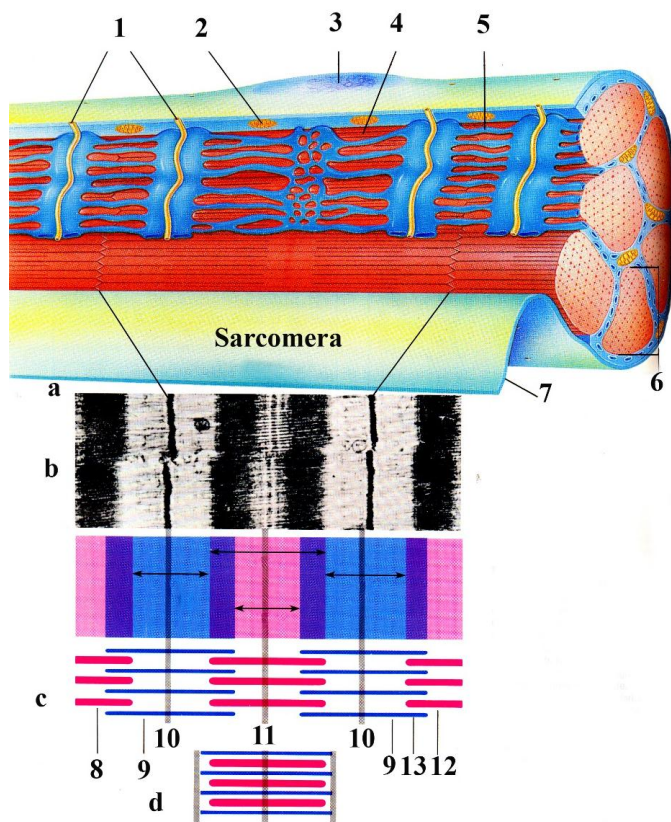
Опорно-двигательная система.

К не мембранным компонентам относятся миофибриллы, микрофиламенты, промежуточные филаменты, микротрубочки, центриоли, базальные тельца, реснички и жгутики.

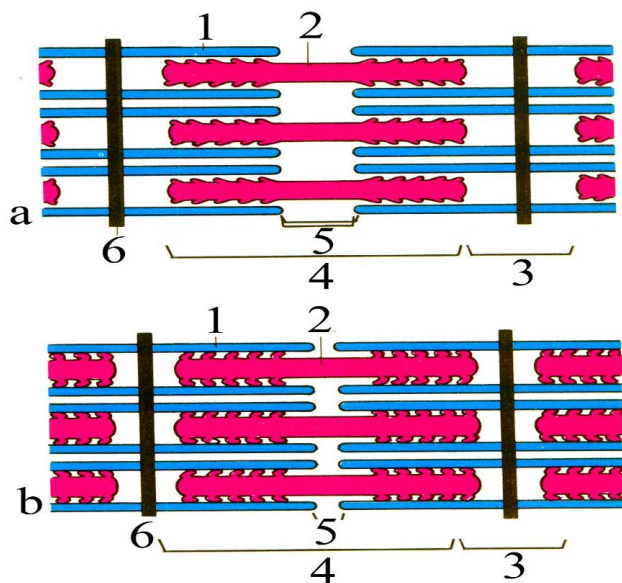
А. Строение мышечных фибрилл.

В мышечных клетках животных организмов имеют в цитоплазме сократимые фибриллы, миофибриллы. В скелетной и сердечной мускулатуре миофибриллы имеют характерную особенность-они выглядят исчерченными или поперечнополосатыми. В световой микроскоп видно, что пучки миофибрилл окрашиваются неравномерно: через равные промежутки длины в них видно чередование темных и светлых участков. Темные участки называются **анизотропными** дисками (А-диски), а светлые-**изотропными**(I-диски). Светлый I-диск пересекается **полоской Z**. Таким образом, миофибрилла представляет собой нить с чередующимися участками: А+0,5 I+Z+0,5 I+A+0,5 I+Z+...и т. д. Оказалось, что единицей строения и функционирования является **саркомер-участок между двумя Z-дисками**. Если рассматривать строение саркомера более подробно, то видно, что вдоль его располагаются три участка протофибрилл: тонкие, связанные с Z-диском, затем толстые и снова тонкие, связанные со следующим Z-диском (рис. 86). В зоне А-дисков кроме толстых фибрилл располагаются концы тонких, идущих от двух Z-дисков.

Задание. Изучить строение мышечных фибрилл. Нарисовать схему строения миофибрилл(рис.86,87).



86-рис.Строение мышечной волокон: а-схематическое; б-электронно - микроскопическое фото; с-схематическое строение саркомеры. 1-Т-трубочка; 2-митохондрия; 3-ядро; 4-саркоплазма; 5-саркоплазматическая сеть; 6-миофибриллы; 7-сарколемма; 8-миозин; 9-актин; 10-Z полоска; 11-М полоска; 12-толстый филамент; 13-тонкий филамент.



87-рис. Сокращение мышца: а-ослаблённая саркомера; б-сокращённая саркомера; 1-актин; 2-миозин; 3-И диск; 4-А диск; 5-Х зона; 6-Z полоска.

Была выяснена химическая природа всех компонентов миофибрилл. Оказалось, что тонкие нити состоят в основном из белка актина, а толстые- из белка миозина. Z-диски имеют в своем составе белок а-актинин и десмин. В тонких нитях кроме актина находятся белки тропомиозин и тропонин. Актиновые фибриллы состоят из двух спиралей, обвивающих друг друга. На рис. 87 дается схема сокращения за счет взаимного скольжения нитей.

Б. Микрофиламенты

Микрофиламенты представляют собой тонкие (7 нм) белковые нити, встречающиеся в различных участках клеток. Они встречаются в самых различных клетках как животных, так и растений. Особенно их много в кортикальном слое цитоплазмы, в псевдоподиях подвижных клеток, где они образуют густую сеть пересекающихся в разных направлениях тонких нитей. Часто пучки микрофиламентов обнаруживаются в микроворсинках, особенно они хорошо выражены в микроворсинках щеточной каемки клеток кишечного эпителия удалось показать, что микрофиламенты содержат **актин** и другие белки (рис.88).

Задание 1. Изучить (рисунки 88-89) и рисовать строение микрофиламентов (рис. 88 Б.), формировании микрофиламентов (рис.89).

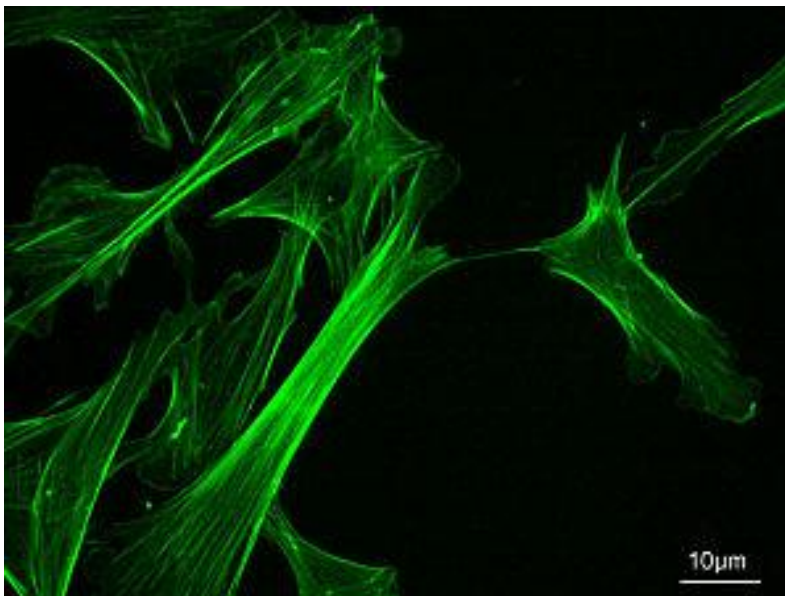


Рис.88 (А). Микрофиламенты (Люминисцентная микроскопия).

Электронная микрофотография актиновых нитей

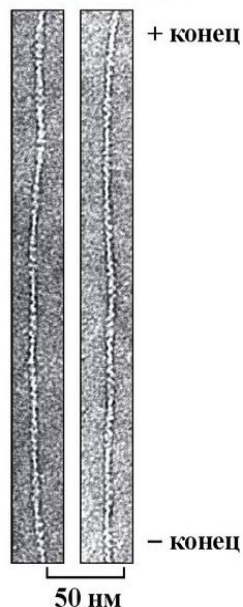


Схема организации актиновых нитей

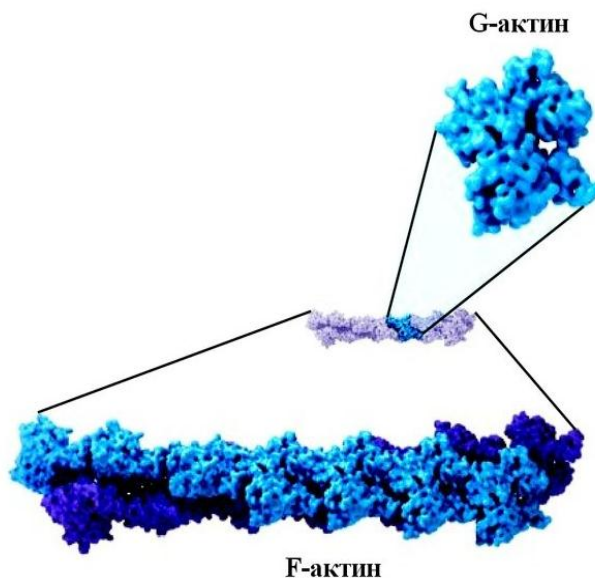
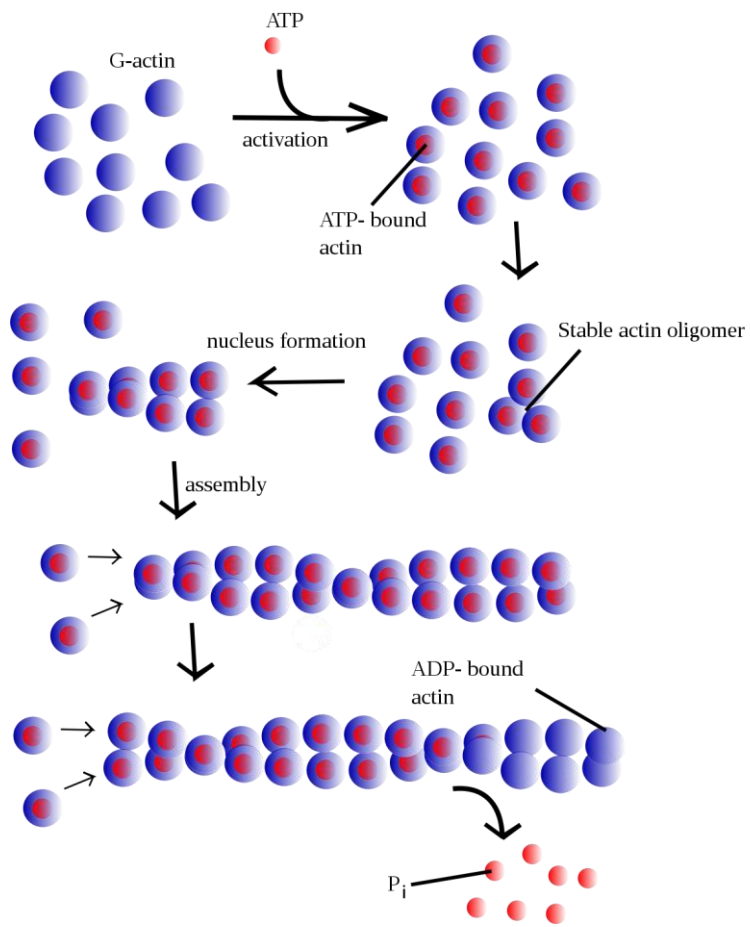


Рис.88(Б). Микрофиламенты: 1-электронная микрофотография актиновых нитей; 2-схема организации актиновых нитей.

Актин глобулярный белок, из которого образованы микрофиламенты один - из основных компонентов цитоскелета эукариотических клеток. Актин состоит из 376 аминокислотных остатков, с молекулярной массой около 42-kDa диаметром 4-9нм. Имеет 2 формы: мономерную G-актин и полимеризованную форму (F-актин). Вместе с белком миозином образует основные сократительные элементы мышц - актомиозиновые комплексы саркомеров. Присутствует в основном в цитоплазме, но в небольшом количестве также найден в ядре клетки.

В фибробластах и многих других объектах обнаружен миозин. Тропомиозин, один из белков актомиозинового комплекса мышц, также найден в составе пучков микрофиламентов. Роль пучков микрофиламентов, по-видимому, заключается в создании мощных сократимых структур, которые могут участвовать как в передвижении тела клетки, так и в движениях ее отдельных компонентов.



Примечание [U1]:

89. Формирование микрофиламентов



Рис.80. Фибробласты. В поляризованных фибробластах актиновые микрофиламенты обнаруживаются в ламеллоплазме.

В. Промежуточные филаменты.

Промежуточные филаменты, или микрофибриллы, имеют толщину около 10 нм, поэтому их еще называют 10-нм (или 100А) филаментами. Они обычно собраны в пучки, располагающиеся главным образом по периферии клетки, но выявлены также и в центральных участках клетки вокруг ядра. По химической природе-они белки. В эпителиальных клетках представлены белками кератанами (тонофиламенты), в мезенхимальных клетках-виментином, в мышечных- десмином, в нервных клетках-это белки нейтрофибрилл(рис.81).

