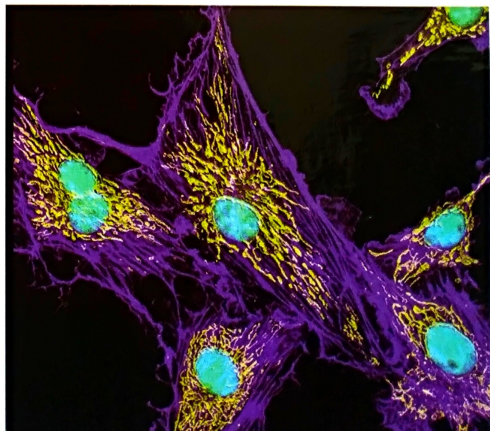
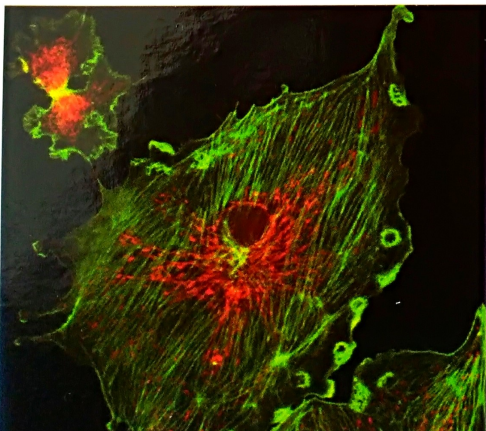
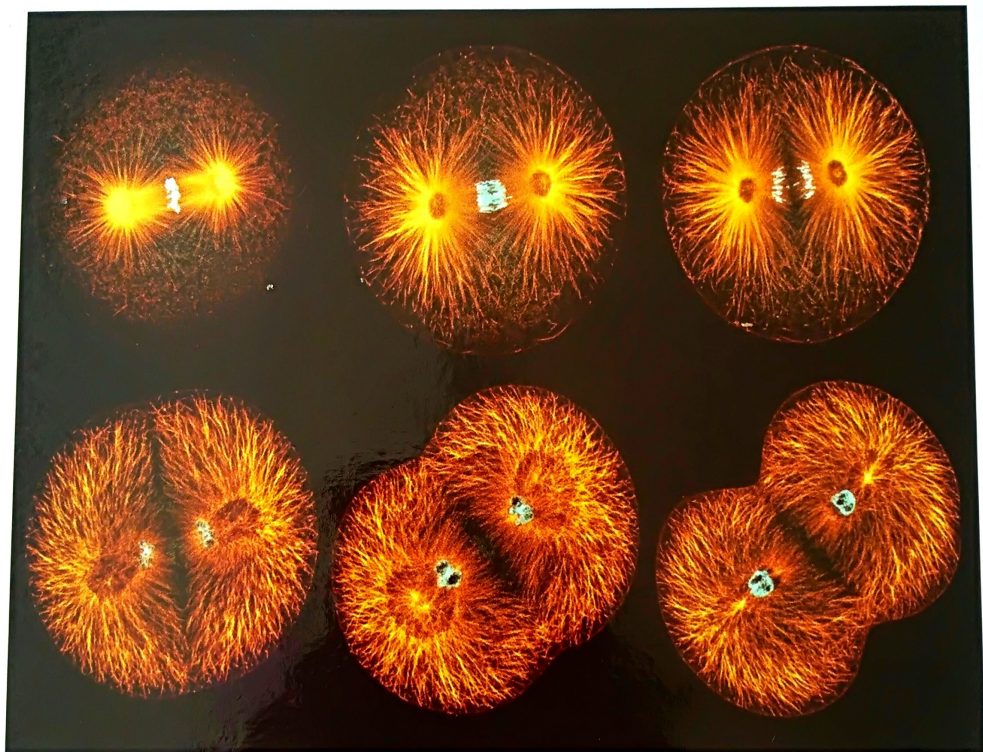


ЗАГАЛЬНА ЦИТОЛОГІЯ



МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ЗАГАЛЬНА ЦИТОЛОГІЯ

Підручник

УДК 576.3(075.8)
3-14

Автори:

М. Е. Держинський, Н. В. Скрипник, А. С. Пустовалов,
Г. В. Островська, І. М. Варенюк, О. К. Вороніна,
Л. М. Пазюк, С. М. Гарматіна

Рецензенти:

д-р біол. наук, проф. Н. В. Родіонова,
д-р мед. наук, проф. О. М. Грабовий,
д-р вет. наук, проф. В. Т. Хомич

*Рекомендовано до друку вченою радою
Навчально-наукового центру "Інститут біології"
(протокол № 1 від 21 вересня 2015 року)*

*Ухвалено науково-методичною радою
Київського національного університету імені Тараса Шевченка
(протокол № 2-15/16 н. р. від 23 грудня 2015 року)*

3-14 Загальна цитологія : підручник / М. Е. Держинський, Н. В. Скрипник, А. С. Пустовалов та ін. ; упорядкування Н. В. Скрипник. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2020. – 640 с.

ISBN 978-966-933-030-7

Системою викладено основи сучасної цитології з елементами молекулярної біології. Проаналізовано новітні уявлення щодо еволюції клітинної форми життя, основні етапи розвитку методів дослідження клітини. Наведено структурно-функціональний аналіз поверхневого апарату клітини і його участі в міжклітинній сигналізації та адгезії. Із сучасних позицій молекулярної біології висвітлено принципи структурно-функціональної організації цитозолу, клітинного ядра, органел. З урахуванням гістофізіологічних підходів розглянуто особливості функціонування клітини в нормі та висвітлено закономірності змін у її будові й функціях ультраклітинних структур із розвитком певних патологій. Наведено теоретичні та практичні аспекти застосування основних цитологічних прийомів, що ввійшли у практику біологів і патологів.

Для студентів біологічних факультетів закладів вищої освіти.

УДК 576.3(075.8)

ISBN 978-966-933-030-7 © Держинський М. Е., Скрипник Н. В., Пустовалов А. С. та ін., 2020
© Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
ВПЦ "Київський університет", 2020

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АГ	– апарат Гольджі
АДФ	– аденозиндифосфат
АМФ	– аденозинмонофосфат
АСМ	– атомно-силові мікроскопи
АТФ	– аденозинтрифосфат
БОМ	– близькопольний оптичний мікроскоп
ГАГ	– глікозаміноглікани
ГАМК	– γ -аміноасляна кислота
ГДФ	– гуанозиндифосфат
глЕПС	– гладенька ендоплазматична сітка
грЕПС	– гранулярна ендоплазматична сітка
ГТФ	– гуанозинтрифосфат
гяРНК	– гетерогенна ядерна рибонуклеїнова кислота
ДАГ	– діацилгліцерол
ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота
ЕПС	– ендоплазматична сітка
ІФ ₃	– інозитолтрифосфат
КоА	– кофермент А
ММК	– міжмітохондріальні контакти
мРНК	– матрична рибонуклеїнова кислота
мяРНК	– мала ядерна рибонуклеїнова кислота
НАДФ ⁺	– нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат
ПКС	– протеїнкаіназа С
РНК	– рибонуклеїнова кислота
рДНК	– гени рибосомних РНК

- рРНК – рибосомна рибонуклеїнова кислота
- СЗМ – сканувальний зондовий мікроскоп
- СРЧ – частка, що розпізнає сигнал
- тРНК – транспортна рибонуклеїнова кислота
- ФАД – флавінаденіндинуклеотид
- цАМФ – циклічний аденозинмонофосфат
- цГМФ – циклічний гуанозинмонофосфат
- ЦОМТ – центри організації мікротрубочок
- ЯОР – ядерцеорганізуючі регіони
- S – одиниця Сведберга

ВСТУП

Клітинна форма організації живого, виникнувши свого часу, стала основою всього подальшого розвитку органічного світу. Еволюція бактерій, найпростіших, синьозелених водоростей, інших організмів цілком відбувалась за рахунок структурних, функціональних і біохімічних перебудовань клітини. У ході цієї еволюції з'явилися надзвичайно різноманітні клітинні форми, однак загалом будова клітини принципових змін не зазнала.

Виникнення багатоклітинності різко поширило можливості прогресивної еволюції органічних форм. Центр "еволюційної активності" перемістився з рівня клітинного на рівні вищого порядку – тканинний, органний, організменний і популяційний, проте зміни клітинної структури не втратили при цьому свого еволюційного значення. Так, у тканинних клітинах у ході еволюції закріплюються особливості, корисні для індивіда й виду в цілому: клітина стає підпорядкованою частиною цілісного організму. Із його розвитком структура та функції клітин зазнають найрізноманітніших змін, зумовлених потребами цілісного організму (навіть якщо при цьому клітині завдається "індивідуальна шкода"). Наприклад, особливості функціонування деяких секреторних клітин пов'язані з їхньою загибеллю, нервових – з утратою здатності до розмноження тощо.

Значення клітини як елементарної структурної та функціональної одиниці живого, як центру біохімічних реакцій, що відбуваються в організмі, та як носія матеріальної основи спадковості робить цитологію однією із найважливіших загальнобіологічних дисциплін.

Прогрес у будь-якій галузі науки суттєво змінює її проблематику, ставить перед нею нові завдання. Успіхи у вивченні клітини різко розширили коло питань, на вирішення яких направлені зусилля сучасних цитологів. Увагу науковців сьогодні прикуто до таких сфер, як ультратонка будова клітини і клітинних орга-

нел, регуляція фізіологічної та біохімічної активності клітин. Величезний інтерес викликають проблеми, пов'язані з механізмами міжклітинної комунікації та регуляції клітинної спадковості. Практичного значення, недооцінити яке неможливо, набувають питання патогенезу на рівні клітини.

Книга містить необхідні відомості як для отримання фундаментальних теоретичних знань із цитології, так і для засвоєння основних сучасних методичних прийомів клітинної біології. Ураховуючи величезний науково-теоретичний і практичний спадок сучасної цитології, а також нинішні високі темпи розвитку біології клітини, автори намагалися викласти базові основи сучасної цитології від класичних положень до найновіших досягнень і перспектив.

Розділ 1

СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО ЕВОЛЮЦІЮ КЛІТИНИ

Еволюційна теорія є осовим стрижнем сучасної біології, який дозволяє зрозуміти величезне різноманіття органічного світу. Сучасна наука вважає, що в основі еволюції лежать два головні процеси. Це, по-перше, випадкові зміни генетичної інформації, які передаються від організму його нащадкам, по-друге – відбір генетичної інформації, що сприяє виживанню та розмноженню своїх носіїв. Можна вважати, що біологічні молекули, які існують нині, дозволяють судити про еволюційний шлях, демонструючи фундаментальну подібність між найбільш далекими живими організмами та виявляючи певні відмінності між ними.

Саме виявлення фундаментальної подібності між живими організмами дозволило сформулювати низку характеристик (особливостей) живих об'єктів (*властивості живого*), до яких відносять:

- обмін речовиною та енергією із зовнішнім середовищем, перетворення речовин та енергії (*метаболізм*);
- здатність підтримувати сталість внутрішнього середовища (*гомеостаз*);
- *здатність до росту й розвитку*, тобто до ускладнення будови;
- *відтворення (розмноження)* – здатність до утворення нових організмів;
- *спадковість* – здатність організмів передавати наступному поколінню свої ознаки і властивості, тобто здатність відтворювати собі подібних;

- **мінливість** – властивість, протилежна спадковості, пов'язана з набуттям організмами нових властивостей, наслідком чого є різноманітність живого;
- **подразливість** – здатність сприймати інформацію із зовнішнього середовища й відповідати на зовнішній вплив;
- **дискретність** (від лат. *discretus* – переривчастий, складений із окремих частин) – наявність розривів (*хіатусів*), меж між окремими складовими (елементами) живих систем (організмів, видів, біогеоценозів);
- **подібність хімічного складу** живого.

Ключову роль у функціонуванні живих систем відіграють білки, тоді як нуклеїнові кислоти кодуєть послідовність амінокислот у білкових молекулах (важливо, що до складу живих істот входять лише L-амінокислоти й нуклеїнові кислоти, що містять D-цукри (*хіральність живого*)).

Більшість властивостей живих організмів пов'язана з тим, що вони є **складними системами відкритого типу**. Перша із перерахованих властивостей саме й описує живе як відкриту систему, на відміну від систем закритого типу, позбавлених можливості обмінюватись із навколишнім середовищем речовиною та енергією. Належність живого до відкритих систем визначає його антиентропійні властивості (**ентропія** – міра неупорядкованості системи), тобто здатність до ускладнення власної структури, збільшення ступеня впорядкованості.

ВІД МОЛЕКУЛ ДО ПЕРШОЇ КЛІТИНИ

Умови, які існували на Землі в перший мільярд років її історії, залишаються дискусійними. Однак цілий ряд положень сьогодні не викликає сумніву. Так, очевидною є практично повна відсутність кисню в атмосфері близько 4,0 млрд років тому, а отже, і озонового шару, який поглинає в наш час жорстке ультрафіолетове випромінювання. Серед інших газів домінував азот, але саме в цей період у результаті вулканічної діяльності розпочалося виділення із земних надр парів води, метану, дво-

окси вуглецю. Найпевніше, тиск на поверхні планети був значно нижчим за сучасні показники й лише згодом почав зростати. Середні значення температури становили дещо нижче нуля, проте в екваторіальній зоні було суттєво тепліше, ніж у полярних зонах. Поверхня планети складалася із дрібнопористого реголіту, що містив значні кількості неокисненого заліза. Наявність великих кількостей цього відновника в поверхневих шарах планети запобігала значному підняттю рівня кисню в атмосфері протягом більшої частини історії планети. Саме за таких умов, як вважають, виникло життя на Землі.

Питання про походження життя, з одного боку, є питанням появи складної відкритої системи, а з іншого – появи живої клітини, що має ліпідну плазматичну мембрану, апарат спадковості з нуклеїнових кислот, білки як основні функціональні елементи тощо. Тобто, важливим питанням постає саме поява перших органічних молекул, які б мали змогу об'єднуватись у більш складні структури в умовах, що існували близько 4,0 млрд років тому.

Лабораторні експерименти підтвердили можливість такого процесу. У 1953 р. американський учений С. Міллер у колбі з газовою сумішшю, яка відповідала складу первинної атмосфери Землі, за допомогою електричних розрядів, що імітують грози, синтезував деякі органічні сполуки. Було отримано ряд малих органічних молекул, таких як формальдегід, гліцин, оцтова, мурашина, молочна, синильна й аспарагінова кислоти, аланін, саркозин, сечовина.

Слід підкреслити, що серед утворених продуктів є деякі сполуки, такі як ціанистий водень (HCN) і формальдегід (HCHO), котрі легко вступають у наступні реакції у водному розчині. Проте найважливішим є те, що в експерименті вдалося отримати чотири основні класи внутрішньоклітинних малих молекул: амінокислоти, нуклеотиди, цукри й жирні кислоти, які, до того ж, утворюються досить легко.

Структурно-функціональні дослідження простих органічних молекул показали, що амінокислоти й нуклеотиди здатні, крім того, асоціюватися з утворенням великих полімерів. У 1957 р.

С. Фокс довів можливість безматричного синтезу поліпептидів. Більш того, поліпептиди були знайдені серед іншої простої органіки в речовині метеоритів (синтез поліпептидів, як з'ясувалося, є можливим навіть в умовах космічного простору). Виявився можливим також і синтез полінуклеотидів.

Здатність до утворення складних композицій із атомів стала важливою особливістю біогенної форми локалізації хімічних елементів у природі. Сьогодні практично не викликає сумніву, що біогенезу передувала хімічна еволюція, спрямована на стабілізацію таких молекулярних структур.

Упорядкування всередині біосфери відбувається шляхом кругообігу речовин, біогеохімічних циклів. Отже, із загальнопланетарного погляду, життя – це спосіб упорядкування та стабілізації геохімічних кругообігів. Однак самі кругообіги виникають як природний наслідок тих умов, що склалися в Сонячній системі.

У космічному просторі температура лише на 4° вища за абсолютний нуль. Однак за рахунок сонячного випромінювання Земля нагрівається, унаслідок чого виникає температурний градієнт між планетою та оточуючим її космосом. Якщо на планеті є атмосфера й гідросфера, тобто достатньо рухлива оболонка, то температурний градієнт за рахунок конвекції неминуче породжує в ній фізико-хімічний кругообіг, до якого залучається і тверда оболонка планети – кора вивітрювання. Отже, у результаті взаємодії атмосфери, гідросфери й літосфери Землі завдяки енергії Сонця та земних надр виникає глобальний геохімічний цикл – прообраз біосфери, розподілений на локальні геохімічні цикли (попередники біоценозів). У більш вирашному становищі перебувають ті кругообіги, що мають найефективніші каталізатори.

Хімічний добір (не плутати з природним добором) – явище з хімії відкритих систем, яке полягає в тому, що у відкритій системі основну частину субстрату переробляє та реакція, яка проходить швидше, ніж усі інші. На відміну від звичайної хімії, де реакції відбуваються лише в бік хімічної рівноваги, у хімії відкритих систем напрямок перебігу реакції залежить від напрямків потоків речовин.

Еволюційна поведінка, керована добором, заснована на самовідтворенні та інформаційному шумі (помилки, випадкові відхилення, мутації). Цих двох властивостей загалом достатньо для виникнення системи з прогресуючою складністю. Здатність підлягати дії добору та еволюціонувати в бік прогресуючої складності організації мають нелінійні автокаталітичні ланцюги – *гіперцикли*. Варіантом такої системи є згадані вище геохімічні кругообіги.

Саме гіперцикл, суто хімічний процес, є тим критичним рівнем, із якого складність системи припиняє бути виродженою, а отже, починає зростати. Організація окремих надскладних гіперциклів у вигляді протоклітин підвищувала конкурентоспроможність інших подібних циклів, неминуче приводила до витіснення простіших неклітинних систем у зони з меншим потоком енергії з подальшим зникненням примітивних гіперциклів.

Де були локалізовані ці перші комплекси органічних сполук, що започаткували еволюцію життя на нашій планеті? Важливою характеристикою цих ділянок поверхні нашої планети має бути здатність накопичувати у великих концентраціях окремі органічні сполуки та наявність доступних потужних потоків енергії, що давало б шанс на подальші перетворення. Подібних зон накопичення органіки було декілька. Так, саме в той період починається утворення перших протоокеанів та мікроконтинентів. У центральних частинах океанічної кори виникають перші серединно-океанічні хребти, у зоні яких могли утворюватися перші протобіоценози, які б використовували потужні потоки енергії, що вивільнювалися в цих ділянках літосфери. Іншими перспективними з точки зору абіогенного синтезу простих органічних сполук місцями були узбережжя протоокеанів, біля яких ішов процес активного виплавлення ранньої континентальної кори. Саме в місцях активних тектонічних процесів, вулканізму на так званих *геотермальних полях*, де конденсувалася волога, що надходила із земних надр, проходили перші етапи процесу виникнення життя. Ці заповнені конденсованою вологою ділянки були багаті на іони калію, фосфати, сульфідні металів.

Жорстке ультрафіолетове випромінювання забезпечувало необхідну енергію для синтетичних процесів. Каталіз органічних реакцій забезпечували неорганічні сполуки, що становили літосферну частину давніх протобіоценозів. Це було неокиснене залізо та його сполуки (наприклад, пірити), сполуки цинку, мангану тощо. Важливою характеристикою цих абіотичних складових перших "фабрик" органічних молекул була дрібнопористість. Саме такою породою був реголіт – основна порода давньої поверхні планети, свою роль у накопиченні та перетворенні органічних речовин відігравали фрамбоїдальні (губчасті) форми піритів та пористі силікатні утворення. Ключову ж роль у процесах хімічної еволюції, імовірно, зіграли сполуки цинку (зокрема ZnS), які також брали участь в утворенні дрібнопористих структур. Саме цинковмісні молекули виявляються закодованими у генах з найдавніших груп. З іншого боку, саме сполуки цинку здатні до каталітичного забезпечення перших ключових етапів добіогенного синтезу органічних молекул: амінокислот та нуклеотидів.

Беручи до уваги унікальні властивості нуклеотидів і, разом із тим, їхню універсальність, можна припустити, що саме вони стали тією вдалою хімічною конструкцією, яка забезпечила перехід хімічної еволюції в біологічну. З погляду еволюції нуклеотиди виявилися поліфункціональними сполуками. Не кажучи вже про ДНК і РНК, згадаємо, що пурини з незначними модифікаціями нині представлені у вигляді макроергів (основного джерела вільної енергії – АТФ) та універсальних регуляторів біохімічних процесів (у вигляді циклічних нуклеотидів – цАМФ, цГМФ). Аденін у вигляді нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату (НАДФ⁺), флавінаденіндинуклеотиду (ФАД) і коферменту А (КоА) входить до складу ключових ферментів, залучених до механізмів енергозабезпечення метаболічних реакцій. Аденін утворюється при спонтанній полімеризації HCN, а рибоза є одним із продуктів полімеризації формальдегіду (автокаталітична реакція Бутлерова). Обидві сполуки є необхідними елементами для синтезу АТФ, який також спонтанно синтезувався в ті далекі часи.

Також спонтанно, шляхом подвоєння комплементарних основ, синтезувалися копії молекул РНК. Ці реакції відбувалися без участі ферментів чи інших білків. У 1982 р. Т. Чек показав, що молекули РНК самі можуть виявляти каталітичну активність, тобто бути ферментами (рибозимами). Можливу проміжну роль у процесі виникнення реплікації РНК зіграла інша група сполук: *поліциклічні ароматичні вуглеводні*, що могли на ранніх етапах ініціювати та полегшувати цей процес. З появою здатних до самовідтворення молекул рибозимів гіперцикли, до складу яких увійшли ці речовини, набули значної переваги й практично витіснили решту завдяки механізму хімічного добору.

Як відомо, саме полінуклеотиди демонструють специфічні властивості, притаманні лише живим структурам, а саме матричне самовідтворення на основі інформації про особливості власної будови: полінуклеотиди можуть служити матрицею в реакції полімеризації і, таким чином, зумовлювати послідовність нуклеотидів у нових полінуклеотидах. Подібні матричні властивості базуються на специфічному, так званому комплементарному зв'язуванні полінуклеотидів Ц (цитозин) – Г (гуанін), А (аденін) – Т (тимін). Специфічне спарювання комплементарних нуклеотидів зіграло, як вважають сьогодні, вирішальну роль у виникненні життя. Так, при копіюванні полінуклеотиду, подібного до РНК, на першій стадії інформація, що міститься у вихідному ланцюзі, зберігається в новоутворених комплементарних ланцюгах. На другому етапі копіювання з використанням їх як матриці відновлює вихідну послідовність.