Схема строения и организации промежуточных филаментов

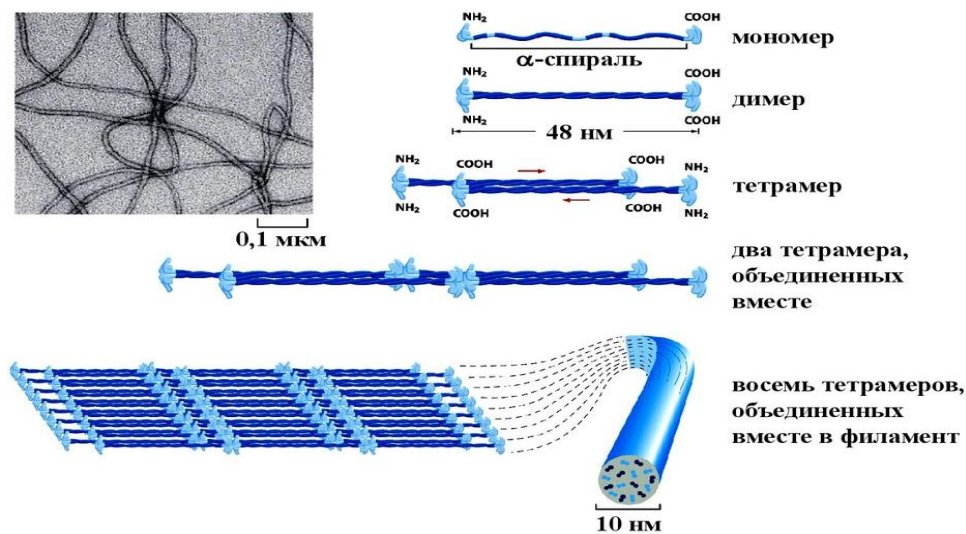


Рис.81. Промежуточные филаменты. Система промежуточных филаментов также динамично-подвижна, как и микрофиламенты и микротрубочки.

Задание 1. Изучить строение промежуточных филаментов с фотографии и схематических рисунков (рис.81).

Г. Микротрубочки. В химическом отношении микротрубочки состоят из белков, характерных для микротрубочек,-тубулинов. Они образуют димеры, которые представляют собой субъединицы, образующие стенки микротрубочек.

Стенка микротрубочек построена за счет плотно уложенных округлых субъединиц величиной около 5 нм. В электронном микроскопе на поперечных сечениях микротрубочек видны большей частью 13 субъединиц, выстроенных в виде однослойного кольца. Микротрубочки могут находиться в цитоплазме, не организуясь в специализированные структуры; они могут образовывать временные сложные скопления, например, веретено деления животных и растительных клеток. Они входят в состав сложно организованных специальных органоидов, таких, как центриоли и базальные тельца. Микротрубочки-это основные структурные единицы в строении ресничек и

жгутиков. Микротрубочки обладают достаточно четкой морфологией и поэтому легко отличимы от других клеточных компонентов. Они встречаются в цитоплазме всех эукариотических клеток и отсутствуют у бактерий и других прокариотических клеток.

Микротрубочки представляют собой прямые, не ветвящиеся, длинные полые цилиндры. Их внешний диаметр составляет 24 ± 2 нм, внутренний просвет имеет ширину около 15 нм, а толщина стенки около 5 нм.

Задание 2. Изучить рис. 46,82-84 и фото, нарисовать схематическое строение микротрубочки (82 А,83).

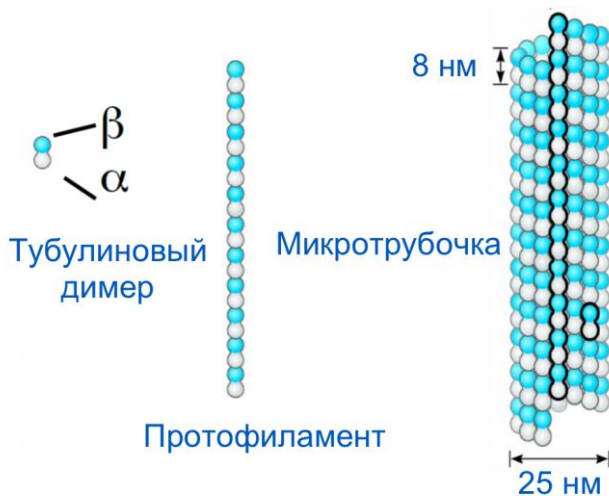
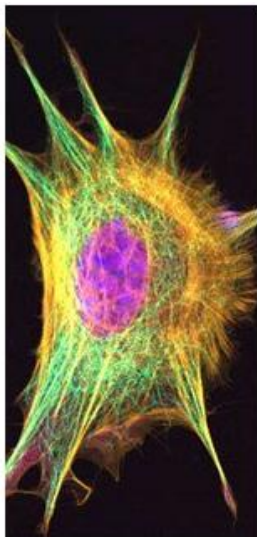


Рис. 82 (А). Строение микротрубочек



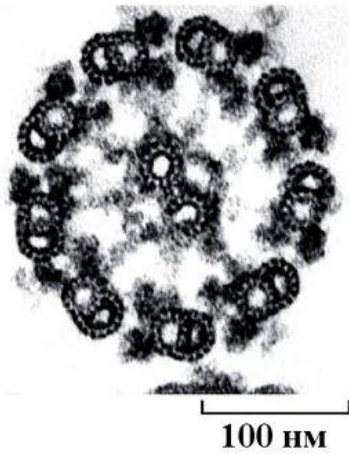
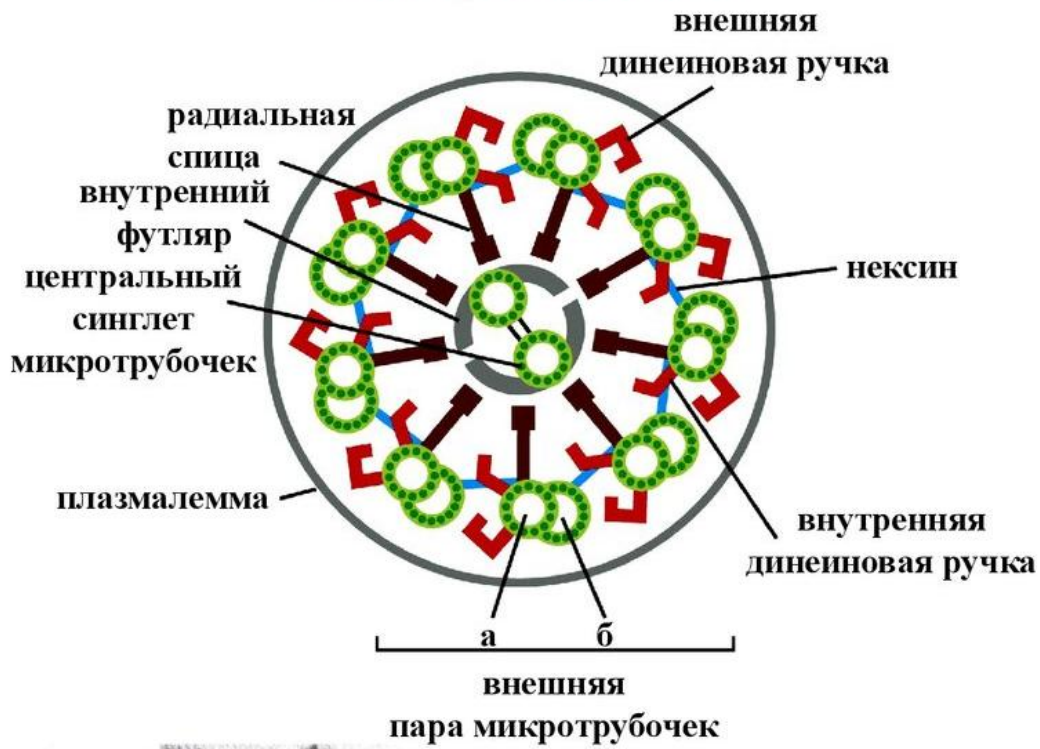
Микротрубочки обозначены зеленым цветом

- Полые цилиндрические структуры
- Образуют цитоскелет клетки, веретено деления, центриоли, жгутики и реснички

Рис. 82 (Б). Микротрубочки (Люминисцентное фото).

Микротрубочки как компонент жгутика

Схема строения аксонемы



Электронная микрофотография

Рис.83.Строение жгутика.

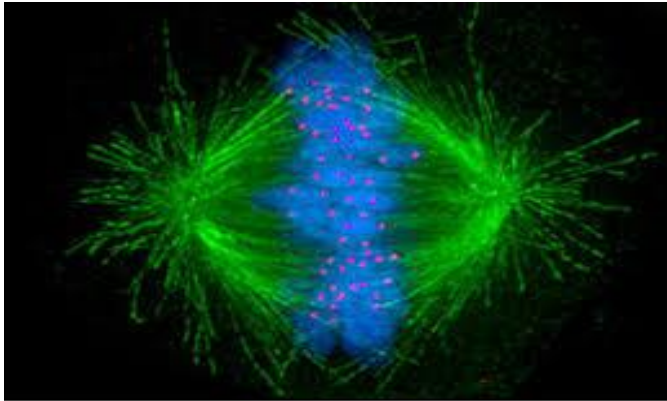


Рис.84. Микротрубочки веретена деления (микротрубочки-зеленого цвета-люминисцентное фото).

Д. Центриоли

Центриоли были обнаружены и описаны Флемминг(1875), Бенеден(1876) ом. Это очень мелкие тельца, в некоторых объектах удавалось видеть, что мелкие плотные тельца (центриоли), обычно в паре (диплосома), окружены зоной более светлой цитоплазмы, от которой отходят радиально тонкие фибриллы (центросфера) (рис.84).

Совокупность центриолей и центросферы носит название **клеточного центра**.

Центриоли характерны и обязательны для клеток животных, их нет у высших растений, у низших грибов и некоторых простейших. Центриоли в делящихся клетках принимают участие в формировании веретена деления и располагаются на его полюсах. В неделящихся клетках центриоли определяют полярность клеток.

Тонкое строение центриолей удалось изучить только с помощью электронного микроскопа. Основу строения центриолей составляют расположенные по окружности девять триплетов микротрубочек, образующих таким образом полый цилиндр (рис.85.86).

Первая микротрубочка триплета (А-микротрубочка) имеет диаметр около 25 нм и толщину стенки 5 нм, которая состоит из 13 глобулярных субъединиц. Длина каждого триплета равна длине центриоли. Вторая и третья (В и С) микротрубочки отличаются от А-микротрубочки тем, что они являются неполными, содержат 11 субъединиц и вплотную примыкают к своим соседям. Кроме микротрубочек в состав центриоли входит ряд дополнительных структур. От А-микротрубочки отходят так называемые «ручки», выросты, один из которых (внешний) направлен к С-микротрубочке соседнего триплета, а другой (внутренний)-к центру цилиндра. Систему микротрубочек центриоли обычно описывают формулой $9+0$, или $(9 \times 3) + 0$, подчеркивая отсутствие микротрубочек в ее центральной части.

Обычно в интерфазных клетках всегда присутствуют две центриоли, располагающиеся рядом друг с другом, образуя **дуплет** центриолей, или

диплосому. В диплосоме центриоли располагаются под прямым углом по отношению друг к другу. Из двух центриолей различают «материнскую» и «дочернюю», продольная ось последней перпендикулярна продольной оси материнской центриоли (Рис. 85).

При исследовании в электронном микроскопе было найдено, что лучистое сияние центросферы, обнаруживаемое в световой микроскоп, представляет собой большое количество микротрубочек, радиально расходящихся от зоны диплосомы.

Связь центриолей с ядром осуществляется главным образом микрофиламентами и промежуточными филаментами(рис.84).



Рис.85. Центриоли

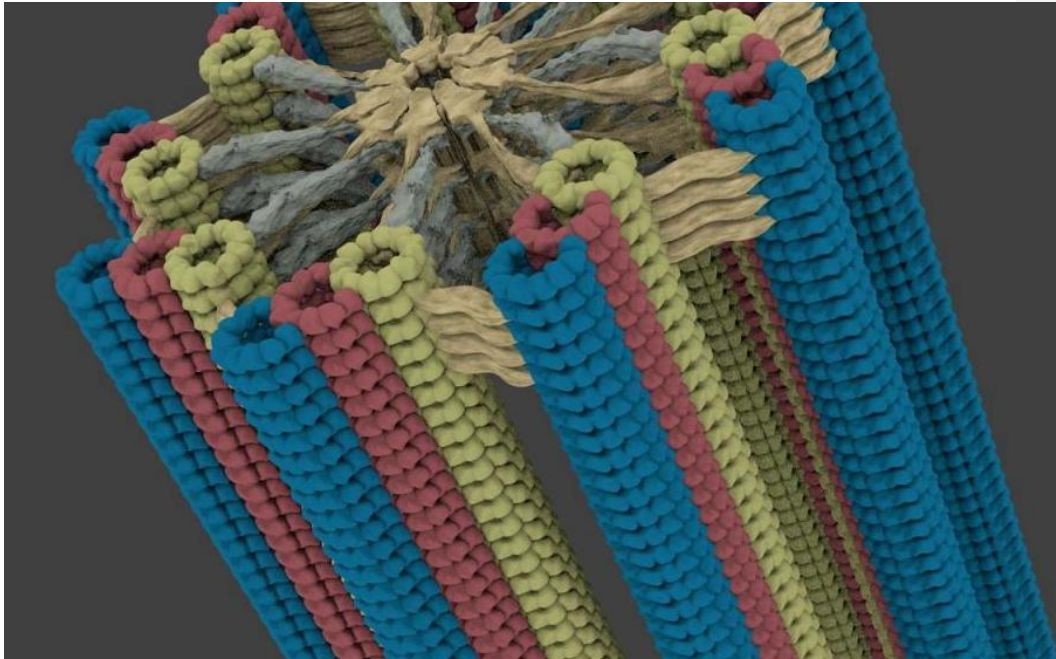


Рис.86. Строение центриоли.