Прості й ефективні механізми комплементарного матричного копіювання є основними у процесах перенесення інформації в біологічних системах. Генетична інформація кожної клітини нині закодована в послідовності основ її полінуклеотидів і передається як спадщина завдяки комплементарному спарюванню основ.

Проте в будь-якому процесі копіювання можливі помилки й "розмноження" неточної копії оригіналу. А отже, у результаті численних циклів реплікації формується послідовність нуклео-

тидів, що суттєво відрізняється (структурно й функціонально) від вихідної – так формується різноманіття молекул. Конкретна послідовність нуклеотидів зумовлює властивості молекули, особливо її конформацію в розчині. А тривимірна упаковка полінуклеотиду впливає на його стабільність і здатність реплікуватися. У результаті молекули реплікативної суміші матимуть різну здатність до "розмноження". У випадку РНК відмінності, що виникали, спричинювали ще й функціональну дивергенцію молекул, скажімо, виникнення нових каталітичних властивостей тощо.

Зрозуміти закономірності хімічної еволюції молекулярних комплексів, а також їхню можливу роль у процесі виникнення та еволюційного "вдосконалення" сучасних форм життя вдалося лише на основі детального аналізу їхніх біохімічних властивостей. Історія вивчення нуклеїнових кислот почалася в середині ХІХ ст. З ім'ям Ф. Мішера пов'язують відкриття в 1869 р. нуклеїнових ("ядерних") кислот, хоча сам термін з'явився пізніше – у 1889 р. А. Кьоссель у 1891 р., провівши гідроліз нуклеїнових кислот, показав, що вони складаються із залишку цукру, фосфорної кислоти та пуринових і піримідинових азотистих основ. Залежно від природи цукру, він поділив нуклеїнові кислоти на два типи: рибонуклеїнові (РНК) і дезоксирибонуклеїнові (ДНК). Було встановлено, що первинною структурою нуклеїнових кислот є ланцюг нуклеотидів, зв'язаних ковалентним 5'–3'-фосфодієфірним зв'язком. Полімерну ж природу цих кислот виявлено лише в 30-х рр. ХХ ст. й установлено, що їхня вторинна структура утворюється завдяки водневим зв'язкам між комплементарними основами.

Сама по собі вторинна структура нуклеїнових кислот є нестійкою, однак саме вона відповідає за формування третинної структури нуклеїнових кислот, яка є жорстко визначеною. Так, деякі ділянки молекул РНК (на частку яких від загальної маси нуклеїнових кислот у організмі хребетних припадає 5–10 %) містять комплементарні послідовності, здатні взаємодіяти з утворенням водневих зв'язків, що зумовлює формування "шпильок" – специфічних вигинів на одноланцю-

говій молекулі РНК, утворення яких стабілізує просторову структуру молекули.

Серед полімерних РНК найхарактернішу просторову структуру має тРНК (транспортна РНК, крім якої виділяють ще два види: інформаційну, або матричну РНК (іРНК, або мРНК), і рибосомну РНК (рРНК)), первинну структуру якої в 1965 р. установив Р. Холлі. Він же запропонував і модель її вторинної структури – "листок конюшини". Пізніше зусиллями дослідницьких груп А. Річа й А. Клуга було встановлено третинну структуру тРНК. З'ясувалось, що "листок конюшини" у просторі згинається, нагадуючи латинську літеру *L*. Подальшими лабораторними дослідженнями функціональних особливостей РНК було показано, що її молекули у процесі копіювання підлягають дії певного природного добору, за якого, залежно від конкретних умов, починає переважати та чи інша послідовність. Слід зазначити, що на сьогодні виявлено багато різновидів РНК, які відрізняються за особливістю вторинної структури своїх молекул та функціями у клітинах.

Отже, молекула РНК має дві важливі властивості: закодована в її нуклеотидній послідовності інформація передається в процесі реплікації, а унікальна просторова структура зумовлює характер взаємодії з іншими молекулами та реакцію на зовнішні умови. Обидві ці властивості – інформаційна та функціональна – є необхідними передумовами еволюційного процесу. Нуклеотидна послідовність молекули РНК аналогічна спадковій інформації, або генотипу організму, а просторова упаковка – фенотипу – сукупності ознак організму, які підлягають дії природного добору.

Відомо, що природний добір залежить від умов довкілля. Для молекули РНК, яка реплікується, критичним компонентом середовища є набір інших молекул РНК у ньому. Крім того, що ці молекули є матрицями у процесі власної реплікації, вони можуть каталізувати руйнування та утворення ковалентних зв'язків, у тому числі й зв'язків між нуклеотидами. Деякі спеціалізовані молекули РНК здатні каталізувати зміни в інших її молекулах, розрізаючи нуклеотидну послідовність у певній то-

чці, інші типи молекул РНК здатні вирізати частину своєї власної нуклеотидної послідовності та з'єднувати відрізані кінці (сплайсинг). Кожна реакція, що каталізується РНК, залежить від специфічного розташування атомів на поверхні каталітичної молекули РНК. Це приводить до того, що один або декілька нуклеотидів стають високоактивними.

Отже, 4,0–3,8 млрд років тому самореплікація молекул РНК започаткувала справжній еволюційний процес. Системи з різним набором послідовностей нуклеотидів конкурували за запаси попередників, необхідних їм для побудування копій (аналогічно тому, як конкурують тепер організми за харчові ресурси). Успіх залежав від точності та швидкості копіювання, а також від стабільності копій.

Хоча структура полінуклеотидів добре пристосована для збереження й передачі (реплікації) інформації, каталітичні можливості молекул РНК явно обмежені для забезпечення всіх функцій сучасної клітини. Більша універсальність притаманна поліпептидам, котрі складаються з амінокислот із хімічно різноманітними бічними ланцюгами та здатні утворювати різні просторові форми, насичені реакційно активними ділянками. Властивості поліпептидів роблять їх ідеальними для виконання численних структурних і функціональних завдань. Навіть поліпептиди з випадковою послідовністю, які виникали за дії добіотичних синтетичних механізмів, очевидно, мали каталітичні властивості, направлені щонайменше на полегшення реплікації РНК. Полінуклеотиди, які сприяли синтезові "корисних" поліпептидів у своєму оточенні, мали отримати більшу перевагу в боротьбі за існування. Але яким чином полінуклеотиди могли здійснювати подібний контроль? Як інформація, закодована в їхній послідовності, могла визначати послідовність полімерів іншого типу? Ясно, що полінуклеотиди мали діяти як каталізатори для збирання відібраних амінокислот. У сучасних організмів узгоджена система молекул РНК направляє синтез поліпептидів, тобто синтез білка, однак цей процес відбувається за участю інших білків, синтезованих попередньо. Існує припущення, що молекули РНК на самому початку направляли

перший синтез білка без допомоги інших білків, взаємодіючи між собою за принципом комплементарності (відповідності).

Сьогодні збирання нових білків у клітині відбувається за участю рибосом, які містять декілька молекул РНК і понад 50 різних типів білків. Але саме рибосомній РНК належить роль головного каталізатора в ході синтезу білка: ензиматично компетентні ділянки рибосомної РНК мають пептидилтрансферазну активність і здатні каталізувати реакції транспептидації (нарощування поліпептидного ланцюга амінокислот) у процесі трансляційного білкового синтезу (біосинтез білка буде детально розглянуто у розділі 9).

Слід зауважити, що одним із давніх шляхів синтезу поліпептидів міг бути й безматричний синтез. Так, у сучасних клітинах деякі короткі поліпептиди синтезуються без участі рибосом. Такі молекули збираються з окремих амінокислот у потрібній послідовності за допомогою ферментів *пептидсинтеаз*. Подібним шляхом синтезуються, зокрема, антибіотики із групи глікопептидів (ванкоміцин, рістоцетин, тейкопланін).

Проте, беручи до уваги здатність РНК до каталізу різних реакцій, можна припускати, що на певному етапі саме каталітично активні молекули РНК свого часу примітивним чином направляли первинний синтез білків. Однак для ефективнішого біосинтезу треба було створити набір "інструментів", вірогідно білків, для полегшення як самої реплікації, так і синтезу самих "інструментів".

Синтез специфічних білків "під управлінням РНК" вимагав створення певного коду, за допомогою якого полінуклеотидна послідовність зумовлювала б послідовність амінокислот білка. Цей генетичний код, вибраний швидше за все випадково, залишається практично однаковим у всіх живих організмів. Разом із тим, не виключено, що певна хімічна спорідненість між різними типами амінокислот і короткими послідовностями РНК (триплетами) все ж існує. Це питання, однак, залишається малодослідженим. Так чи інакше, спочатку генетичний код був "двобуквеним", тобто значущими були нуклеотиди лише в першому та другому положенні, а третій нуклеотид триплету

виконував функцію "розділового знаку". У такий спосіб було закодовано 16 різних амінокислот. Навіть тепер цілий ряд кодонів, що відрізняються лише третьою "буквою", є синонімічними (так кодуються амінокислоти серин, пролін, треонін, аланін тощо). Лише згодом у деяких випадках стало важливим питання про вміст у третьому положенні пуринової чи піримідинової основи (так відрізняється кодування гістидину та глутаміну, аспарагінової та глутамінової кислот тощо). І лише в поодиноких випадках третя "буква" стала цілком значущою (кодування метіоніну, триптофану). Загалом вважається, що всі сучасні клітини є нащадками однієї примітивної лінії клітин, яка зуміла "розробити" ефективний механізм синтезу білка і, відповідно, сучасного генетичного коду, котрий за подальші мільярди років зазнав лише незначних змін в окремих еволюційних гілках.

Як тільки еволюція нуклеїнових кислот просунулась до кодування ферментів, що забезпечують їхнє власне відновлення, поширення реплікативної системи повинно було різко прискоритися.

ФОРМУВАННЯ ЗОВНІШНЬОЇ МЕМБРАНИ ЯК КЛЮЧОВИЙ МОМЕНТ В ЕВОЛЮЦІЇ КЛІТИННИХ ФОРМ

Якщо розвиток еволюційних подій за наведеним сценарієм є досить прийнятним, то далеким від розуміння залишається питання, на якому етапі хімічної еволюції починається власне виникнення життя та яким міг бути механізм цього процесу. Так чи інакше, найвагомішим фактором виникнення життя стало забезпечення умов для перебігу "необхідних" реакцій, оскільки зрозуміло, що у відкритій системі можливості для сприятливих хімічних трансформацій часто відсутні у зв'язку з певними кінетичними й термодинамічними обмеженнями. У необмеженому просторі, де за добіологічних умов, як припускають, відбувалася

спонтанна полімеризація нуклеотидів чи амінокислот, стан новоутворених форм мав бути дуже нестійким. Причиною цього мало бути "намагання" зовнішнього середовища (найімовірніше, його водної фази) досягти максимальної ентропії. Розв'язати проблему створення оптимальних умов для біогенезу можна було шляхом досягнення повної молекулярної комплементарності системи, що посилювало б енергію зв'язування в ній. Але для багатьох молекулярних структур, а особливо для полімерів пептидної та нуклеотидної природи, це виявилось неприйнятним, на заваді стали особливості просторової організації їхніх молекул. І природа "використала" іншу, можливо, єдину правильну альтернативу – створення "індивідуальних" умов для тривалого існування "потрібних" для біогенезу молекул, ізоляцію їх від агресивного довкілля.