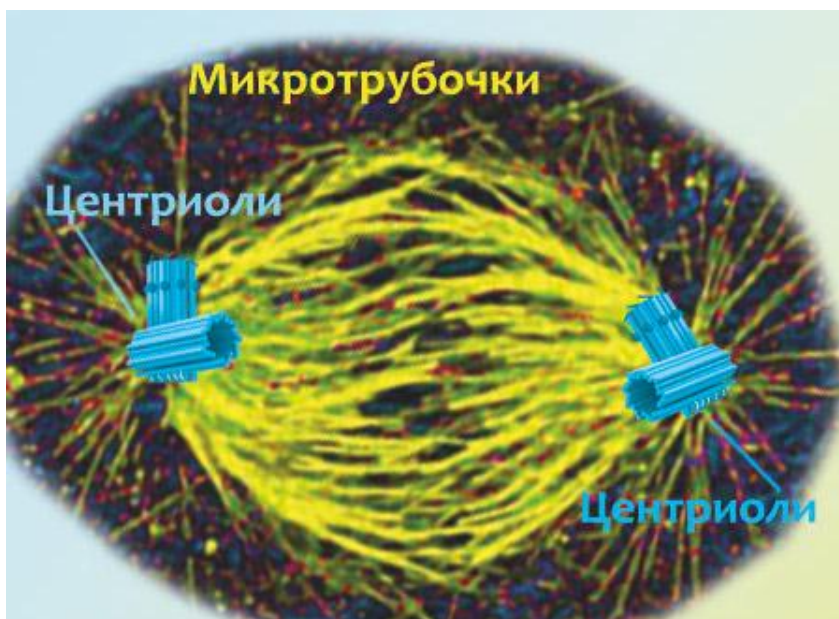


Рис.87. Строение митотического аппарата.



Рис.88. Центриоли эмбриональной клетки селезенки куриного зародыша (X60 000).

1,2-центриоли; 3- комплекс Гольджи; 4- хроматин; 5- митохондрии; 6 - ядерная оболочка; 7- рибонуклеопротеидные гранулы; 8 –перичентриполярное тельце; 9,10- дочерние центриоли.

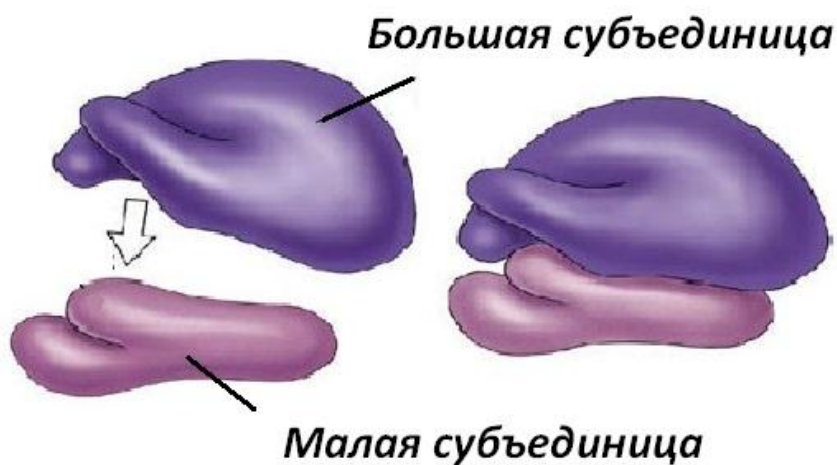
Задание 1. Просмотреть рисунки 84-88, рисовать 87 и 88 рисунки, ставить соответствующие обозначения.

Е. Рибосомы

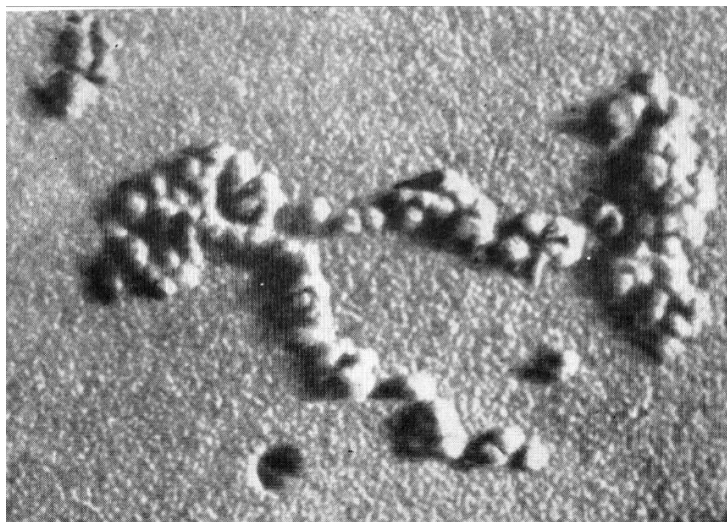
Это частицы, имеющие округлую форму, диаметром 15-25 нм. Они состоят из двух частиц, или субъединиц-большой и малой. Рибосомы могут располагаться на мембранах шероховатой ЭР, свободно в цитоплазме, либо в матриксе некоторых органоидов, например, митохондрий и хлоропластов, или объединяться информационной РНК по 5-70 штук и называться полирибосомами. Состоят рибосомы из РНК (40%) и структурного белка (60%). Это элементарные аппараты синтеза белковых, полипептидных молекул, обнаруживаются во всех живых клетках, однако их размеры и характеристика различаются у про- и эукариотических клеток. Рибосомы-это сложные рибонуклеопротеиды, в состав которых входят белки и молекулы РНК примерно в равных весовых отношениях. Работающая рибосома состоит из

двух неравных субъединиц, которые легко разъединяются при понижении концентрации солей магния в растворах (рис.89).

Состав рибосом



А



Б

Примечание [U2]:

Рис.89. Рибосомы. А-схематическое строение; Б-электронно-микроскопическое строение полирибосом вируса полимиелита (X115000).

Функции рибосом

- 30S - малая субъединица:
- 21 белок + 16S РНК
- 50S - большая субъединица:
- 34 белка + 5S, 23S РНК
- Рибосомы выполняют функцию трансляции генетической информации – синтез белка на матрице иРНК.

Трансляция на рибосоме

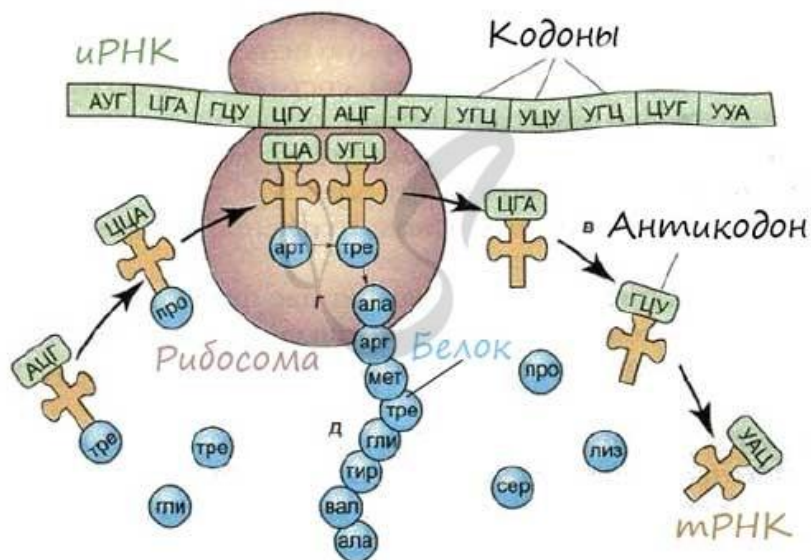


Рис.90. Синтез белка на рибосоме (схема).

Глава 7 . ЯДЕРНЫЙ АППАРАТ КЛЕТКИ.

I. Ядро.

Ядро есть во всех клетках животных и растений. У бактерий не обнаружено морфологически выраженное ядро, однако имеется ядерный материал, близкий по химическому составу к ядерному материалу высших форм. В бактериях он диффузно распределен по всей цитоплазме.

Ядру принадлежит руководящая роль во многих процессах, протекающих в клетке. Его влияние распространяется на такие функции, как движение, рост, размножение, дифференцировка клетки. Ядро - носитель генетического материала, определяющего как свойства данной клетки, так и свойства клеток последующих поколений, специфический характер их молекул. Эта генетическая роль ядра связана с ДНК, строящей РНК и определяющей код для синтеза белка.

Форма ядер часто соответствует форме клетки. В округлых и мультиполярных клетках, с примерно одинаковым продольным и поперечным диаметром, ядра округлые или овальные: в клетках, вытянутых в одном направлении, ядра овальные или вытянутые.

Увеличение поверхности ядра за счет выростов, впячиваний ядерной оболочки увеличивает контакты ядерной оболочки с цитоплазматическими структурами.

В интерфазном ядре различают хроматин в виде хорошо прокрашивающихся основными красителями глыбок и ахроматиновую сеть, прокрашивающуюся слабее. Эти структуры состоят из ДНК-белка, т. е. хромосомного материала. Другими ядерными структурами являются ядрышко, содержащее РНК - белок и ядерный сок, или кариоплазма(рис.91,92).



Рис.91. Интерфазное ядро клетки поджелудочной железы (окрашенный препарат). Ядро окрашено в-красный, хромонема и хромоцентры-в голубой, ядерная плазма неокрашена.

Ядру принадлежит руководящая роль во многих процессах, протекающих в клетке. Его влияние распространяется на такие функции, как движение, рост, размножение, дифференцировка клетки. Ядро - носитель генетического материала, определяющего как свойства данной клетки, так и свойства клеток последующих поколений, специфический характер их молекул. Эта генетическая роль ядра связана с ДНК, строящей РНК и определяющей код для синтеза белка.

Функциональная роль яйцевой оболочки заключается в обособлении генетического материала клетки от цитоплазмы, а также регуляции взаимодействий ядра и цитоплазмы.

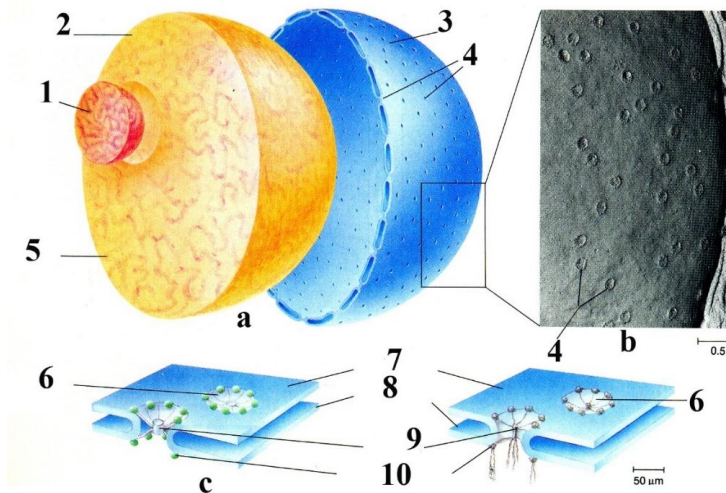


Рис.92. Строение ядра: а-схематическое строение ядра; б-электронно-микроскопическое фото; с-комплекс ядерной поры: 1-ядрышко; 2-нуклеоплазма; 3-ядерная оболочка; 4-ядерная пора; 5-хроматин; 6-комплекс ядерной поры; 7-наружная мембрана; 8-внутренняя мембрана; 9-центральное отверстие; 10-гранула порового комплекса.



Рис.93. Ядро кишечного эпителия аскариды. 1-грануловидная митохондрия; 2-цепочковидная митохондрия; 3-овальное ядро; 4-цилиндрическая клетка.

Задание 1. Рассмотреть препараты, демонстрирующие разнообразие форм ядер. Ядра клеток кишечного эпителия аскариды.. Они слегка овальной формы, крупные.(рис.93).

Задание 2. Ядра лейкоцитов крови человека. На препарате видны преимущественно эритроциты, у которых ядро отсутствует. Лейкоциты, в отличие от эритроцитов,- круглые и более крупные клетки. Сегментированное ядро имеют нейтрофиллы. Оно состоит из трех-четырех долек, соединенных перемычками. Такая структура ядра увеличивает ядерную поверхность и площадь соприкосновения ядра с цитоплазмой. Это указывает на усиленный обмен веществ между ядром и цитоплазмой, что, вероятно, можно поставить в связь с фагоцитарной ролью этих клеток. Моноциты среди лейкоцитов самые крупные (20 мк), их ядра бобовидное (рис.94).

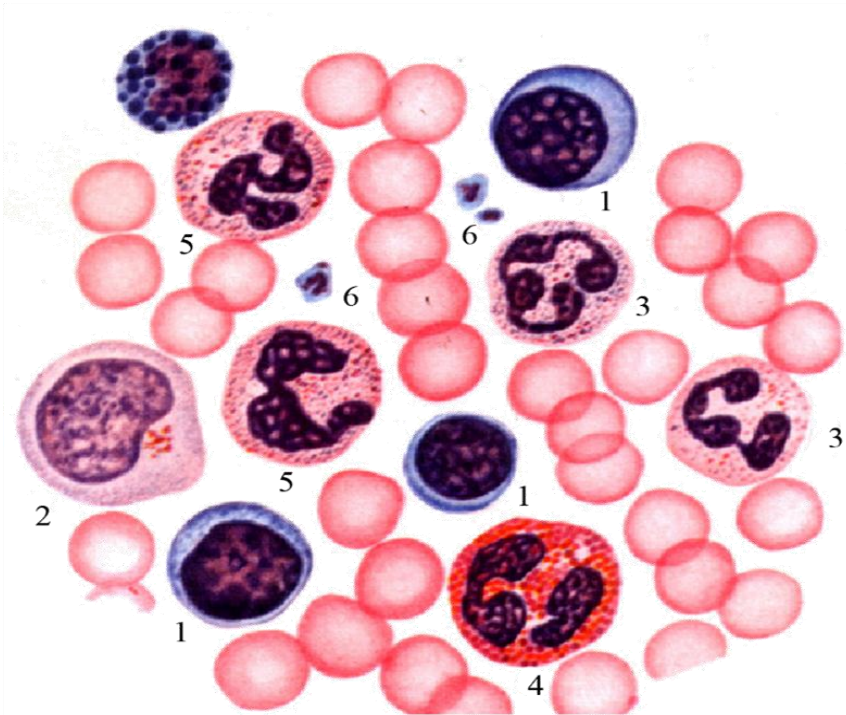


Рис.94. Разнообразие ядер клетки (кровь человека).1-округлое ядро лимфоцита; 2-бобовидное ядро моноцита; 3-цепочковидное ядро нейтрофила; 4-дольчатое ядро эозинофила; 5-колбасовидное ядро базофила; 6-пластинчатое ядро тромбоцита.

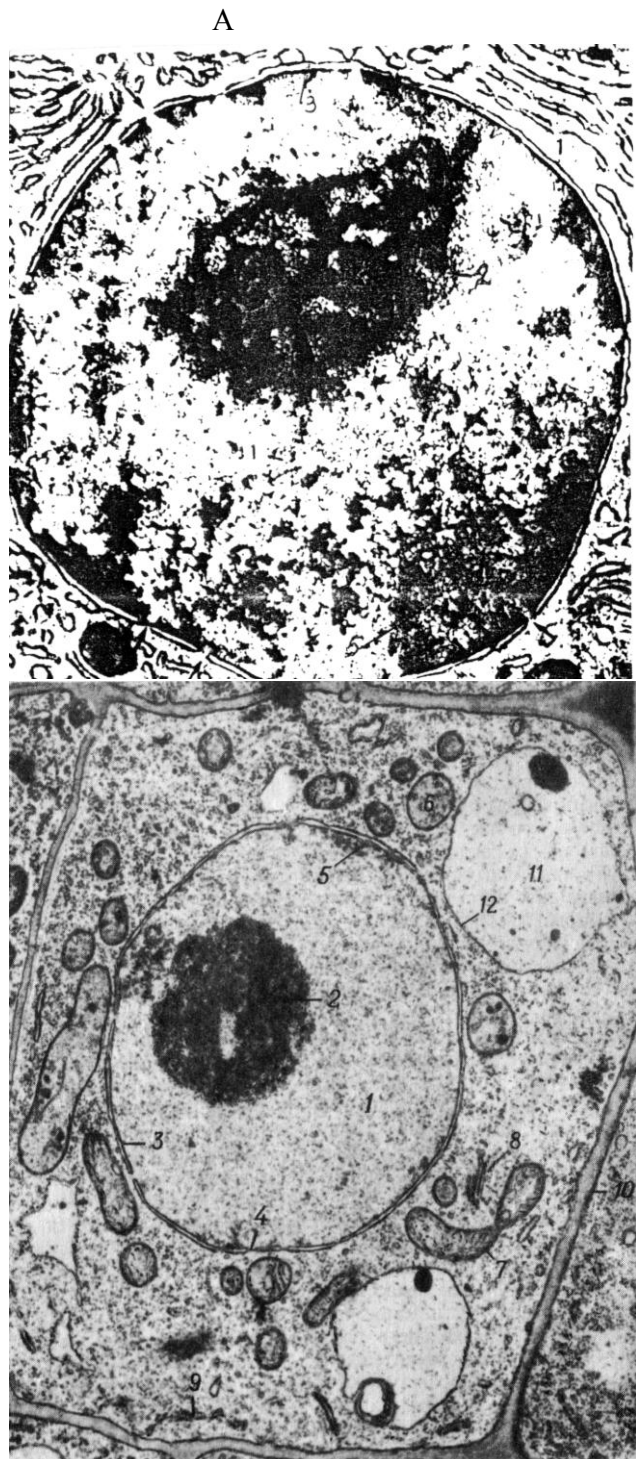


Рис. 95. Строение ядра. Электронно-микроскопическое строение ядра клетки поджелудочной железы (А), растительной

клетки (Б): 1-ядро; 2-ядрышко; 3-ядерная оболочка; 4-пора; 5-хроматин; 6-митохондрия; 7-хлоропласт; 8-аппарат Гольджи; 9-эндоплазматическая сеть; 10-клеточная оболочка; 11-вакуола; 12-тонопласт.

А. Нуклеиновые кислоты.

Впервые термин нуклеиновые кислоты был введен в 1889 г. Альтманом, а в 1953 г. Ф. Крик и Дж. Уотсон расшифровали строение молекулы ДНК. Они установили, что каждая молекула ДНК складывается из двух полидезоксирибонуклеотидных цепочек, спирально закрученных вокруг общей оси. (в 1868г. Иоган Мишер выделил из ядра погибших лейкоцитов вещество, обладающее кислотными свойствами).

Нуклеиновые кислоты представлены мононуклеотидами и полинуклеотидами.

Мононуклеотид состоит из трех частей: 1) азотистое основание, 2) пятиуглеродный сахар (пентоза) 3) остатки фосфорной кислоты.

Азотистые основания делятся на два вида: пуриновые (аденин, гуанин) и пиримидиновые (цитозин, тимин и урацил). Пятиуглеродный сахар: **рибоза** и **дезоксирибоза**.

Мононуклеотиды выполняют энергетическую функцию; являются переносчиками химических молекул; являются мономерами для сборки полинуклеотидов

Полинуклеотиды: ДНК и РНК. Это линейные полимеры. Соединяются мононуклеотиды ковалентными фосфодиэфирными связями.

Полинуклеотидные цепи ДНК и РНК отличаются друг от друга размером, видом и набором азотистых оснований.

РНК содержит рибозу, одно из четырех азотистых оснований (А, Г, У, Ц) и остаток фосфорной кислоты.

ДНК содержит дезоксирибозу, одно из четырех азотистых оснований (А, Г, Т, Ц) и остаток фосфорной кислоты. Практически у всех живых организмов ДНК имеет двуцепочечное строение (рис. 96).

Основания комплементарны друг другу (А-Т, Ц-Г). Между ними водородные связи.

ДНК обладает уникальным свойством: способностью к самоудвоению (репликация). Под действием ферментов (ДНК-полимераза) в точках репликации разрываются водородные связи, спираль раскручивается, служит матрицей для синтеза дочерних ДНК. ДНК-лигаза (фермент) сшивает цепи. Каждая хроматида содержит 2 цепочки (материнскую и дочернюю). Полуконсервативный способ (полное воспроизведение информации) (рис. 97).

Функции ДНК:

- 1) Записывает генетическую информацию;
- 2) Хранит генетическую информацию;
- 3) Воспроизводит генетическую информацию;
- 4) Передает дочерним клеткам.

РНК

Представлены разнообразными по размерам, структуре и функциям молекулами. Молекулы РНК являются копиями определенных участков молекулы ДНК и состоят из одной цепи.

Иногда РНК могут образовывать конформации – между отдельными участками наблюдаются спаривания, что приводит к образованию спирали.

мРНК (иРНК) – синтезируется в ядре под контролем фермента РНК-синтетазы (полимеразой) комплементарно к последовательности ДНК, выходит через поровые комплексы ядерной оболочки в цитоплазму, направляется в рибосомы, и становится матрицей для синтеза белка на рибосоме. В состав входят от 3 до 4 тыс. оснований. 5% РНК(рис. 98).

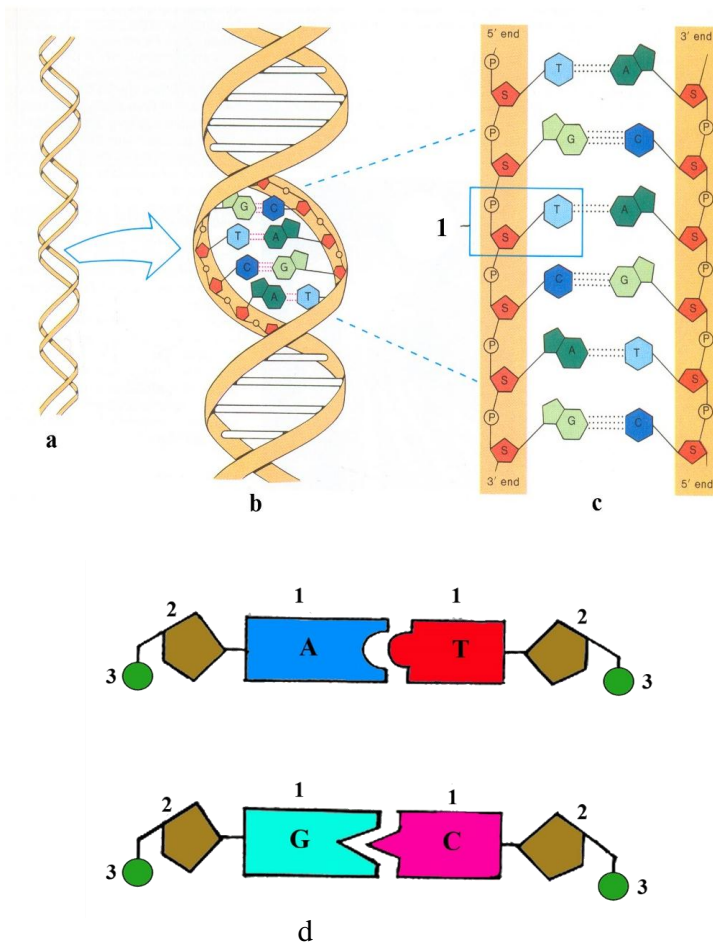


Рис.96. Схема строения ДНК: а-двойная спирал ДНК; б-комплементарное строение ДНК; с, d-строение нуклеотидов. 1-А, Т, G, С-азотистые основания; 2-углевод; 3-фосфорная кислота.

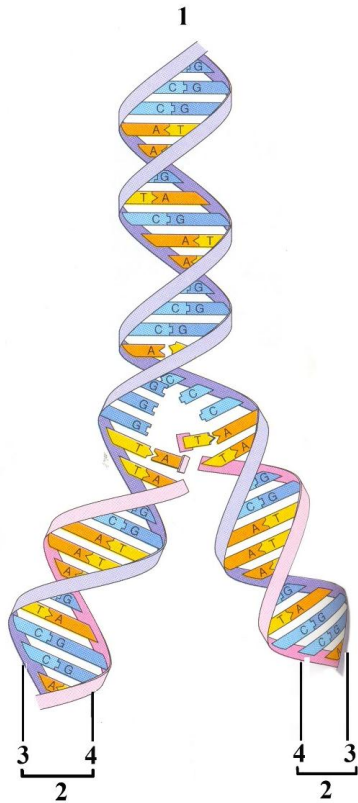


Рис.97

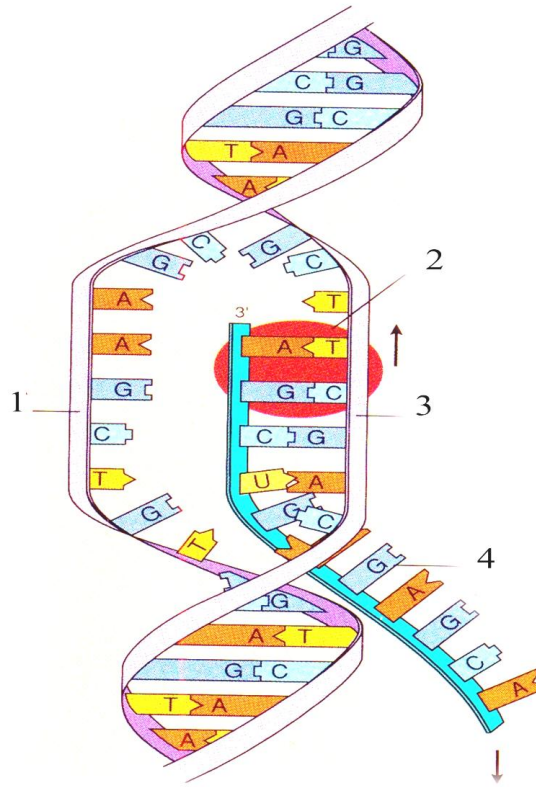


Рис.98

Рис.97. Редупликация ДНК. 1-материнская молекула; 2-дочерная молекула; 3-старая цепочка; 4-новая цепочка.

Рис.98. Синтез РНК из молекулы ДНК. 1-неактивная цепочка ДНК; 2-фермент РНК полимераза; 3-цепочка ДНК где происходит синтез РНК; 4-вновь синтезированная молекула и-РНК.

рРНК – синтезируется в основном в ядрышке в области генов рибосомальной РНК и созревает в результате процессинга поровых комплексов поверхностного аппарата ядра, становясь компонентом большой и малой субчастиц рибосомы. Субъединицы рибосомы выходят в цитоплазму, где осуществляется их сборка на молекуле иРНК. 85% РНК.

тРНК 10%РНК. Состоит из 190 нуклеотидов. Обладает специфичностью к конкретной аминокислоте (каждая АМК переносится своей тРНК).

5% сухой массы в клетке представлены мононуклеотидами и полинуклеотидами.

Задание. Рассмотреть и изучить схематические рисунки строения ДНК. Рис.(96,97,98). Рисовать 96 рисунок.

Б. Хроматин и хромосомы.

Хроматин. При наблюдении некоторых живых клеток после фиксации и окраски, внутри ядра выявляются зоны плотного вещества, которое хорошо воспринимает разные красители, особенно основные. Благодаря такой способности хорошо окрашиваться этот компонент ядра и получил название «**хроматин**» (Флемминг, 1880). Максимально конденсирован хроматин во время митотического деления клеток, когда он обнаруживается в виде плотных телец-**хромосом**.

Морфология митотических хромосом(рис. 99-104). Это лучше всего изучать в момент их наибольшей конденсации, в метафазе и в начале анафазы. **Первичная перетяжка** обычно делит хромосому на два **плеча**. Хромосомы с равными или почти равными плечами называют **метацентрическими**, с плечами неодинаковой длины-**субметацентрическими**. Палочковидные хромосомы с очень коротким, почти незаметным вторым плечом-**acroцентрические**(рис. 100). В области первичной перетяжки расположена **центромера**, или **кинетохор**(рис. 101).

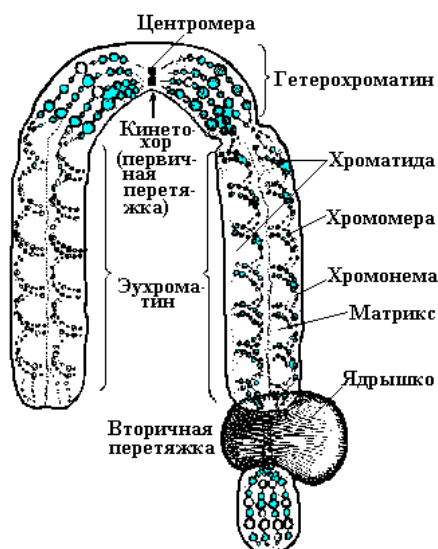


Рис.99 Схема строения хромосом.

Некоторые хромосомы имеют **вторичную перетяжку**, их называют **ядрышковыми организаторами**, так как именно в этих участках хромосом в интерфазе происходит образование ядрышка.

Совокупность числа, величины и морфологии хромосом называется **кариотипом** данного вида(рис.102). Схематическое изображения кариотипа называется **идиограмма**(рис.103).