Справді, білки, що синтезувалися під контролем певного типу РНК, не могли б полегшити репродукцію саме цих молекул РНК, якщо б не утримувалися поблизу них. Більш того, поки білки вільно дифундували б у популяції РНК-реплікантів, вони рівною мірою сприяли б розмноженню будь якого із конкуруючих видів РНК. І якщо виникла РНК, котра кодує "поліпшений" тип ферменту, новий фермент не здатний був би вибірково забезпечити "виживання" саме цієї РНК. Добір молекул РНК за якістю білків, які вони кодують, не міг початися раніше, ніж з'явився замкнутий об'єм (компаратмент), що замкнув у собі білки, утворені молекулою РНК. Отже, ці білки стають доступні лише для РНК, що їх "породила".

Викладене вище робить зрозумілим той факт, що однією з вирішальних подій, які зумовили формування першої клітини, було формування зовнішньої мембрани, що відокремила окремі гіперцикли один від одного з утворенням фактично окремих організмів. Слід відзначити, що навіть перші протоорганізми не існували у безбережному просторі океанів. Вище зазначалось, що літосферна складова перших протобіоценозів була сформована дрібнопористими породами (на зразок реголіту), багатими на сполуки заліза, цинку, мангану тощо. Саме дрібнопористі матеріали адсорбували органічні речовини, каталізували їхнє

перетворення та, водночас, створювали перший праобраз розподілу життя по окремих компартментах (компартменталізацію). Однак геологічні зміни, які впродовж перших кількох сотень мільйонів років існування життя значно змінювали зовнішній вигляд нашої планети, приводили до поступового руйнування таких первинних дрібнопористих матеріалів. Також створення власних мембранних структур протоклітинами диктувалося і необхідністю освоєння відкритого простору океанів, де не існувало природних пористих структур.

Ключова роль в еволюції клітинних мембран належить, очевидно, класу амфіпатичних молекул (ліпідів), які мають одну *гідрофобну* (нерозчинну у воді), а іншу *гідрофільну* (розчинну у воді) частини. Коли такі молекули потрапляють у воду, вони розташовуються так, що їхні гідрофобні частини тісно контактують одна з одною, а гідрофільні – з водою. Амфіпатичні молекули здатні спонтанно агрегувати, утворюючи структури у вигляді замкнених пухирців із водним вмістом, ізольованим від зовнішнього середовища (детально питання будови плазматичної мембрани проаналізовано в розд. 3). На сьогодні існують ліпідні мембрани двох окремих типів: на основі фосфоліпідів (притаманні бактеріям та еукаріотам) і на основі ізопреноїдів (характерні для групи архебактерій, або архей). Саме другий тип, імовірно, був вихідним під час виникнення ліпідної плазматичної мембрани. І саме такого типу мембрану скоріш за все мав останній універсальний спільний предок усіх нині існуючих організмів – *LUCA* (*last universal common ancestor*), який жив приблизно 3,5–3,8 млрд років тому. Цей організм не був ні першим, ні найпростішим із живих істот на планеті: одночасно з ним існувало багато інших організмів, протоклітин, гіперциклів, які, однак, вимерли, не залишивши нині існуючих нащадків.

На відміну від фосфоліпідів (про які докладніше йтиметься нижче), для ізопреноїдних мембран архебактерій характерна будова гідрофобної ділянки мембрани з розгалужених ізопреноїдних ланцюгів, зазвичай поєднаних кінцями таким чином, що мембрана стає не бішаром, а моношаровою структурою. Цей вихідний тип мембран забезпечує їхню високу сталість при під-

вищенні температури, завдяки чому він зберігся у архей, що займають ніші екстремальних термофілів. Водночас, у групі еубактерій незабаром виникає інша форма ліпідних мембран на основі фосфоліпідів, яка й забезпечила широку дивергенцію цієї групи. Ізопреноїдні мембрани залишались характерними довгий час і для предків еукаріотів, що є ближчими родичами архей, ніж бактерії. Однак після симбіозу з предками мітохондрій (див. нижче) еукаріоти також поступово переходять на бактеріальну (фосфоліпідну) модель будови мембран. Ізопреноїди в мембранах еукаріотів залишились як виняток у тих випадках, коли вони задіяні в метаболічних перетвореннях (наприклад, ізопреноїд доліхол, що бере участь у синтезі олігосахаридів (детальніше ці процеси описано в розд. 10)).

За своєю просторовою організацією замкнута сферична форма мембрани, основу якої становлять ліпіди, є термодинамічно вигідною порівняно з іншими можливими варіантами розташування молекул. Крім того, конформаційна специфіка бішарової ліпідної мембрани передбачає автономність щодо зовнішнього середовища й одночасно селективний і контрольований зв'язок із ним. Зрозуміло, що утворена вдала форма закріпилася у процесі еволюції та створила передумови для формування механізмів гомеостазу, які стали одним із головних принципів феномену життя. Усі нині існуючі клітини оточені плазматичною мембраною, що складається з таких амфіпатичних молекул, переважно фосфоліпідів і білків.

Фосфоліпіди – одна із груп ліпідів, які є похідними жирних кислот, спиртів і альдегідів. Гідрофобні властивості сполук цієї групи (як і класу ліпідів загалом) зумовлені здебільшого наявністю в їхніх молекулах залишків вищих жирних кислот. До складу природних жирів, як правило, входять жирні кислоти з парним числом атомів карбону, оскільки вони синтезуються із двокарбонних одиниць, які утворюють нерозгалужений ланцюг карбонних атомів. Ланцюг може бути *насиченим* (не мати подвійних зв'язків) і *ненасиченим* (містити один чи більше подвійних зв'язків).

Молекули фосфоліпідів (або фосфогліцеридів) є похідними гліцеролу й містять крім гідрофобних залишків гідрофільні ком-

поненти, до яких належать фосфорна кислота, спирти (холін, етаноламін), амінокислоти й багатоатомні спирти. Саме гідрофільні замісники визначають структурну різноманітність природних гліцерофосфоліпідів. Крім того, полярні групи надають молекулам фосфоліпідів здатності до взаємодії з водними розчинами електролітів. Фосфоліпіди, як і нейтральні ліпіди, існують у різних поліморфних формах, перехід між якими за фізіологічних умов здійснюється в разі зміни температури. При зростанні температури фосфоліпіди "плавляться" (проходячи через рідинно-кристалічний стан), гідрофобні ділянки молекули, котрі містять ацильні або алкільні залишки, "плавляться" при цьому за більш низької температури, ніж уся молекула фосфоліпиду. Відмітимо, що здатність молекул фосфоліпідів до термотропних переходів має велике значення для регулювання функціональної активності білково-ліпідних комплексів у сучасних мембранах.

Незважаючи на те, що закони співіснування білків і ліпідів у сучасній мембрані та її штучних аналогах досить добре вивчено, ще й сьогодні не зовсім зрозуміло, у який саме момент еволюції біологічного каталізу були сформовані перші клітини. Вони могли з'явитися, коли молекули ліпідів добіотичного бульйону випадково зібралися в мембранну структуру, яка замкнула в собі суміш каталітичних молекул РНК, що реплікувалися. Можливу роль зіграли в цьому процесі інші молекули амфіпатичної природи (наприклад, поліароматичні вуглеводні) або конденсація амфіпатичних молекул була на початку спричинена природними стінками первинних комірок – дрібних пор неорганічного субстрату. Однак прийнято вважати, що синтез білків відбувався до появи клітин. У будь-якому випадку, як тільки молекули РНК опинилися заточеними в мембрану, вони почали еволюціонувати не лише на основі своєї власної структури: нуклеотидні послідовності РНК могли тепер впливати на ознаки цілої клітини, діючи на інші молекули в тому ж компартменті, які, у свою чергу, "редагували" вихідні послідовності РНК.

В існуючих нині клітинах, крім РНК, присутній інший полі-нуклеотид – ДНК. Нуклеїнові кислоти, виділені вперше

в 1869 р., були власне ДНК. Але аж до середини ХХ ст. їхня будова та просторова організація залишалися невідомими. У 1944 р. в експериментах, проведених О. Евері, К. Мак-Леодом і М. Мак-Карті, було продемонстровано, що здатність до утворення капсули в мутантного безкапсульного штаму пневмококів може бути відновлена шляхом уведення в його клітини очищеної ДНК пневмококів, здатних до синтезу капсули. Автори назвали агент, який відповідає за цю зміну, "трансформуючим фактором". Пізніші досліди Д. Херші та М. Чейза із застосуванням радіоактивних міток не залишили сумніву, що саме ДНК є молекулярним носієм спадкової інформації в живих системах. Значну роль у визначенні будови нуклеїнових кислот відіграв американський біохімік Е. Чаргафф. Аналізуючи у 50-х рр. склад ДНК він виявив, що кількість аденіну в них дорівнює кількості тиміну, а гуаніну – цитозину, а також кількість пуринів (А+Г) дорівнює кількості піримідинів (Т+Ц). Ці закономірності, що стали відомими як правила Чаргаффа, лежить в основі будови вторинної структури нуклеїнових кислот. Базуючись на даних рентгеноструктурного аналізу ДНК та правилах Чаргаффа, Дж. Уотсон і Ф. Крік запропонували на початку 50-х рр. модель тривимірної структури ДНК у вигляді "подвійної спіралі" (за що в 1962 р. були нагороджені Нобелівською премією в галузі фізіології та медицини). Два ланцюги "подвійної спіралі" в молекулі ДНК утримуються разом за рахунок водневих зв'язків, які утворюються між пуриновими й піримідиновими основами. Утворення комплементарних пар при цьому є специфічним: А з'єднується лише з Т, Г – лише з Ц) (що узгоджується із правилами Е. Чаргаффа).

У ході еволюції полінуклеотиди (ДНК і РНК) спеціалізувалися і тепер "працюють спільно". Хімічні відмінності між цими двома типами молекул роблять їх пристосованими до різних завдань. Так, ДНК використовується для збереження генетичної інформації, оскільки її молекула стабільніша за РНК. Частково це зумовлюється тим, що ДНК містить дезоксирибозу, а РНК – рибозу, в якій наявна додаткова (порівняно з дезоксирибозою) гідроксильна група, яка збільшує ймовірність гідролізу молеку-

ли, а значить зменшує її стабільність. Крім того, ДНК існує переважно у дволанцюговій формі, що дозволяє їй легко реплікуватися та репаруватися. Саме молекула ДНК стала молекулярним носієм спадковості в живих системах.

Після встановлення факту, що саме молекула ДНК зберігає генетичну інформацію, виникло питання про зміст цієї інформації та механізми її реалізації. Ще в 30-х рр. ХХ ст. Дж. Бідл і Е. Татум висунули теорію "один ген – один фермент". Ф. Крік у 1958 р. припустив, що молекула РНК є проміжним передавачем інформації про білки-ферменти. А в 1961 р. Ф. Жакоб і Ж. Моно показали, що посередником між місцем зберігання спадкової інформації (ДНК) у ядрі та її реалізації в цитоплазмі у процесі біосинтезу білка є матрична, або інформаційна РНК. Дослідженнями Ф. Кріка й С. Бреннера було встановлено, що генетична інформація реалізується через триплетний код – послідовність трьох нуклеотидів, яка відповідає одному амінокислотному залишкові. Першу спробу розшифрувати генетичний код здійснили в 1961 р. М. Ніренберг і Г. Маттеї, які показали, що триплет із трьох урацилів на мРНК відповідає амінокислоті фенілаланіну.