Рис.100. Типы строения хромосом.

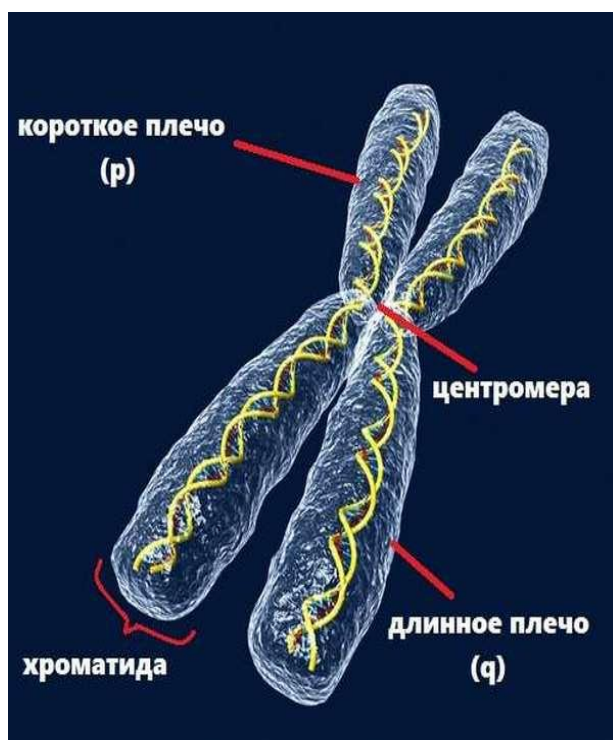


Рис.101. Люминисцентное строение хромосом.

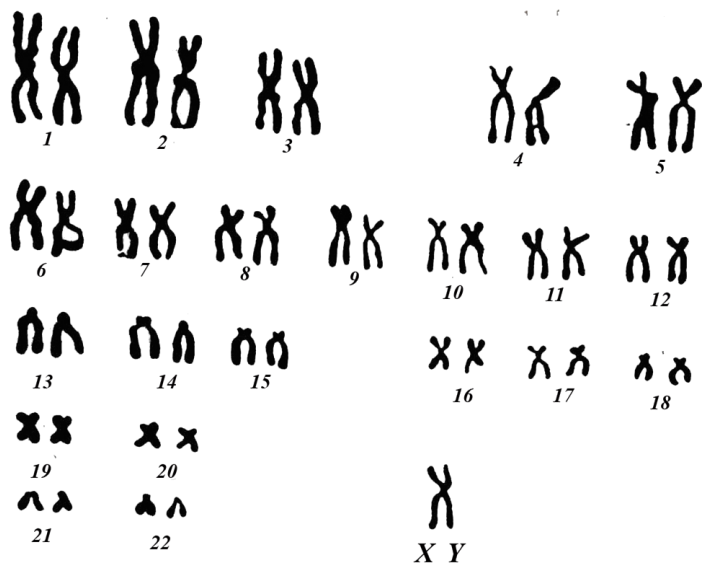


Рис.102. Кариотип человека.

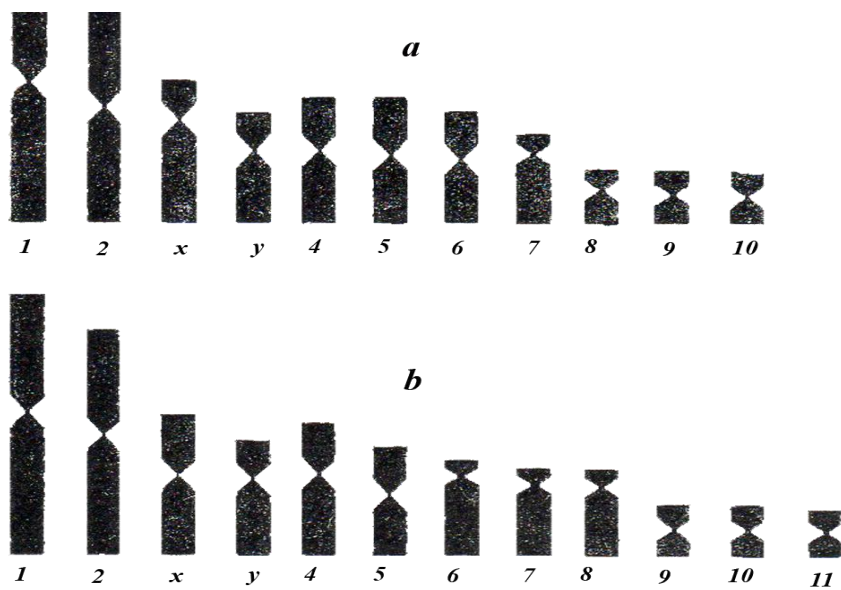


Рис.103. Идиограмма хромосом даурского (а) и китайского (б) хомячков.

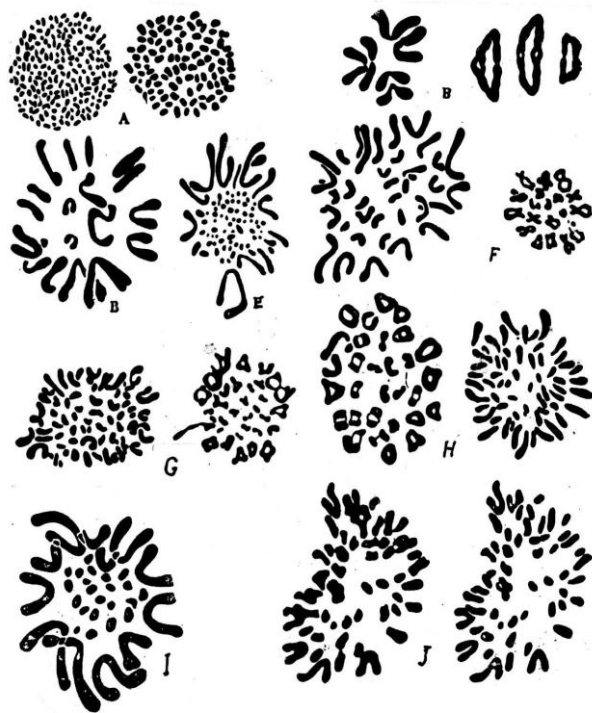


Рис.104. Хромосомный комплекс разных видов животных. А-речной рак (2n-196), Б-комар кулекс(2n-6), В-рыба щука(2n-18), Г-курица (2n-38), Е-лошадь(2n-66), Ж- бык(2n-60), З- саламандра (2n-34), И- овца (2n-54).

Задание 1. Изучить строение и разные формы хромосом организмов. (рис.99-104). Рисовать схематическое (рис.99) и типы строения(рис.100) хромосом.

Глава 8. ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ КЛЕТОК

Деление представляет собой важный этап существования клетки. Клетка может расти лишь до определенных размеров, пока не достигнет предельного объема. Между массой ядра и массой цитоплазмы существуют так называемые плазменноядерные отношения, при которых устанавливается определенное равновесие. Нарушение его приводит к изменениям физиологического состояния клетки, к делению. Однако смысл здесь заключается не только в объемных соотношениях, но в

соотношении химического состава ядерного и цитоплазматического материала.

Не рост клетки определяет начало деления, а, наоборот, деление ведет к росту клетки. Ядро может управлять лишь определенным количеством массы цитоплазмы. При делении вследствие предварительной редупликации генетического материала дочерние клетки получают то же количество ядерного материала, которое было в материнской клетке при уменьшенном вдвое цитоплазматическом материале. Вследствие этого ядро вновь получает способность управлять цитоплазмой. Дочерние клетки растут до размеров материнской клетки. Это приводит к физиологической репродукции, в результате которой общая масса клеточного материала нарастает в геометрической прогрессии.

Деление создает непрерывность существования последовательных поколений клеток и организмов в целом. Деление обеспечивает передачу наследственных признаков, способствует повышению адаптивных возможностей и прогрессивной дифференциации и специализации тканевых систем.

Существует два типа деления - **прямое (амитоз) и непрямое (митоз)**. Последний является наиболее распространенной формой. Его биологическое значение заключается в образовании генетически равноценных дочерних клеток, что достигается способностью клеток к удвоению наследственного материала и равномерным расхождением его за счет образующегося сложного митотического аппарата. При репродукции клеток митоз является основным способом передачи наследственной информации, зашифрованной в ДНК. Он обеспечивает правильное распределение хромосом между дочерними клетками.

Один из вариантов митоза - эндомитоз. Репродукция ДНК сохраняется, но выпадают некоторые фазы митоза. В результате происходит увеличение числа хромосом при сохранившейся ядерной оболочке в отсутствие цитокинеза (например, политения в клетках двукрылых). Происходит репродукция хромосом, которые не разъединяются, отчего число хромосом в клетке остается прежним, но увеличивается плоидность.

Задание 1.

Рассмотреть и изучить препарат фазы митоза в делящихся клетках лошадиной аскариды(рис.105). Ставьте обозначения(1-5).

I. Митоз.

A. Митоз животной клетки.

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

Яйцеклетки окружены оболочкой. Дробление бластомеров происходит внутри оболочки. Рассматривают стадии двух, трех, четырех бластомеров.

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

В бластомерах, находящихся на стадии профазы, видно, что центриоли начинают расходиться и лежат друг от друга уже на некотором расстоянии; между ними видна полоска уплотненной цитоплазмы - это нити будущего веретена.

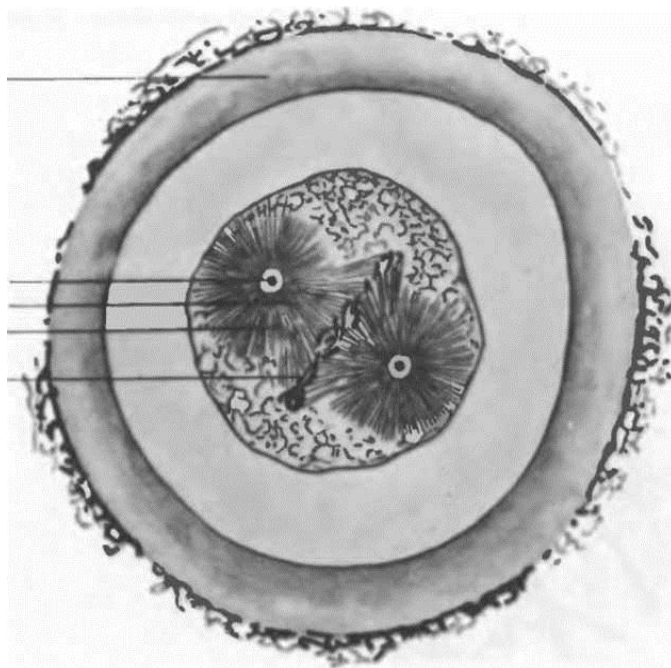
В более поздней профазе отсутствует ядрышко, разрушена ядерная оболочка, центриоли почти у полюсов, образуется веретено деления, хромосомы в виде спутанного клубка.

В метафазе хорошо сформировано веретено, образующее митотический аппарат вместе с участком близлежащей цитоплазмы(рис.105).

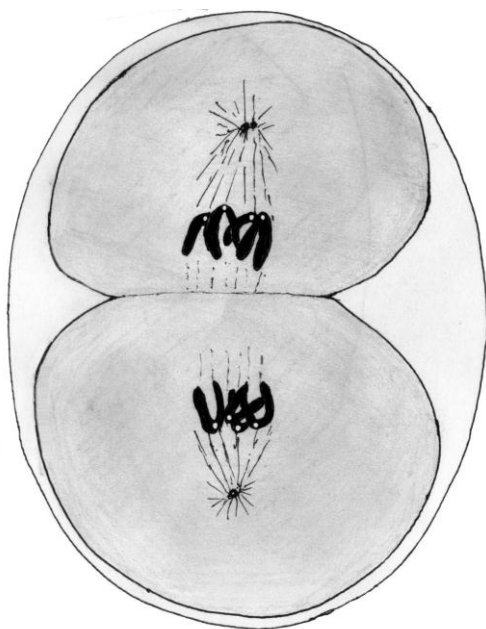
Он прокрашивается более темно, чем цитоплазма клетки. Нити веретена сходятся у полюсов, веретено имеет ромбовидную форму. Четыре хромосомы расположены на экваторе, так что их концы направлены к периферии клетки, а центромеры к центру.

К центромерам, кинетохорам, прикрепляются нити веретена. Все кинетохоры лежат в одной плоскости. Если срез прошел поперек веретена, то хромосомы расположены в виде «материнской» звезды. Хромосомы не слипаются. Между ними проходят нити веретена, не прикрепляющиеся к хромосомам и идущие от полюса к полюсу.

В анафазе хромосомы передвигаются к полюсам. Видно, что четыре пары хромосом лежат на некотором расстоянии друг от друга. Нити веретена укорочены. В поздней анафазе хромосомы уже находятся у полюсов; при этом их число установить трудно, так как они спутываются. Расхождение к полюсам начинается в области кинетохоров и распространяется к концам плеч хромосом. Левое и правое плечи иногда начинают разъединение неравномерно, и можно видеть, что дочерние хромосомы еще сцеплены на концах одного плеча.



А



Б

Рис.105. Митотическое деления клетки аскариды: А-метафаза; Б-телофаза.

В телофазе хромосомы спутываются в клубок, а в более поздней телофазе видны уже глыбки хроматина. В клетках с более поздней телофазой перетяжка настолько глубокая, что образуются две дочерние клетки. В отдельных яйцеклетках где хромосомы продвинулись далеко, между ними видна межзональная область.