Нині генетичний код цілком відомий, встановлено його базові властивості (триплетність, лінійність, виродженість і універсальність). У молекулі ДНК за допомогою триплетного коду була розшифрована система генетичного кодування окремих білків. Був визначений ген як ділянка ДНК, що несе інформацію про один поліпептидний ланцюг або про одну молекулу РНК. Сьогодні гіпотеза "один ген – один фермент" зазнала уточнень: з'ясувалося, що складні білки з четвертинною структурою кодуються декількома генами. Крім того, було виявлено, що гени еукаріотів є складною мозаїкою з *екзонів* (ділянок, які несуть генетичну інформацію) та *інтронів* (ділянок, які не несуть генетичної інформації). Так, ген β -ланцюга гемоглобіну має два інтрони та три екзони. Усі гени відомих нині білків ссавців і птахів містять інтрони (крім генів, кодуючих гістони, – білки, що формують так званий гістоновий кор, навколо якого закручується

молекула ДНК). Припускають, що екзони відповідають первісним білкам, котрі утворилися в ході еволюції сучасних білків, а інтрони можуть залучатися до регуляції експресії (вираження) генів в еукаріотів.

Підсумовуючи викладене, підкреслимо: генетичні та каталітичні властивості РНК дозволяють припустити, що саме ці молекули першими включилися в еволюцію. Після виникнення ефективного синтезу білка ДНК узяла на себе генетичну функцію, білки стали основними каталізаторами, а РНК залишилась головним чином як проміжний ланцюг між ними. ДНК стала необхідною лише тоді, коли будова клітини ускладнилася та зросла кількість необхідної для неї генетичної інформації, і вона стала значно більшою, ніж та, яку могли стабільно підтримувати молекули РНК.

ВІД КЛІТИНИ ПРОКАРІОТИЧНОЇ ДО ЕУКАРІОТИЧНОЇ

Першою клітинною формою, що утворилася у процесі еволюції, була прокаріотична, представлена найпростішими організмами розміром декілька мікрометрів, які часто мали додаткову сформовану клітинну стінку (рис. 1.1). Їхня плазмолема (плазматична мембрана) оточувала один цитоплазматичний компартмент, (від англ. *compartment* – комірka, кімната, обмежений простір, за найпоширенішим визначенням – простір усередині клітини, оточений мембраною та пов'язаний з виконанням певної функції), що містив ДНК, РНК, білки й малі молекули. Плазматична мембрана виступала всередину клітини, утворюючи *мезосоми*. Цитоплазма цих клітин не мала явно виражених організованих внутрішніх структур. Розщеплення поживних речовин відбувалося в цитозолі, часто за участю мезосом. Існуючі прокаріотичні форми дають нам сьогодні практично повне уявлення стосовно структурно-функціональних особливостей своїх предків.

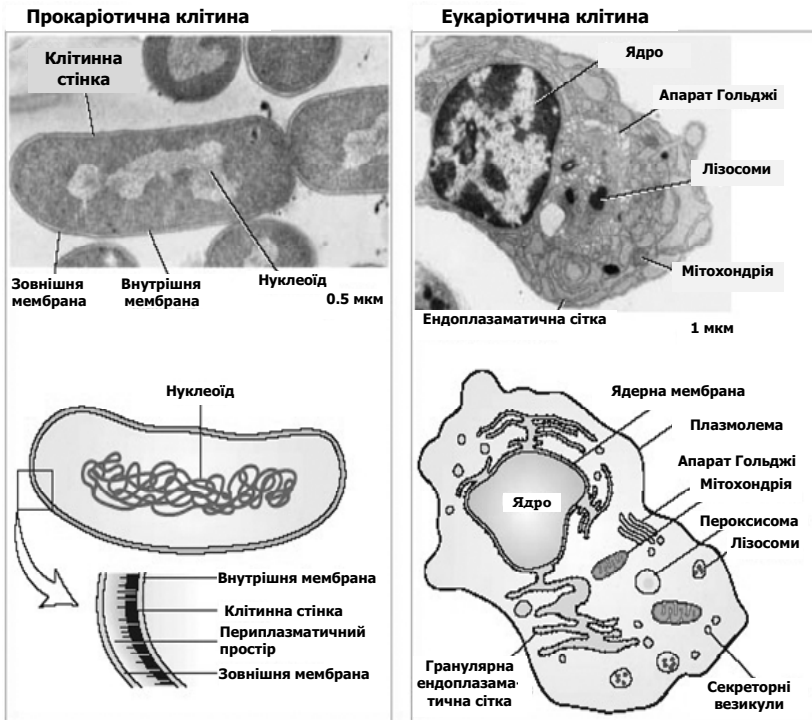


Рис. 1.1. Загальні принципи компартменталізації прокаріотичної та еукаріотичної клітин
(за Лодішем Х. та ін., 2004)

Розмноження відбувалося шляхом бінарного поділу. Велика його швидкість (частота становила 1 поділ за 20 хв) сприяла надзвичайно високій адаптивній спроможності прокаріотичних форм до змін довкілля. Утворилися форми, що використовували практично будь-які органічні молекули – поліпептиди, полісахариди, вуглеводи, жири й амінокислоти для отримання хімічної енергії та вуглецю, необхідного для синтезу власної органіки. Подібний синтез є комплексом складних ланцюгових ферментативних перетворень. Саме з ускладненням і вдосконаленням таких метаболічних шляхів пов'язаний подальший прогрес клітинної форми життя.

Зауважимо, що спочатку в надскладних метаболічних реакціях потреби не було – клітини відтворювали той спектр реакцій, який склався у процесі еволюції гіперциклів первісного бульйону. Зрозуміло, що за поступової зміни умов, а саме, при виснаженні одних реагентів та утворенні певного надлишку інших, перевагу мали отримати організми, здатні утворювати нові ферменти для синтезу органічних молекул. Гіпрецикли, які тепер існували у вигляді перших примітивних оточених мембранами організмів, конкурували за ті ресурси, які опинялися у мінімумі, і перемагали в разі появи більш швидкісних каталізаторів. Це, як прийнято вважати, і спрямувало еволюційний процес у бік збільшення клітинного комплексу ферментів і, як результат, до формування метаболічних шляхів.

Вважають, що утворення ферментативних шляхів могло відбуватися у двох напрямках. По-перше, через залучення нових хімічних сполук для утворення необхідного хімічного комплексу (при його виснаженні в довкіллі) із наступним поліпшенням процесу синтезу шляхом формування ферментативного апарату. По-друге, через появу нових хімічних форм, необхідних клітині, з однієї вихідної форми (нестачі якої клітина не відчуває) із наступним поліпшенням процесу синтезу шляхом формування ферментативного апарату.

Однак у будь-якому разі еволюція метаболічних шляхів відбувалася через послідовне додавання нових ферментативних реакцій до тих, що вже існували. А це означає, що реакції, які є найпоширенішими, "фундаментальними", і є найдавнішими. Такими прадавніми в історії біохімії клітини є реакції за участю фосфатів цукрів – реакції гліколізу. Найдавніші з метаболічних перетворень мали бути анаеробними, оскільки вони формувалися в безкисневому оточенні. На користь такої думки слугує той факт, що практично в усіх клітинах здійснюється гліколіз, який супроводжується утворенням АТФ.

Поряд із найдавнішими формами перетворення фосфатів цукрів проходили сотні інших хімічних реакцій. Найцікавішою їхньою особливістю є той факт, що тепер вони відбуваються в організмі будь-якого типу.

Ферменти, які каталізують головні метаболічні реакції, з дивергенцією організмів поступово модифікувалися, але не змінили сво-

її головної функції. Тому тотожність амінокислотних послідовностей одного й того самого типу ферменту в різних сучасних організмах є свідченням еволюційної близькості самих організмів.

Отже, найперші стадії метаболізму виникли в ході еволюції для того, щоб компенсувати нестачу органічних молекул у навколишньому середовищі. За логікою, перевагу мали отримати організми, здатні використовувати атоми карбону й нітрогену у вигляді CO_2 і N_2 із атмосфери. Проте, незважаючи на поширеність карбону й молекулярного нітрогену в атмосфері, цього не трапилось завдяки їхній надзвичайній стабільності. Перетворення їх на придатну для використання форму вимагає багато енергії та значної кількості складних хімічних реакцій.

Так у ході еволюції виник механізм біогенного фотосинтезу, що прийшов на зміну аналогічним абіотичним процесам. Імовірно, найпершою реакцією з використанням сонячного світла було фосфорилування нуклеотидів з утворенням АТФ. Іншою важливою віхою в еволюції біохімії клітини стало створення відновних еквівалентів. Атоми нітрогену й карбону в CO_2 і N_2 атмосфери існують в інертному стані. Одним із шляхів перетворення їх на реакційноздатні є відновлення, тобто передання їм електронів. Нині хлорофіл, використовуючи енергію сонячного світла, "відбирає" електрони у слабких донорів електронів і переносить їх на сильні акцептори, які, у свою чергу, потрібні для відновлення CO_2 і N_2 . Аналіз механізмів фотосинтезу в сучасних бактерій дозволяє зробити висновок, що одним із перших джерел електронів був H_2S (та інші подібні цинко- та манганвмісні сполуки), кінцевим продуктом обміну якого мала бути елементарна сірка. Значно пізніше виник більш складний, однак ефективніший процес вилучення електронів із води. У результаті як відходи в земній атмосфері повільно починає накопичуватися кисень.

Одними з організмів, що активно долучилися до цього процесу, є ціанобактерії, які здатні фіксувати CO_2 і N_2 та існувати лише за рахунок води, повітря й сонячного світла. Саме вони разом з іншими більш давніми групами бактерій створили умови, у яких змогли розвинутися складніші типи організмів. Як тільки певна група організмів стала здатна синтезувати весь діапазон органічних компонентів клітини з неорганічних речовин, інші організми отримали можливість існувати за рахунок первинних продуцентів.

Ураховуючи високу хімічну активність кисню та його здатність реагувати з більшістю компонентів цитоплазми, можна дійти висновку, що для великої кількості ранніх організмів він був токсичним (як і для більшості анаеробних бактерій, існуючих нині). Однак саме завдяки своїй високій реакційній здатності кисень став постачальником хімічної енергії, найповніше здійснюючи процес окиснення хімічних сполук.

Отже, раніше утворені організми опинилися в довікллі, збагаченому киснем, який вони не в змозі були ані використовувати, ані "знешкоджувати". Деякі з них вимерли. Інші або розвинули здатність утилізувати кисень, або знайшли анаеробні екологічні ніші. Іншим шляхом пішли предки еукаріотів, які вступили в симбіоз із аеробними бактеріальними клітинами, утворивши з ними міцну асоціацію. Це є найприйнятнішим поясненням походження мітохондрій і хлоропластів еукаріотичних клітин. Мітохондрії схожі на прокаріотичні організми із групи α -протеобактерій (серед яких є як вільноіснуючі форми, так і внутрішньоклітинні паразити (рікетсії, вольбахії)). Без них клітини тварин і грибів були б анаеробними й залежними у своїх енергетичних потребах від гліколізу.

Стосовно хлоропластів вищих рослин, зелених та червоних водоростей відзначимо, що вони здійснюють фотосинтез як прокаріоти – ціанобактерії, від яких, власне, і походять. В інших відділах водоростей хлоропласти утворювались шляхом вторинних симбіозів: у ролі хлоропласта виступала ціла еукаріотична клітина зеленої, червоної або іншої водорості, яка набула хлоропластів раніше.

Появу мітохондрій в анаеробних еукаріотичних клітинах можна з упевненістю вважати важливим кроком в еволюції клітинних форм, оскільки разом із мітохондріями клітини отримали ефективне джерело енергії та змогли направити її на ускладнення своїх функцій.

Отримання клітиною мітохондрій повинно було мати декілька наслідків. Так, у прокаріотів плазмолема щільно пов'язана з утворенням енергії, тоді як в еукаріотів ця функція передається мітохондріям. Таке "вивільнення" плазмолем еукаріотів дозволило їй отримати нові властивості: оскільки еукаріотичній клі-

тині не треба підтримувати високий градієнт H^+ на своїй мембрані (що необхідно для утворення АТФ у прокаріотів), то в них виникає можливість використовувати зміни в її іонній проникності з метою міжклітинної сигналізації. Як наслідок, у їхній плазматичній мембрані виникають іонні канали.

Усі мембранні органели сучасних еукаріотичних клітин оточені в цілому подібними за структурою мембранами (білковоліпідними біомолекулярними бішарами), які відрізняються варіаціями в ліпідному та білковому складі, що визначає специфіку їхніх метаболічних "уподобань". Рух речовин із однієї органели в іншу відбувається певними шляхами й за певними принципами. При цьому потік речовин, скажімо, транспорт і міграція білків, здійснюються за різними механізмами, а саме потоком власне білків або везикул, які містять у своєму люмені білки, що транспортуються.

Внутрішньоклітинні компартменти – динамічні структури, вони можуть збільшуватися або зменшуватися за розміром, але не можуть формуватися *de novo*; цей процес вимагає інформації у вигляді рудимента або матриці від існуючої органели. Більш того, відносно положення чи розташування компонентів усередині клітини не є хаотичним; кожний компартмент займає положення, оптимальне для виконання його спеціалізованої функції.

ЗАГАЛЬНІ ПРИНЦИПИ КОМПАРТМЕНТАЛІЗАЦІЇ ЕУКАРІОТИЧНОЇ КЛІТИНИ

Більшість із найважливіших біохімічних процесів у клітині відбувається у мембранах або на їхніх поверхнях. Так, для спряження транспорту протонів із синтезом АТФ при окисному фосфорилуванні та при фотосинтезі необхідним "знаряддям" є напівпроникна мембрана. Крім того, мембрани слугують каркасом для синтезу своїх власних компонентів. Внутрішні мембрани еукаріотичної клітини функціонально спеціалізовані, що є вирішальним фактором у розподілі численних процесів, які відбуваються в клітині (табл. 1.1).

Органела є субклітинною морфофункціональною одиницею, яку можна виділити при центрифугуванні на високій швидкості. Ядро містить головну частину геному та є основним місцем синтезу ДНК і РНК. Цитоплазма, яка оточує ядро, складається із цитозолу й розташованих у ньому цитоплазматичних органел (рис. 1.1).

Об'єм цитозолу становить понад половину загального об'єму клітини. Саме в цитозолі здійснюється синтез білка й відбувається більшість реакцій проміжного обміну. Близько половини всіх мембран клітини оточують порожнини (люмени) ендоплазматичної сітки (ЕПС). На оберненому до цитозолу боці ЕПС (гранулярної) містяться рибосоми, які забезпечують синтез інтегральних мембранних білків і розчинних білків, призначених для секреції. На мембранах ЕПС (але гладенької) синтезуються клітинні ліпіди. Апарат Гольджі складається із правильних стосів пласких мембранних мішечків, цистерн Гольджі. Отримуючи з ЕПС білки й ліпіди, він забезпечує їхню модифікацію та "відправлення" за призначенням.

Мітохондрії, а також хлоропласти рослинних клітин виробляють більшу частину АТФ, що використовується у реакціях біосинтезу, які вимагають надходження вільної енергії. Лізосоми містять травні ферменти, котрі руйнують відпрацьовані органели, а також частки й молекули, поглинуті клітиною ззовні внаслідок ендоцитозу. На шляху до лізосом поглинуті молекули та частки мають пройти серію специфічних органел – ендосом. Нарешті, пероксисоми (мікротільця) є невеличкими пухирцями, що містять численні окиснювальні ферменти.

Крім указаних головних мембранних органел, клітина містить велику кількість дрібних пухирців-переносників речовини між органелами та пухирців, що зв'язуються з плазмомемою під час ендоцитозу й секреції.

Усі органели клітини можна поділити на дві групи: немембранні (рибосоми, центріолі) і мембранні, які, у свою чергу, поділяються на одномембранні (гранулярна та гладенька ЕПС, апарат Гольджі, лізосоми, пероксисоми) і двомембранні (ядро, мітохондрії та хлоропласти рослинної клітини).

Таблиця 1.1

Головні внутрішньоклітинні органели та їхні функції

Органела або клітинна фракція	Маркер	Головні функції
Ядро	ДНК	Місце розташування хроматину. Місце синтезу ДНК та транскрипції РНК
Мітохондрія	Глутаматдегідрогеназа	Цикл трикарбонних кислот, окиснювальне фосфорилування
Рибосома	Високий вміст РНК	Місце синтезу білка
Ендоплазматична сітка	Глюкозо-6-фосфатаза	Рибосоми, пов'язані з мембраною – головне місце синтезу білка. Синтез ліпідів. Окиснення ксенобіотиків (цитохром P450)
Лізосома	Кисла фосфатаза	Місце розташування різноманітних гідролаз
Плазматична мембрана	Na ⁺ -K ⁺ -АТФаза 5'-нуклеотидаза	Транспорт молекул у клітину й із клітини. Міжклітинна адгезія та взаємодія
Апарат Гольджі	Галактозил-трансфераза	Внутрішньоклітинне сортування білків. Реакції глікозилювання. Реакції сульфатування
Пероксисома	Каталаза. Оксидаза сечової кислоти	Руйнування деяких жирних кислот і амінокислот. Виробництво й розщеплення пероксиду водню
Цитоскелет	Специфічні маркери відсутні	Мікрофіламенти, мікротрубочки, проміжні філаменти
Цитозоль	Лактатдегідрогеназа	Ферменти гліколізу, синтезу жирних кислот

ЕВОЛЮЦІЙНЕ ПОХОДЖЕННЯ МЕМБРАННИХ ОРГАНЕЛ

Прийнято вважати, що попередниками еукаріотичних клітин були без'ядерні організми, подібні до сучасних архебактерій. У прокаріотів, як правило, відсутні внутрішні мембрани, а відповідні функції (транспорт іонів, синтез АТФ і ліпідів) виконує плазматична мембрана. Розміри сучасних еукаріотичних клітин перевищують розмір типової бактеріа-

льної клітини в 10–30 разів. І зростання кількості внутрішньоклітинних мембран еукаріотів можна вважати адаптацією до збільшення розмірів їхніх клітин.

Еволюція внутрішньоклітинних мембран відбувалася, очевидно, паралельно зі спеціалізацією їхніх функцій. У деяких сучасних бактерій є певні ділянки плазмолем, на яких певні мембранні білки зібрані разом для виконання взаємопов'язаних функцій. Ілюстрацією можуть послужити "пурпурні мембрани" архебактерій з роду *Halobacterium*, які містять бактеріородопсин. Інший приклад – хроматофори фотосинтезуючих бактерій. Обидва ці комплекси можна вважати "прообразами" органел. У деяких фотосинтезуючих бактерій ці ділянки перетворюються на глибокі впинання плазмолем (*мезосоми*), набуваючи форми майже замкнених мембранних пухирців, призначених для фотосинтезу. Їхня внутрішня поверхня топологічно еквівалентна зовнішній поверхні мембрани клітини.

Можна припустити, що еукаріотична органела, яка виникла в результаті впинання й відокремлення (а такими вважають ЕПС, апарат Гольджі, лізосоми), також буде мати внутрішню поверхню, топологічно еквівалентну зовнішній поверхні клітини (рис. 1.2). Однак, для реалізації цього сценарію предки сучасних еукаріотів мали набути механізм для стабілізації форм цистерн, які утворюють ендоплазматичні мембрани. Таким засобом для сучасних еукаріотів постає цитоскелет.

LUCA (last universal common ancestor) – останній універсальний спільний предок нині існуючих організмів, про який уже йшлося вище, цитоскелета не мав. Усі процеси, які тепер відбуваються в еукаріотів за допомогою цитоскелета (мікротрубочок, мікрофіламентів, проміжних філаментів, про що детально йтиметься у розділі "Цитоскелет"), у нього або взагалі були відсутні, або реалізувались на основі дуже примітивних механізмів (як у багатьох сучасних прокаріотів). Зокрема, клітинний поділ у *LUCA* здійснювався в міру того, як збільшувалась загальна поверхня клітинної мембрани та кількість компонентів, що входили до її складу.

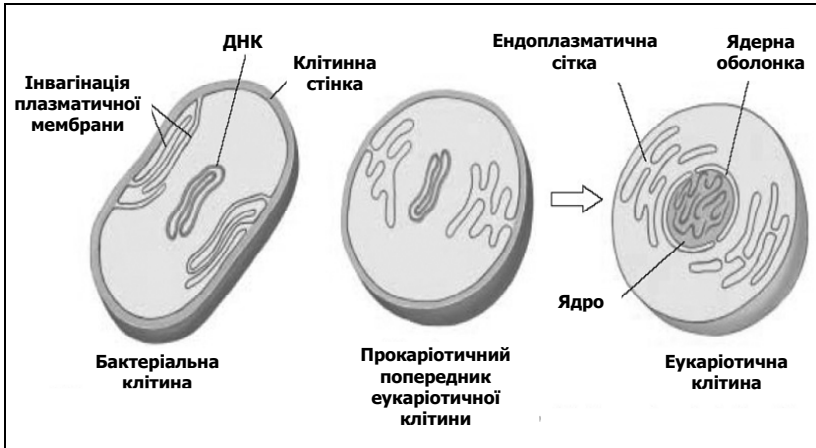


Рис. 1.2. Можливий механізм еволюційного утворення внутрішньоклітинних компартментів
(за Равеном П. та ін., 2005)

У деяких же нащадків цього організму вже почали з'являтися білкові структури, що є аналогами елементів цитоскелета еукаріотів. Так, поділ багатьох прокаріотів (еубактерій та архебактерій) здійснюється за допомогою *Z*-кільця. Ця структура складається із *FtsZ* – білка з ГТФазною активністю, що є гомологом тубуліну, із якого складаються мікротрубочки еукаріотів. Процес поділу прокаріотичної клітини пов'язаний зі скороченням саме цього кільця, і здійснюється він за допомогою білка *MreB*, що є гомологом еукаріотичного актину (цей білок і його гомологи також відповідальні за синтез муреїну, сегрегацію хроматину й підтримання форми клітин). Субодиниці *MreB* здатні полімеризуватись з утворенням довгих фібрил, що "обвивають" клітинну стінку з внутрішнього боку та періодично зазнають полімеризації-деполімеризації. Фібрилярна будова (з утворенням подвійної спіралі) характерна й для інших гомологів актину – білка *ParM*, відповідального за переміщення плазмід до полюсів клітин, білка *MamK*, який зумовлює "правильне" розташування впинань клітинної мембрани, що оточують часточки заліза, – *магнітосом*. Функція останнього є надзвичайно важли-

вою для розуміння процесу утворення мембранних органел: філаменти *MamK* фактично виконують роль спрямовуючих структур, уздовж яких вишукуються окремі магнітосоми.