I

II

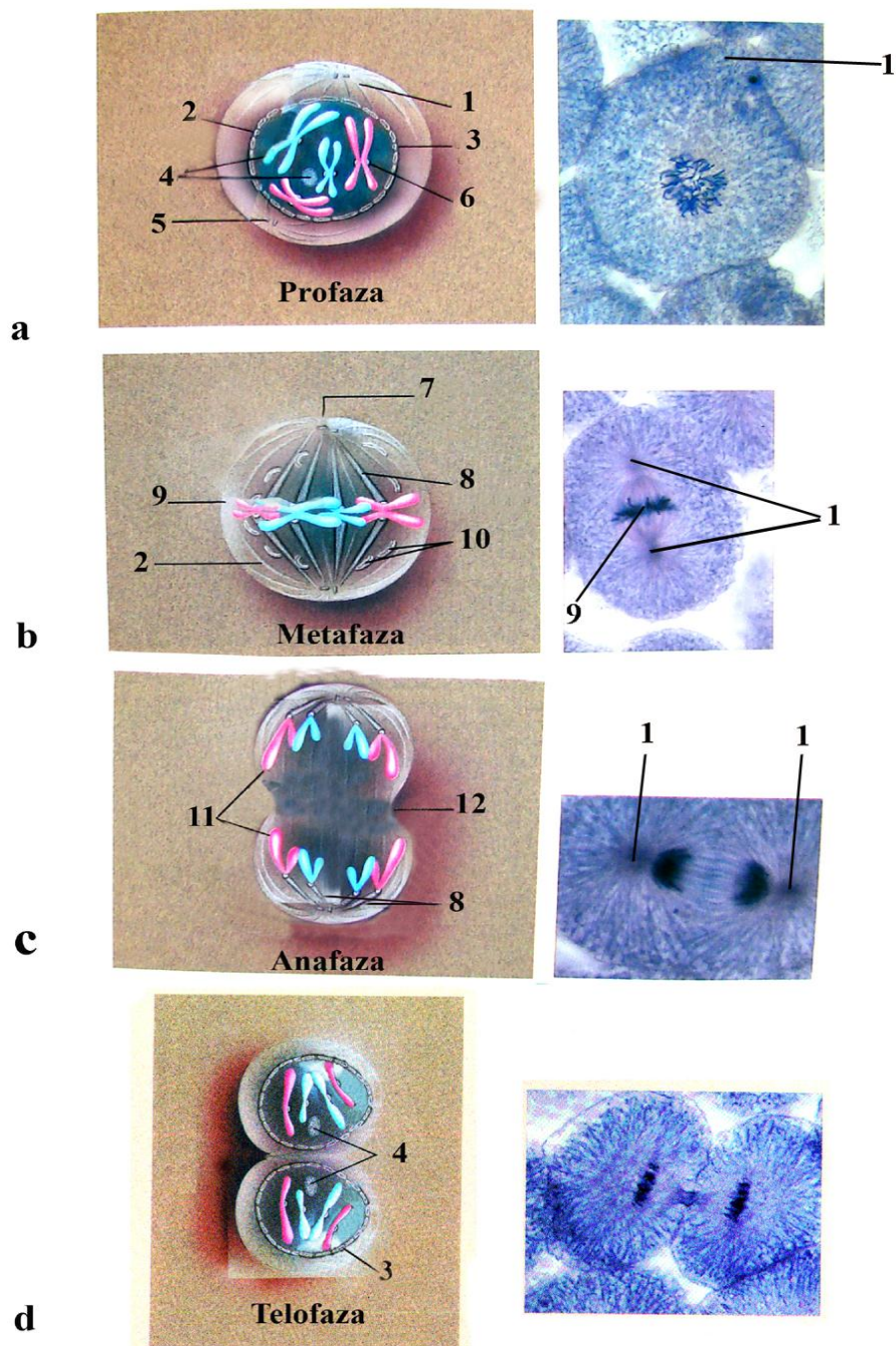


Рис.106. Митоз животной клетки. I-схема; II-фото с гистологического препарата: а-профаза; b-метафаза; с-анафаза; d-телофаза. 1-клеточный центр; 2-микротрубочки, направленные к полюсам; 3-ядерная оболочка; 4-ядрышко; 5-центриола; 6-хромосома; 7-полюс клетки; 8-микротрубочки; 9-экваторная пластинка; 10-остатки ядерной оболочки; 11-дочерные хромосомы; 12-борозда деления.

Задание 1.

Рассмотреть и изучить препарат фазы митоза в делящихся клетках лошадиной аскариды(рис.105).Изучайте рис.106, сравнивайте схематические рисунки с фотографиями с гистологических препаратов. Ставьте обозначения.

Б. Митоз в клетках растений (корешка лука).

При малом увеличении микроскопа можно различить в корешке 3 зоны: 1) концевую часть чехлик, состоящую из тонкостенных клеток, слушающихся на периферии; 2) зоны деления клетки меристемы, и 3) зоны роста, или растяжения, состоящие из вытянутых прямоугольных клеток. Деления клеток происходят только во второй зоне. При большом увеличении микроскопа в ней можно найти как неделящиеся клетки (стадия интерфазы), так и клетки во всех стадиях митоза.

В интерфазе клетки имеют прямоугольные очертания, окружены хорошо заметной оболочкой. Ядра округлые или овальные, в них видны 1-2 окрашенных в черный цвет округлых, крупных ядрышка и мелкие глыбки хроматина.

В профазе в ядре заметны более крупные глыбки хроматина. В результате дальнейшей конденсации хромосом, в ядре появляется клубок вначале тонких, а позднее более толстых и коротких нитей. В ранней профазе еще хорошо заметны ядрышки и ядерная оболочка, а к концу профазы ядрышко и ядерная оболочка исчезают. Хромосомы в виде коротких нитей оказываются лежащими в центральной части цитоплазмы.

Для следующей стадии деления-метафазы характерны два процесса: 1) завершение образования (начавшегося еще в профазе) митотического аппарата деления, состоящего из тонких нитей, тянущихся от одного полюса клетки к другому. Следует обратить внимание на то, что в клетках высших растений митотический аппарат деления формируется без участия клеточного центра; 2) перемещение хромосом к центру клетки (метакинез) и расположение их в виде экваториальной пластинки. При этом часть нитей веретена (так называемые прикрепленные нити) оканчиваются на лежащих в центральной области хромосом-кинетохорах. Остальные нити веретена деления идут через всю клетку от одного ее полюса к другому. Хромосомы в экваториальной пластинке располагаются центрмерными участками друг к другу, а концы их обращены наружу. Поэтому при рассмотрении их сверху они образуют фигуру, напоминающую звезду (стадия материнской звезды).

В метафазе каждая хромосома состоит из двух хроматид (сестринских хромосом). Следует помнить, что удвоение хромосом происходит в интерфазе в

синтетическом S-периоде. Условно концом метафазы можно считать тот момент, когда хроматиды начинают отходить друг от друга и соединены лишь в области центромеров.

В анафазе митоза обеспечивается равномерное распределение генетического материала по дочерним клеткам. В ранней анафазе хромосомы повернуты центромерами к полюсам клетки, а концы их обращены к центру клетки. В поздней анафазе хромосомы уже собираются на полюсах клетки. Расхождение хромосом происходит очень быстро.

В телофазе хромосомы начинают деконденсироваться, вакуолизироваться, становится заметным матрикс хромосом. Появляется ядерная оболочка и восстанавливаются ядрышки. Одновременно в поздней анафазе и ранней телофазе в центре клетки в области веретена начинает образовываться перегородка, которая растет от центра клетки к периферии и делит клетку на две дочерние клетки (рис. 107).

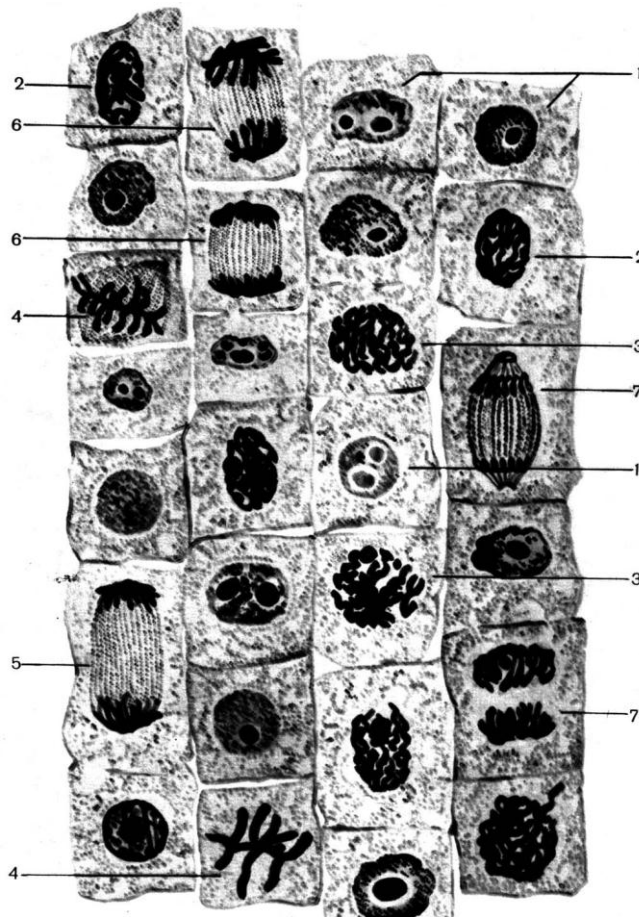


Рис.107. Митоз в клетке корешка лука. 1-интерфаза; 2-ранняя профза; 3-поздняя профза; 4-метафаза; 5-веретено деления; 6-анафаза; 7-телофаза.

II. Амитоз представляет собой деление клетки без образования митотического аппарата и без спирализации хромосом. В результате образуются либо равные, либо неравные по размерам клетки с одинаковым или неодинаковым содержанием генетического материала. Амитоз - нормальное явление для ряда клеток, связанное с их дифференциацией.

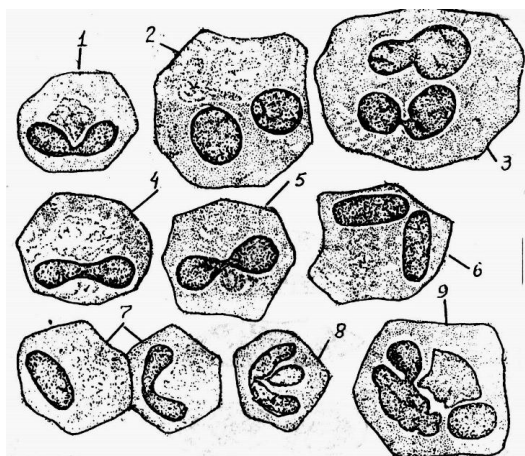


Рис.108. Схема амитотического деления клетки. 1,4,5-образование перетяжки в ядре; 2,6,7-образование двухядерных клеток после амитоза; 3,8,9-следующие амитотические деления.

Задание 1. Просмотреть и изучить гистологические препараты: 1-фазы митоза в дробления яйцеклетки аскариды; 2-митоз животной клетки; 3-митоз в клетках корешка лука. Амитоз (рис.108). Рисовать все рисунки и сделать соответствующие обозначения.

Мейоз.

Мейоз – это форма ядерного деления, сопровождающаяся уменьшением числа хромосом с диплоидного до гаплоидного и изменением генетического материала. Результат мейоза - образование клеток с гаплоидным набором хромосом - половых клеток.

Биологическое значение мейоза:

1. Благодаря редукции числа хромосом в результате мейоза в ряду поколений при половом размножении обеспечивается постоянство числа хромосом.

2. Независимое распределение хромосом обеспечивает рекомбинацию генов, относящихся к одной группе сцепления (находящихся в одной хромосоме).
3. Кроссинговер в профазе I мейоза обеспечивает рекомбинацию генов, относящихся к одной группе сцепления (находящихся в одной хромосоме)(рис.109).

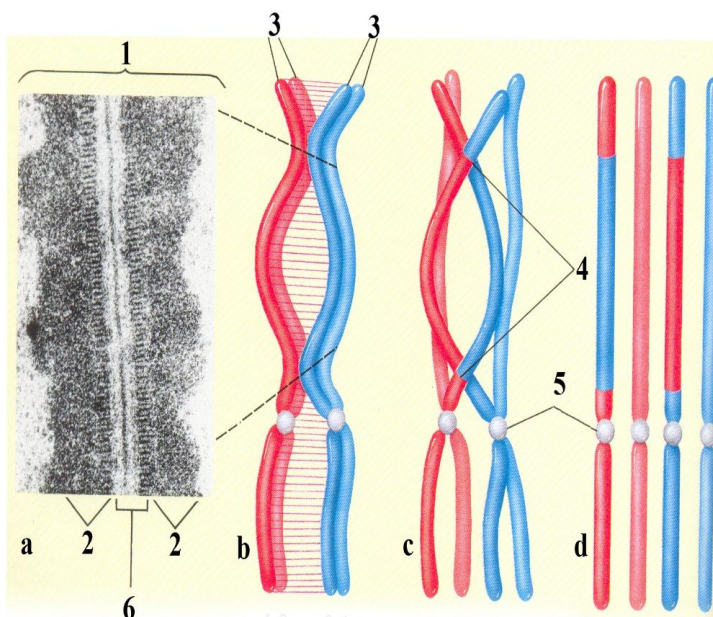


Рис.109. Кроссинговер (профаза I): а-электронно-микроскопическое фото бивалента; b(1) -бивалент; с-кроссинговер; d(3) -дочерные хроматиды; 2-хроматиды; 4-хиазма; 5-центромера; 6-нуклеопротеин.

4. Случайное сочетание гамет при оплодотворении вкупе с вышеперечисленными процессами способствует генетической изменчивости.

Мейоз состоит из двух последовательных делений, первое из которых называется редукционным, а второе – эквационным. В таблице 3 представлены события, происходящие в клетке на разных фазах мейоза.

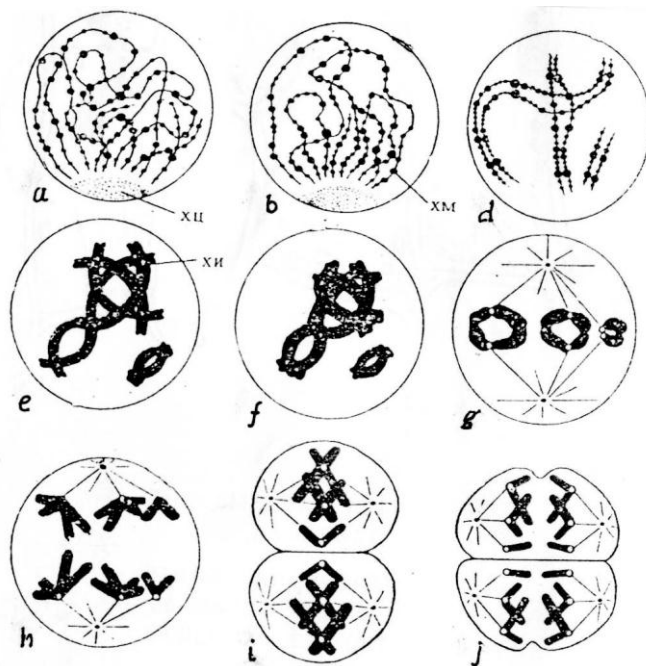


Рис.110.Схема мейотического деления. Профаза I: а-лептотена; б-зиготена; d-пахитена; е-диплотена; f-диакинез; g-метафаза I; h-метафаза II; j-анафаза II; xts-хромоцентр; хм---хромомера; хи-хиазма.