У бактерій наявний і гомолог проміжних філаментів – білок *кресцентин*. Він, як і проміжні філаменти еукаріотів, відповідає за форму клітини. Так, вібріони, у яких не експресується ген *кресцентину*, набувають форми палички (при порушенні ще й синтезу *MreB* форма клітин змінюється на сферичну).

Крім згаданих, прокаріоти містять цілий ряд інших гомологів білків цитоскелета ядерних організмів: *BtubA/B* (гомолог тубуліну), гомологи актиноподібного білка *Mbl* (*MreB-like*) і *MreBH* (*MreB homolog*). Крім того, окремі білки, не маючи точних гомологів у еукаріотів, виконують близькі функції: білок *MinD*, відповідальний за положення точки поділу у бактерій і пластид, *ParA* – білок, що відповідає за розподіл ДНК по дочірніх клітинах.

Деякі зі згаданих білків зустрічаються лише в окремих видів бактерій (наприклад, *BtubA/B*, *MamK* і *кресцентин*). Інші ж є характерними для більшості прокаріотів (наприклад, *FtsZ*). При цьому слід зауважити, що, на відміну від еукаріотичних організмів, для яких не є характерним обмін генетичним матеріалом між віддаленими видами, прокаріотам таке *горизонтальне перенесення генів* властиве (це пов'язано з великою кількістю вірусів, плазмід та епісом, здатних "переноситися" з однієї клітини в іншу, долаючи навіть видові бар'єри). Наявність процесу горизонтального перенесення генів робить імовірним "збирання" в одній клітині (що була, як вважається, близьким родичем сучасних архебактерій) білків, які стали попередниками сучасного актину, тубуліну й білків проміжних філаментів. У такого організму з'явилась можливість активно змінювати свою форму, стабілізувати внутрішньоклітинні мембрани та упорядковувати рух внутрішньоклітинних мікропухирців (процеси, що зробили можливим утворення ЕПС, апарату Гольджі, ендосом і лізосом, а також багатьох проміжних пухирців, що беруть участь в ендоцитозі й секреції).

Саме такою групою архебактерій виявилися *локіархеоти*, які мають п'ять генів, кодуючих різні актиноподібні білки, різноманітні регуляторні білки групи ГТФаз (скажімо, *Ras* – білки), які відіграють важливу роль у процесах фагоцитозу та везикулярного транспорту. Крім того, локіархеї містять білки, характерні лише для еукаріотів і невідомі в інших прокаріотичних організмів (виявлені білки входять до складу рибосоми, системи убіквітинзалежного протеолізу тощо). Це змушує думати, що саме група локіархеот була тією групою архей, від якої відокремились предки сучасних еукаріотичних організмів.

Мітохондрії та хлоропласти відрізняються від інших оточених мембраною органел тим, що мають свої "особливі" геноми. Природа останніх і подібність білків мітохондрій і хлоропластів до білків деяких сучасних бактерій свідчить, що ці органели є похідними бактерій, які були захоплені іншими клітинами і спочатку існували в симбіозі з ними (рис. 1.3). Згідно з цим внутрішня мембрана мітохондрій і хлоропластів відповідає вихідній плазматичній мембрані бактерій, а матрикс цих органел є похідним бактеріальної цитоплазми.

Про-еукаріот, який отримав першу справжню систему цитоскелета, схожу на сучасний цитоскелет ядерних організмів, набув можливості здійснювати новий спосіб харчування – фагоцитоз. Завдяки наявності цитоскелета можна було більше "не витратити зайві" ферменти, що "розсіювались" примітивними гетеротрофними організмами в зовнішнє середовище, а направляти їх напряму у травну вакуоль. Отримані в результаті розщеплення харчової частки мономери також не "розсіювались", а майже без втрат ставали доступними фагоциту. Єдиною проблемою гетеротрофного анаеробного *про*-еукаріота залишався кисень. Оскільки його "основною їжею" були фотоавтотрофні бактерії, подібні до ціанобактерій, рівень кисню в середовищі існування такого фагоциту ставав для нього небезпечно високим. На цьому етапі проблема була розв'язана появою *про*-пероксисоми – органели, що утилізувала кисень, який потім ішов на утворення пероксиду водню (також достатньо токсичної сполуки; детально це питання

розглянуто в розділі "Пероксисоми"). У свою чергу, останній використовувався для окиснення продуктів гліколізу – єдиного доступного для *про*-еукаріота шляху метаболізму (додаткові порції енергії в цьому процесі не вироблялись).

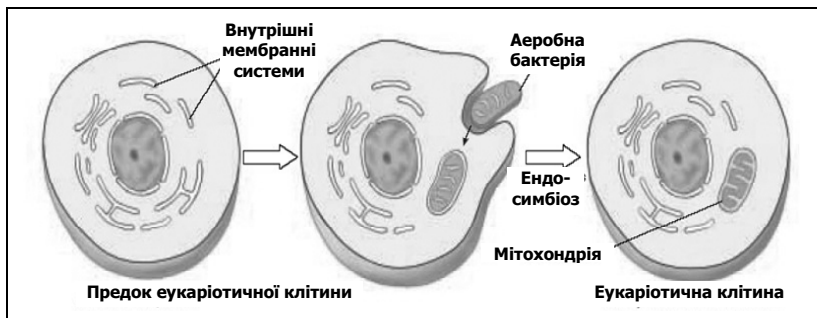


Рис. 1.3. Можливий механізм еволюційного утворення мітохондрій (за Равеном П. та ін., 2005)

"Предки" мітохондрії – α -протеобактерії – потрапили до клітини *про*-еукаріота в результаті незакінченого фагоцитозу, або, скоріше, як внутрішньоклітинні паразити. Саме внутрішньоклітинними паразитами є близькі родичі мітохондрій – рикетсії та вольбахії (рис. 1.4).

Облігатний паразитизм часто еволюціонував у напрямку до взаємовигідного мутуалізму. Справді, протеобактерії було вигідно, щоб її хазяїн не гинув, а продовжував існувати й розмножувався. При цьому симбіонти мали змогу потрапити без зайвих проблем до наступних поколінь клітин-хазяїв.

Облігатно-аеробна *про*-мітохондрія одразу, після "вселення", зробила значною мірою непотрібною *про*-пероксисому, оскільки використовувала кисень для глибокої переробки субстратів, які *про*-еукаріот переробляв лише за допомогою гліколізу. Як наслідок, *про*-пероксисома зазнала рудиментизації (див. розд. 11). Порушення в результаті окремих мутацій власних шляхів первинної переробки глюкози в *про*-мітохондрії завершило оформлення мутуалістичних взаємин симбіонтів.

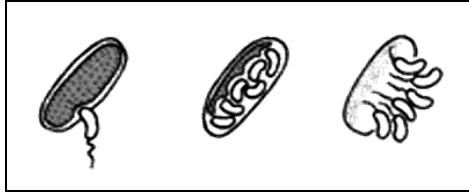


Рис. 1.4. Проникнення сучасної протеобактерії *Bdellovibrio* до кишкової палички та її розмноження в середині жертви

Більш того, склалися передумови для посилення переробки навіть тієї глюкози, яка не була потрібна *про*-мітохондрії безпосередньо для виживання. *Про*-мітохондрія поступово перетворилась на головну енергетичну станцію еукаріотичної клітини. Така спеціалізація мала негативний вплив на збереження генетичної інформації самої *про*-мітохондрії, адже під час дихання утворюються вільні радикали (активні форми кисню), які здатні суттєво пошкодити ДНК. Частковим виходом стало перенесення геному мітохондрії в ядро. Схожий шлях не є чимось неймовірним для внутрішньоклітинних симбіонтів. Так, подібне явище зафіксовано в інших α -протеобактерій – вольбахій, які є внутрішньоклітинними паразитами. Дублювання генетичної інформації мітохондрії в ядро еукаріота зробило можливим використання ним багатьох метаболічних шляхів, доступних еубактеріям, зокрема шляхів синтезу фосfolіпідів. З іншого боку, геном мітохондрії при цьому не зник остаточно. Річ у тім, що хоча більшість білкових молекул для функціонування мітохондрії стало можливим синтезувати в цитозолі на вільних рибосомах, проте найбільші за розміром молекули виявляється енергетично не вигідним переносити через мітохондріальну мембрану. Більш раціональним рішенням виявилось збереження апарату білкового синтезу та приблизно десятої частини геному мітохондрії в межах матриксу органели.

Походження клітинного ядра з подвійною мембраною із симбіозом швидше за все не пов'язане. Як відомо, єдина бактеріальна хромосома прикріплена до специфічних ділянок

із внутрішнього боку прокаріотичної плазмолемі за допомогою певних інтегральних білкових комплексів мембрани. Припускають, що подвійна ядерна оболонка могла утворитися шляхом глибокого подвійного впинання плазматичної мембрани (рис. 1.2). Це пояснює, чому внутрішній простір ядра топологічно еквівалентний цитозолу. І справді, під час мітозу у вищих еукаріотів ядерна оболонка руйнується і вміст ядра повністю змішується з цитозолем, чого ніколи не відбувається з іншими мембранними органелами. Отже, під час мітозу клітина фактично тимчасово повертається до прокаріотичного стану, коли хромосоми не мають окремого компартменту.

Ця еволюційна схема дозволяє поділити головні внутрішньоклітинні компартменти еукаріотів на п'ять груп: ядро і цитозоль, пов'язані між собою ядерними порами (тому вони є топографічно нерозривними, хоча й різними функціонально); мітохондрії; хлоропласти; пероксисоми; а також система мембранних органел, що включає ЕПС, апарат Гольджі, ендосоми й лізосоми.

Внутрішній простір органел, які становлять останню групу, пов'язаний між собою та з позаклітинним простором за допомогою транспортних пухирців, котрі відділяються від однієї органели й зливаються з іншою (рис. 1.5). Внутрішні простори цих органел топологічно еквівалентні один одному й позаклітинному простору та являють собою функціонально пов'язані частини єдиного комплексу.

Нині беззаперечним фактом є те, що клітина – це самостійна елементарна структурна одиниця живого. Німецький учений Р. Вірхов свого часу писав, що клітина є останнім морфологічним елементом усіх живих тіл, і ми не маємо права шукати дійсної життєдіяльності за її межами. Запропонована модель виникнення клітинної форми життя та аналіз головних закономірностей її розвитку дозволяє зрозуміти принципові засади, на яких був проведений розподіл двох рівнів організації клітини – про- та еукаріотичний.