Таблица 3

Описание фаз мейоза

Фаза	События	Морфологическая картинка
1	2	3
ПРОФАЗА 1 Лептотена	Стадия тонких нитей. Сетчатая структура интерфазного ядра исчезает. Происходит конденсация ДНК с образованием хромосом в виде тонких нитей.	В ядре имеются тонкие нити, расположенные неупорядоченно.

Зиготена	Стадия двойных нитей. Гомологичные хромосомы притягиваются друг к другу сходными участками. Соединение их в пары (конъюгация) происходит чаще с концов. Пара гомологичных хромосом образует структуру, которая называется бивалентом или тетрадой.	В ядре имеются тонкие нити, расположенные попарно
Пахитена	Стадия толстых нитей. Стадия завершённой или полной конъюгации хромосом. Происходит утолщение и укорочение хромосом в составе бивалента за счёт их спирализации. Гомологичные хромосомы перекрещиваются, между ними возникают хиазмы.	В ядре имеются толстые нити, расположенные попарно.
Диплотена	Между гомологичными хромосомами в составе бивалента происходит кроссинговер – обмен участками. Происходит частичная деконденсация хромосом, при этом часть генов может работать, происходят процессы транскрипции (образование РНК), трансляции (синтез белка); гомологичные хромосомы остаются соединёнными между собой.	В ядре имеются толстые нити, расположенные неупорядоченно
Диакинез	ДНК снова максимально конденсируется, исчезает ядерная оболочка и ядрышки; гомологичные хромосомы остаются соединёнными между собой; центриоли расходятся к полюсам клетки и начинают формировать веретено деления.	Ядро исчезает, на его месте - клубок толстых нитей, расположенных неупорядоченно

МЕТАФАЗА I	Биваленты выстраиваются в экваториальной плоскости клетки; центриоли находятся на полюсах и формируют веретено деления, которое присоединяется к центромерам.	Клетка становится округлой, ядра нет, биваленты в виде парных толстых нитей собираются у экваториальной пластинки
АНАФАЗА I	Происходит разделение бивалентов, и веретено деления растягивает гомологичные хромосомы к противоположным полюсам клетки.	Клетка округлой или вытянутой формы, ядра нет, хромосомы в виде толстых нитей расположены у противоположных полюсов клетки.
ТЕЛОФАЗА I	Очень короткая по продолжительности; происходит разделение цитоплазмы и образование двух дочерних клеток, формирование ядерной оболочки и ядрышек. Число хромосом у каждого полюса в два раза меньше, чем у материнской клетки.	Две более мелкие по размерам дочерние клетки, ядра с толстыми нитями внутри или с большими глыбами хроматина
ИНТЕРКИНЕЗ	Синтетический период отсутствует, репликации (удвоения) ДНК не происходит	Клетка имеет присущую ей форму, в ядре выявляется хроматин в виде точек, зерен, глыбок; имеется ядрышко

ПРОФАЗА II	Происходит конденсация хроматина с образованием хромосом, исчезает ядерная оболочка, ядрышко, центриоли расходятся к полюсам клетки.	Клетка начинает терять нормальную форму, на месте ядра имеется клубок толстых нитей - хромосом
------------	--	--

1	2	3
МЕТАФАЗА II	Хромосомы выстраиваются в экваториальной плоскости, к их центромерам прикрепляется веретено деления, которое образуют центриоли.	Клетка становится округлой, ядра нет, хромосомы в виде толстых нитей собираются у экваториальной пластинки
АНАФАЗА II	Центромера разрывается, и сестринские хроматиды нитями веретена деления растягиваются к противоположным полюсам.	Клетка округлой или вытянутой формы, ядра нет, хромосомы в виде толстых нитей расположены у противоположных полюсов клетки
ТЕЛОФАЗА II	Происходит процесс реконструкции интерфазного ядра: появляется ядерная оболочка, ядрышко, хромосомы деконденсируются. В итоге из одной диплоидной материнской клетки в результате	Четыре более мелкие по размерам дочерние клетки, ядро с толстыми нитями внутри

	мейоза образуются четыре дочерние клетки с гаплоидным набором хромосом.	или с большими глыбами хроматина
--	---	----------------------------------

Задание 1. Изучить схему мейоза. Установить основные моменты двух деления созревания, рисовать 109 и 110 рисунки, ставить соответствующие обозначения.

IV. Клеточный цикл.

Время существования клетки от одного деления до другого деления называется клеточным циклом. В организме высших позвоночных клетки различных тканей и органов имеют неодинаковую способность к делению. Здесь встречаются клетки, полностью потерявшие свойство делиться: это большей частью



Рис.111 Митотический цикл. М-митоз; G1-постмитотический; S-синтетический; G2-постсинтетический периоды.

специализированные, дифференцированные клетки (например, клетки нервной системы). В организме есть постоянно обновляющиеся

ткани (различные эпителии, кровь, клетки рыхлой и плотной соединительных тканей).

Весь клеточный цикл состоит из четырех отрезков времени: собственно митоз (М), пресинтетический (G1), синтетический (S) и постсинтетический (G2) периоды(рис.111).

Задание 1. Изучить и рисовать схему митотического цикла.

Часть II

Методики приготовления препаратов, приведенных в руководстве

Приготовление некоторых веществ, необходимых для цитологических работ.

Нейтральный формалин

Продажный формалин содержит некоторое количество муравьиной кислоты. Для многих методов обработки препарата она безвредна, однако для некоторых методов, например для серебрения, необходимо употребление формалина, свободного от кислоты. Для нейтрализации формалин оставляют надолго в коричневой склянке над слоем в 1-2 см порошкообразного углекислого кальция. Вначале склянку несколько раз встряхивают. Приемлемая нейтрализация достигается уже через 24 часа.

Кусочек ткани помещают в 5%-ный формалин (имеющийся в продаже формальдегид принимается за 100%-ный) на 1 сут. Переносят в 10%-ный формалин не менее чем на 5-6 сут. В этом формалине кусочки ткани сохраняют. Перед дальнейшей обработкой - обезвоживанием - кусочки ткани помещают в 20%-ный формалин на 1 сут. Затем промывают проточной водопроводной водой 1 сут.

«Хромпик» для мытья посуды.

Кристаллы бихромата калия растворяют в концентрированной серной кислоте, примерно горсть кристаллов на 0,5-1 л кислоты.

Подкисленный спирт для дифференцировки.

К 100 см³ 70%-ного спирта добавляют 0,25-0,5 см³ чистой концентрированной соляной кислоты.

Сильно перекрашенные в красителе срезы дифференцируют, т. е. отмывают лишнюю краску. Структуры, родственные красителю, удерживают его дольше, чем остальные структуры. Поэтому дифференцировку ведут под контролем микроскопа. Как только выявляемые данным методом окраски структуры оказываются отчетливо видными, дифференцировку прекращают, отмывая жидкостью, в которой происходит дифференцировка. Если жидкость плохо отмыта, дифференцировка продолжает идти и выявляемые структуры могут совсем раскраситься.

Жидкости для дифференцировки бывают различными, что зависит от характера обработки препарата. Они указываются в методиках. Такой способ

обработки с перекраской препарата оказывается более удобным и лучше выявляет изучаемые структуры.

Приготовление белка для приклеивания соевов.

Белок свежего куриного яйца сливают, затем выливают на фильтр. К белку добавляют несколько маленьких кристалликов тимола (или карболовой кислоты). В колбочку, куда отфильтровывают белок, бросают несколько кристалликов тимола. Воронку прикрывают чистой чашкой петри. Фильтрация длительная. Затем отфильтрованный белок смешивают с глицерином в пропорции 2:1. В приготовленном таким образом белке должно быть несколько кристалликов тимола.

Фиксатор «суза» (по гейденгайну) (готовят перед употреблением).

Ледяной уксусной кислоты 4 см³

Формалина 20 см³

сулемы (порошка)..... 4 г

Трихлоруксусной кислоты . 2 г

Дистиллированной воды 80 см³

Хлористого натрия 0,5 г

Фиксируют 2-6 ч. После фиксации кусочки сразу переносят в 90%-ный спирт, отмывают от сулемы в смеси 90%-ного спирта и йода. Цвет смеси - густо-красно-бордовый («мадеры»). Как только сулема будет удалена из кусочка (примерно часов через 12), раствор перестает обесцвечиваться. Затем удаляют йод 70%-ным спиртом. Кусочки сохраняют в 70%-ном спирте.

Фиксатор карнуа.

Абсолютного спирта 10 см³

хлороформа 3 см³

Уксусной кислоты 1 см³

Фиксируют 1/3 ч, затем кусочки переносят в 70%-ный спирт, где их хранят.

Фиксатор ценкера.

Сулемы 5 г

двухромовокислого калия 2,5 г

Сернокислого натрия . 1 г

Дистиллированной воды 100 см³

Ледяной уксусной кислоты . 5 см³ (добавляют перед

употреблением) фиксируют 1-24 ч. Затем 24 ч промывают в водопроводной воде до обесцвечивания воды. Кусочек обесцвечивают в 70%-ном спирте. Удаляют сулему в растворе 70%-ного спирта (6 см³) и йодной настойки (1 см³). Цвет раствора - густо-красно-бордовый («мадеры»). Как только сулема будет удалена, раствор перестанет обесцвечиваться. Кусочки сохраняют в 70%-ном спирте.

Метиловый спирт (метанол).

Метиловый спирт должен быть безводным и лишенным примесей, особенно ацетона. Лучше пользоваться метанолом для анализа. Для обезвоживания его настаивают на сао (не на медном купоросе!) И затем перегоняют, для испытания на ацетон добавляют несколько капель свежеприготовленного

раствора нитропрусида натрия; при наличии ацетона появляется красная окраска.

Высушенные на воздухе мазки лучше всего поместить на 5-10 мин в чистый, безводный метиловый спирт, затем извлечь их пинцетом и поодиночке поставить в наклонном положении на фильтровальную бумагу для просушки. Для метилового спирта наиболее пригодны стаканчики для окраски, снабженные притертыми крышками. В других случаях метиловый спирт сразу после употребления сливают обратно в склянку с притертой пробкой.

Фиксатор буэна.

(готовят перед употреблением!)

Насыщенного водного раствора пикриновой

• кислоты 15 см³

Формалина* 5 см³

Уксусной кислоты 1 см³

Фиксируют 1-24 ч (можно и несколько суток), после чего переносят в 70%-ный спирт, где кусочки ткани сохраняют. Спирт 2-3 раза меняют

Четырехокись осмия.

Поступают в продажу в запаянных ампулах в различных фасовках. Обычно употребляют 1%-ный или 2%-ный водный раствор, который хранят в колбе с хорошо притертой пробкой. (обращаться осторожно! Пары сильно раздражают слизистые оболочки.) Растворение производят под вытяжкой. Ампулу моют в «хромпике», затем, придерживая полотенцем, делают кольцевой глубокий надрез, отламывают конец и все содержимое вытряхивают в сосуд с притертой пробкой. Можно бросить ампулу в склянку с притертой пробкой и толстыми стенками и разбить ее сильным встряхиванием. Сосуд наполняют дистиллированной водой (не вынимая осколков стекла, если разбивают ампулу в сосуде) в количестве, чтобы получить 1%-ный или 2%-ный раствор осмиевой кислоты из того количества ее, которое было в ампуле. Затем после растворения раствор сливают в другой сосуд с притертой пробкой, чтобы освободиться от осколков стекла.

Обезвоживание, пропитывание, заливка кусочков ткани, приготовление срезов.

Обезвоживание, заливка в парафин.

Кусочки, фиксированные в формалине, помещают в спирты возрастающей крепости: 70%, 96%-1, 96%-н, 100%-1, 100%-н, по 6-12 ч. В каждой среде. Затем переносят последовательно в смесь хлороформа и 100%-ного спирта на 6-12 ч, в хлороформ на 6-12 ч, в смесь хлороформа и парафина (каша) при 37°С в термостате на 6-12 ч. Далее-парафин i в термостате при 55-56°С на 6-12 ч (не занести хлороформ), парафин ii на 6-12 ч. После чего следует заливка в парафин iii.

Парафин расплавляют в термостате при 56-57°С и фильтруют в термостате же. Затем парафин смешивают с предварительно отфильтрованным пчелиным воском в соотношении 6-10 г воска на 94-90 г парафина.

Взвешивание производят до растапливания и фильтрования. Для заливки употребляют этот же парафин.

Заливку производят в бумажных коробочках или в чашечках. С этой целью пропитанный парафином кусочек перекладывают в бумажную коробочку или чашечку, заполненную парафином (соблюдать, чтобы не было пузырей воздуха). Парафин должен быть выше уровня кусочка ткани. Коробочку с кусочком ткани опускают в широкую посудину, заполненную холодной водой для быстрого застывания парафина.

Время выдерживания в каждой среде, указанное в прописи, приводится для кусочка толщиной 5-7 см. Для кусочков меньших размеров сроки сокращаются до 1-1,5-6 ч.

Депарафинирование и обводнение срезов.

Для окраски водорастворимыми красителями парафиновые срезы депарафинируют и обводняют. Для этого наклеенные парафиновые срезы на 2-3 мин помещают для освобождения от парафина в ксилол или толуол, после чего препараты переносят на 2-5 мин в абсолютный спирт, затем в 96, 80, 70%-ный спирт и в дистиллированную воду. Держат в каждой среде по 2-3 мин. Таким образом препарат постепенно насыщается водой. Такой препарат легко воспринимает водный краситель.

Обезвоживание и просветление окрашенных срезов.

После окрашивания срезов их необходимо обезвоживать, просветлить. Обезвоживание может производиться в спиртах все возрастающей крепости. Срезы из краски ополаскивают дистиллированной (иногда водопроводной) водой и переносят в спирты 70, 96, 100%-ный i, 100%-ный ii на 2-3 мин в каждом. Затем срезы просветляют в карбоксилале (несколько кристалликов карболовой кислоты в ксилале) и ксилале по 3-5 мин. Карбоксилал, ксилал можно заменить карботолуолом, толуолом. После ксилала срезы заключают в подходящую среду.

Среды для обезвоживания указаны в методиках окраски препарата.

Заключение окрашенных срезов в среды.

Бальзам

Употребляют канадский (лучше!) Или пихтовый бальзам (смола хвойных деревьев). Растворяют бальзам в ксилале, толуоле до консистенции жидкого меда. Растворение идет медленно. Каплю такого раствора наносят на срез и покрывают покровным стеклом. Бальзам должен полностью покрыть срез. Следят, чтобы не было пузырей воздуха.

Окраска метиловым синим – эозином.

Приготовление раствора. Смешивают 35 см³ 1%-ного водного раствора метилового синего (не метиленового!), 45 см³ 1%-ного водного раствора эозина (воднорастворимого желтоватого) и 100 см³ дистиллированной воды. Готовый раствор краски имеет красновато-фиолетовый цвет с зеленоватой флуоресценцией; он может храниться долгое время.

Окраска. Из дистиллированной воды срезы на 24 ч переносят в раствор краски. Ополаскивают в дистиллированной воде. Обезвоживают в абсолютном спирте (срезы становятся синими). Дифференцируют в щелочном растворе абсолютного спирта (к 10 см³ абсолютного спирта прибавляют 0,3 см³ 30%-ного водного раствора NaOH. На 60 см³ чистого абсолютного спирта берут 10

капель этого основного раствора. Если препараты долгое время не краснеют, добавляют еще щелочи). Срезы должны стать красными (через 5-10 мин или позже). Промывают в абсолютном спирте до полного удаления едкого натра. Переносят в обычную, слабо подкисленную воду (на 60 см³ воды 4-5 капель ледяной уксусной кислоты) на 2-3 мин. Под микроскопом снова видна синяя окраска ядер. Обезвоживают в абсолютном спирте. Затем - ксилол и бальзам.

Метиловый синий, используемый для приготовления раствора краски, должен быть совершенно нерастворим в абсолютном спирте.

Если препарат становится в воде с уксусной кислотой слишком синим, то его переносят обратно в щелочной спирт и дифференцируют дальше. Если красный тон выступает недостаточно и перекрывается синим цветом, то это результат недостаточно длительной дифференцировки в щелочном спирте.

Окраска по Гимза (романовскому)

Приготовление основного раствора. Раствор Гимза содержит метилен-азур, метиленовый фиолетовый, метиленовый синий и эозин. Можно применить и сухую смесь красителей в капсулах. Содержимое капсулы рассчитано на приготовление 100 г основного раствора. Его высыпают в чистую колбу из иенского стекла, содержащую 50 г (!) Метилового спирта (чистейший, лишенный ацетона!) И 50 г (!) Глицерина (чистейший!); затем колбу подогревают на водяной бане (или в термостате) при 60°С, часто покачивая. Остудив, фильтруют через сухой фильтр в чистую сухую колбу из иенского стекла и плотно закрывают резиновой пробкой.

Глицерин должен иметь плотность 1,26 и содержать лишь 1.5% воды. (краситель хорошо закрывать!)

Разбавление основного раствора. В химический стаканчик емкостью 50 см³ отмеряют 10 см³ прокипяченной или забуференной дистиллированной воды, приливают из градуированной пипетки каплями 0,3 см³ основного раствора Гимза и слегка покачивают (не встряхивать!). Если краситель сразу после разбавления выпадает, то раствор к употреблению не годен, так как его окрашивающая способность теряется. Причину надо искать в плохом качестве дистиллированной воды, в нечистой посуде или в слишком старом основном растворе.

Фиксация. Свежие, высушенные на воздухе препараты фиксируют в метиловом спирте 5-10 мин или в абсолютном спирте, или спирт-эфире 30 мин.

Метод. Предметные стекла обсушивают и помещают (мазком вверх) горизонтально в чашку петри на параллельные стеклянные палочки. Раствор краски разбавляют и сразу же наливают на мазки. Окрашивают 30-45 мин. Стряхивают раствор красителя, основательно опрыскивают кипяченой или забуференной дистиллированной водой, обсушивают на воздухе.

В случае перекраски дифференцируют в некипяченой воде. Заключают в кедровое, парафиновое масло или цедакс.

Результат. Ядра красно-фиолетовые. Эозинофильные гранулы красно-коричневые. Базофильные гранулы синие. Нейтрофильные гранулы красно-фиолетовые. Протоплазма лимфоцитов синяя. Эритроциты бледно-красные.

Окраска гематоксилином (по эрлиху)

1 г гематоксилина растворяют в 100 см³ 96%-ного спирта и прибавляют 100 см³ дистиллированной воды, 100 см³ чистого глицерина, 3 г калийных квасцов и 10 см³ ледяной уксусной кислоты. До употребления вначале светло-красный раствор должен созреть 14 дней в сосуде, прикрытом бумажным колпачком, при частом взбалтывании, пока он не примет темно-красный тон. При хранении в хорошо закрытом сосуде раствор остается годным в течение длительного времени.

Если в краситель взять вместо гематоксилина гематеин, то отпадает необходимость оставлять его для созревания.

Срезы из дистиллированной воды на 4-6 мин переносят в краску, пока хорошо не окрасятся ядра. Срезы, извлеченные из краски, имеют красный цвет и синеют лишь в обычной воде. После окраски уксусная кислота должна быть удалена промывкой в проточной воде (минимум 10 мин). Далее срезы на короткий срок погружают в воду со слабым раствором аммиака и затем снова промывают водой.

Окраска эозином

В продаже имеется эозин, растворимый в спирте, аг экстра, растворимый в воде, ва экстра синеватый, желтоватый, подэозин, эритрозин.

Обычно его употребляют в 0,1%-ном водном растворе.

Срезы после дистиллированной воды переносят в краситель на 3-5 мин. Затем проводят обезвоживание срезов, помещают их в ксилол; бальзам.

Окраска кислотным фуксином

Для дополнительных окрасок после гемалауна и, особенно, после железного гематоксилина пользуются кислотным фуксином (фуксин s), а также рубином s, оранжевым g, световым зеленым. Обычно употребляют 0,5-1%-ные водные растворы.

Можно также готовить следующим образом. Сначала готовят насыщенный раствор на дистиллированной воде; через 2 дня его разбавляют равным объемом 90%-ного спирта и хорошо перемешивают. Такие основные растворы очень хорошо сохраняются и интенсивно окрашивают. Для окраски разбавляют несколько кубических сантиметров основного раствора 20-50-кратным количеством воды.

Переокраска легко вытравляется отмытием в воде.

Окраска квасцовым кармином (по майеру)

В 200 см³ дистиллированной воды растворяют при нагревании 10 г калийных квасцов и затем 1 г карминовой кислоты. При охлаждении фильтруют и прибавляют для предохранения от плесени 0,2 г салициловой кислоты или 1 см³ формалина. Срезы из дистиллированной воды переносят на 15 мин в раствор красителя и после этого 2-3 мин промывают в дистиллированной воде. Если нужно подавить незначительную подкраску протоплазмы, препарат погружают после окраски на несколько секунд или минут в 0,5-1 %-ный водный раствор квасцов. Затем основательно промывают в воде.

Результат. Интенсивная, почти чистая окраска ядер.

Выявление РНК и ДНК пиронином метиловым зеленым (метод Браше)

Фиксация смесями карнуа, буэна.

Приготовление растворов метилового зеленого. Не обходимо очистить метиловый зеленый от примесей метилового фиолетового, который всегда содержится в красителе (в метиловом зеленом семь, а в метиловом фиолетовом шесть метальных групп). Для этого встряхивают водный раствор красителя с избытком хлороформа или амилового спирта, которые растворяют метиловый фиолетовый. Водный верхний слой затем отделяют для дальнейшего применения (желательно после 2-3 дней стояния).

Приготовление растворов метилового зеленого - пирони и а. Рекомендуется применять пиронин г или пиронин у.

Раствор а состоит из 17,5 см³ 5 %-ного водного раствора пиронина. 10 см³ 2 %-ного водного раствора метилового зеленого (промытого в хлороформе) и 250 см³ дистиллированной воды.

Раствор б представляет собой м/5 ацетатный буфер с рН 4,8.

Метод. Парафиновые срезы доводят до воды. Окрашивают раствором метилового зеленого - пиронином (10 мин). Промывают в дистиллированной воде в течение нескольких секунд (иначе вымывается пиронин).

Досуха промокают фильтровальной бумагой. Быстро обезвоживают в абсолютном ацетоне, споласкивают в смеси, состоящей из равных частей ацетона и ксилола, в 10 %-ном растворе ацетона в ксилоле. Просветляют в двух порциях чистого ксилола. заключают в бальзам.

Результат. Ядерный хроматин - ДНК окрашивается в зеленый, сине-зеленый или пурпурно-зеленый цвет, РНК - в красный.

Обоснование метода. Пиронином окрашивается РНК.

Однако пиронин может окрашивать и высокополимеризованную молекулу ДНК, хотя в 5-6 раз менее интенсивно. Деполимеризованная молекула ДНК окрашивается так же интенсивно, как и малополимеризованная молекула РНК. Применение обоих красителей - пиронина и метилового зеленого одновременно обнаруживало, что РНК и деполимеризованная днк окрашивались пиронином в розовый цвет, а полимеризованная только метиловым зеленым в зеленый цвет. Курник на основании этого пришел к заключению, что пиронин выявляет только разную степень полимеризации обеих нуклеиновых кислот, а не разницу в химическом составе.

Приготовление реактива шиффа (фуксинсернистая кислота). Качество фуксина из разных партий неодинаково, да и различные методы приготовления дают не вполне идентичные реактивы. В связи с этим пирс приводит три метода приготовления реактива, первый из которых особенно чувствителен к качеству фуксина. Обычно готовят образцы растворов из всех имеющихся в лаборатории партий фуксина, а когда находят удовлетворительный образец, из этой партии основного фуксина готовят нужное количество запасного раствора. Таким образом получают однородные результаты в течение длительного периода.

М е т о д. Срезы доводят до воды и удаляют остатки ртути, если необходимо. Быстро споласкивают в холодной i и msi . Помещают в i n но при 60° на оптимальный срок гидролиза. Быстро споласкивают в холодной i n $11c1$ и затем в дистиллированной воде. Переносят в раствор шиффа на оптимальное время (0,5-1 ч).

Осушают и споласкивают срезы в трех порциях свежеприготовленного раствора бисульфата калия

Споласкивают в воде. Если нужно, дополнительно окрашивают 1%-ным водным раствором светового зеленого в течение 1 мин или 0,5%-ным спиртовым раствором прочного зеленого в течение 0,5-1 мин. Обезвоживают в спиртах (70, 96, 100%). Просветляют в ксилоле и заключают в бальзам.

Результат. ДНК окрашивается в красновато-пурпурный цвет различных оттенков.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие.....	3
Часть I. Введение.	
Изучение строение клетки.	
Глава 1. Методы исследования клетки	
I. Оптические методы.....	3
А. Световая микроскопия.	
Б. Темнопольная микроскопия.	
В. Фазово-контрастная микроскопия.	
Г. Интерференционная микроскопия.	
II. Цитофизические методы.....	9
А. Метод поглощения рентгеновых лучей.	
Б. Метод радиоавтографии.	
III. Методы исследования ультраструктуры.....	12
А. Электронная микроскопия.	
IV. Микрохирургический метод.....	15
V. Метод ультрацентрифугирования.....	17
Глава 2. Общий план строения клеток прокариот и эукариот.....	17
I. Отличия в строении растительной и животной клетки.....	20
II. Изучения живых клеток.....	27
А. Клетки кожицы листа валлиснерии.	
Б. Строение клеток развивающихся листьев элодеи.	
В. Строение клеток сформированного листа элодеи.	
Г. Клетки плоского эпителия полости рта человека.	
Д. Клетки кожицы лука репчатого.	
III. Мембранные структуры клетки.	32
Мембраны клетки.	
Глава 3. Межклеточные контакты.....	39
А. Плотный контакт.	
Б. Щелевые контакты.	
В. Плазмодесменные связи растительных клеток.	
Г. Зубчатый контакт.	
Д. Синаптический контакт.	
Глава 4. Функции мембраны.	44
А. Транспортные функции мембраны.	
Б. Рецепторные функции плазмолеммы.	
Глава 5. Специализированные структуры плазматической мембраны.....	49
А. Микроворсинки.	
Б. Реснички и жгутики.	
Глава 6. Вакуолярная система. Цитоплазма.	52
I. Одно мембранные органоиды.....	53
А. Эндоплазматическая сеть.	

1. Шероховатая эндоплазматическая сеть или эргастоплазма.	
2. Гладкая эндоплазматическая сеть.	
Б. Аппарат Гольджи.	
В. Лизосомы.	
Г. Пероксисомы.	
Д. Сферосомы.	
Е. Вакуоли растительной клетки.	
II. Двумембранные органоиды.	71
А. Пластиды.	
Б. Митохондрии.	
III. Не мембранные компоненты клеток.	
Опорно-двигательная система.	79
А. Строение мышечных фибрилл.	
Б. Микрофиламенты.	
В. Промежуточные филаменты.	
Г. Микротрубочки.	
Д. Центриоли.	
Е. Рибосомы.	
Глава 7. Ядерный аппарат клетки.	
I. Ядро.	93
А. Нуклеиновые кислоты.	
Б. Хроматин и хромосомы.	
Глава 8. Воспроизведение клеток.	104
I. Митоз.	105
II. Амитоз.	111
III. Мейоз.	111
IV. Клеточный цикл.	117
Часть II. Методики приготовления гистологических препаратов, приведенных в руководстве.	118