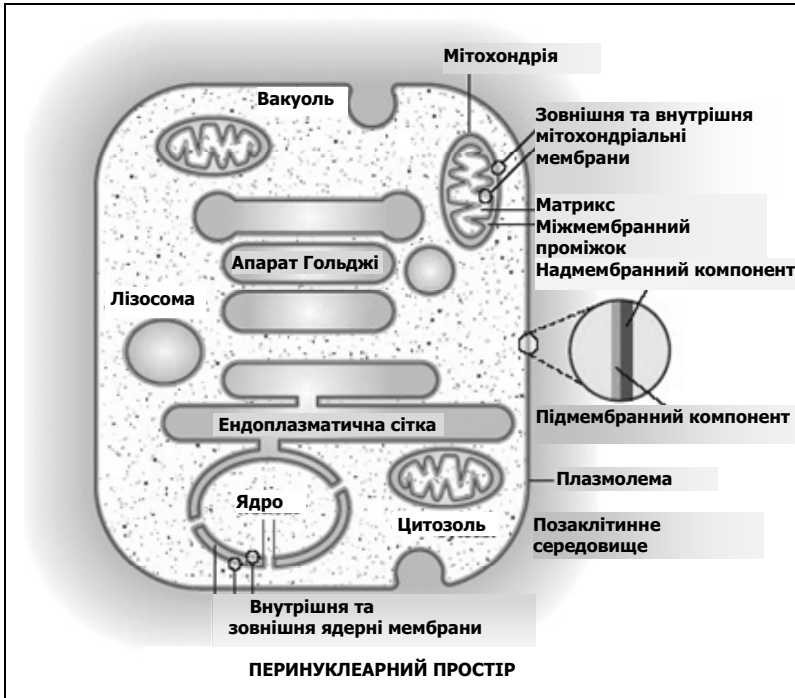


Рис. 1.5. Схема будови еукаріотичної клітини.
Топологічно еквівалентні ділянки позначені кольором
(за Лодішем Х. та ін., 2004)

До клітин прокаріотичного типу відносять бактерії та синьо-зелені водорості. Вони, як правило, менші за розміром, ніж еукаріоти, мають захисну оболонку (клітинну стінку), під якою розташована плазматична мембрана, яка оточує лише один компартмент, що містить РНК, ДНК і малі молекули. Їхня мембрана інвагінує всередину, утворюючи мезосоми, цитоплазма не рухається, цитоскелет відсутній. Розщеплення поживних речовин відбувається в цитозолі, часто за участю згаданих вище мезосом. Ядро прокаріотів називається нуклеоїдом, оскільки не має ядерної мембрани, ядерця, мітотичного апарату, не містить ядерних білків гістонів, а є просто кільцевою молекулою ДНК, розташованою в центральній частині

клітини (часто складеною у вигляді вісімки). Синтез білка у клітинах прокаріотів відбувається на вільних рибосомах. Розмножуються ці клітини шляхом бінарного простого поділу.

До еукаріотів належать усі інші одно- й багатоклітинні організми – гриби, рослини, тварини. Вони, на відміну від прокаріотів, мають чітко виражене ядро, що містить лінійні молекули ДНК, з'єднані з гістонами у хроматинові нитки (кількість ДНК при цьому є видовою ознакою). У цитоплазмі добре виражені мембранні й немембранні структури: органели та включення (рис. 1.5). Еукаріоти мають мітотичний апарат, цитоплазма здатна рухатися, наявний цитоскелет, утворений білковими структурами – фібрилами й мікротрубочками. Розщеплення поживних речовин відбувається лише частково в цитозолі, головна ж частина – у спеціалізованих органелах. Білковий синтез частково проходить на вільних рибосомах у цитозолі, а частково – на рибосомах грЕПС.

Незважаючи на визначені суттєві відмінності, клітина (як про-, так і еукаріотична) є центром усіх біохімічних процесів життєдіяльності. У ній закладено генетичний апарат, без якого неможливе успадкування головних ознак, характерних для певного виду та особини. Клітина лежить в основі еволюції всього різноманіття живих істот. Вона побудована за єдиним планом у всіх організмів і біохімічні процеси відбуваються в усіх клітинах принципово однаково.

Поряд з наявністю принципової подібності спостерігається суттєва варіативність структурної організації клітин. Ступінь і характер клітинних модифікацій залежить від характеру спеціалізації певних клітин багатоклітинного організму до виконання специфічних функцій.

Експериментальна й теоретична спадщина цитології знайшла своє узагальнення у клітинній теорії, основи якої було закладено ще в середині XIX ст. М. Шлейденем і Т. Шванном. У сучасному вигляді ця теорія має декілька положень (аксіом):

- клітина – це елементарна одиниця живого;
- клітини різних організмів гомологічні за своєю будовою;

- клітини можуть утворюватися тільки від попередньої клітини шляхом поділу;
- клітини *поліпотентні*, тобто мають повний набір генетичної інформації, яка передається під час поділу від клітини до клітини;
- генотипові та фенотипові особливості клітин мають пряму залежність;
- клітини багатоклітинного організму взаємозв'язані міжклітинними, гуморальними й нервовими формами регуляції та підпорядковані вищим рівням організації живого.

Запитання для самоперевірки

1. Які характеристики живої системи вам відомі? Відповідь проілюструйте прикладами.
2. Сучасне поняття про живу систему.
3. Що вважають елементарною живою системою? Чому?
4. Чи можна вважати елементарною живою системою хлоропласт? Якщо можна, то чому?
5. Чи можна вважати елементарною живою системою мітохондрію? Чому?
6. Чи всі характеристики живої системи притаманні хлоропласту? Відповідь обґрунтуйте.
7. Чи всі характеристики живої системи властиві мітохондрії? Відповідь обґрунтуйте.
8. Які характеристики живої системи притаманні клітині? Відповідь обґрунтуйте.
9. Які існують гіпотези виникнення клітинної форми життя.
10. Походження еукаріотів.
11. Походження прокаріотів.
12. Теорії виникнення клітин сучасного еукаріотичного типу.
13. Теорії виникнення мітохондрій.
14. Теорії виникнення хлоропластів.
15. Теорія ендосимбіозу.
16. Теорії виникнення ядра.
17. Формування різноманіття внутрішніх мембран еукаріотичної клітини.

18. Збільшення кількості спеціалізованих клітин і вдосконалення методів координації їхньої активності як передумова еволюції вищих еукаріотів.
19. Основні положення клітинної теорії.

Рекомендована література

Загальна цитологія і гістологія : підручник / М. Е. Держинський, Н. В. Скрипник, Г. В. Островська та ін. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2010.

Кизильштейн Л. Я. Фрамбоидальный пирит причастен к возникновению жизни на Земле? / Л. Я. Кизильштейн // Природа. – 2007. – № 1. – С. 49–54.

Клетки / под ред. Б. Льюина и др. : пер. с англ. – М. : БИНОМ, Лаборатория знаний, 2011.

Experimentally tracing the key steps in the origin of life: The aromatic world / P. Ehrenfreund, S. Rasmussen, J. Cleaves, L. Chen // Astrobiology. – 2006. – Vol. 6, № 3. – P. 490–520.

Glansdorff N. The Last Universal Common Ancestor: emergence, constitution and genetic legacy of an elusive forerunner / N. Glansdorff, Y. Xu, B. Labedan // Biology Direct. – 2008. – Vol. 3, № 29. – P. 1–35.

Haslinger K. Structure of the terminal PCP domain of the non-ribosomal peptide synthetase in teicoplanin biosynthesis / K. Haslinger, C. Redfield, M. J. Cryle // Proteins. – 2015. – Vol. 83, № 4. – P. 711–721.

Jain S. Biosynthesis of archaeal membrane ether lipids / S. Jain, A. Caforio, A. J. Driessen // Front. Microbiol. – 2014. – Vol. 5, № 641. – P. 1–16.

Koonin E. V. Evolution of cell division: from shear mechanics to complex molecular machineries / E. V. Koonin, A. Y. Mulkidjanian // Cell. – 2013. – Vol. 152, № 5. – P. 942–944.

Lincoln T. A. Self-sustained replication of an RNA enzyme / T. A. Lincoln, G. F. Joyce // Science. – 2009. – Vol. 323, № 5918. – P. 1229–1232.

Molecular Biology of the Cell. / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis et al. – N. Y., 2013.

Molecular cell biology / H. Lodish, A. Berk, A. Kaiser et al. – N. Y., 2013.

Mulkidjanian A. Y. On the origin of life in the zinc world: 1. Photosynthesizing, porous edifices built of hydrothermally precipitated zinc sulfide as cradles of life on Earth / A. Y. Mulkidjanian // Biol. Direct. – 2009. – Vol. 4, № 26. – P. 1–39.

Mulkidjanian A. Y. On the origin of life in the zinc world: 2. Validation of the hypothesis on the photosynthesizing zinc sulfide edifices as cradles of life on Earth / A. Y. Mulkidjanian, M. Y. Galperin // *Biol. Direct.* – 2009. – Vol. 4, № 27. – P. 1–39.

Open questions on the origin of life at anoxic geothermal fields / A. Y. Mulkidjanian, A. Y. Bychkov, D. V. Dibrova et al. // *Orig. Life Evol. Biosph.* – 2012. – Vol. 42, № 5. – P. 507–516.

Origin of first cells at terrestrial, anoxic geothermal fields / A. Y. Mulkidjanian, A. Y. Bychkov, D. V. Dibrova et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2012. – Vol. 109, № 14. – P. 821–830.

Widespread Lateral Gene Transfer from Intracellular Bacteria to Multicellular Eukaryotes / J. C. Dunning Hotopp, M. E. Clark, D. C. Oliveira et al. // *Science.* – 2007. – Vol. 317, № 5845. – P. 1753–1756.

Розділ 2

МЕТОДИ ВИВЧЕННЯ КЛІТИН

З ІСТОРІЇ ВИВЧЕННЯ КЛІТИН

Історія вивчення клітини невід'ємно пов'язана з історією розвитку методів її дослідження, і в першу чергу мікроскопічних.

За свідченнями істориків у XVI ст. в західній Європі, зокрема в Голландії, відзначався інтенсивний розвиток оптичної техніки. Природно, що саме наприкінці цього століття з'являються перші складні оптичні прилади – телескоп і мікроскоп. Хто створив перший мікроскоп достеменно не відомо. Найпевніше, його неодноразово конструювали незалежно один від одного різні дослідники, майстри-шліфувальники скла та просто аматори модної справи. Історія зберегла імена голландців: майстра з виготовлення окулярів Г. Янсена та його сина Захарії, про мікроскоп яких, створений у 1590 р., є більш-менш надійні відомості. Цей громіздкий прилад (трубу довжиною 45 см і діаметром 5 см із позолоченої латуні підтримували три мідні дельфіни, предметний столик був у вигляді кола з чорного дерева) був подарований ерцгерцогу Альберту, іспанському правителю Бельгії.

До створення мікроскопів у перші десятиліття XVII ст. долучилися також Г. Галілей та К. Дреббель. Саме мікроскоп Г. Галілея з 20-х років XVII ст. почали використовувати для наукових досліджень у галузі анатомії. К. Дреббель, удосконаливши мікроскоп Янсена, створив перші складні мікроскопи, які фактично стали прототипами сучасної мікроскопічної техніки.

Протягом майже півстоліття будова мікроскопа не зазнавала суттєвих змін. Лише в середині XVII ст. англійський фізик Р. Гук у сконструйованому ним мікроскопі (рис. 2.1), який збільшував зображення в 40 разів, уперше побачив і замалював

клітини в корку. Власне, виявлені й описані були не стільки самі клітини, скільки їхні целюлозні оболонки з порожнинами (рис. 2.2), названі порами, або клітинами (*cellula*). Так у 1665 р. почалося вивчення клітинного рівня організації живої матерії. Новаціями Гука у мікроскопічній техніці, порівняно з мікроскопом Дреббеля, стало застосування примітивних освітлювальних пристроїв (свічка з дзеркалом, яке збирало світло й направляло в потрібному напрямку) та системи лінз, що фокусували світловий потік на досліджуваному об'єкті (праобраз конденсора). Крім того, при конструюванні оптичної системи мікроскопа Гук застосував третю лінзу (колектив, або польову лінзу), яку розташував між лінзами об'єктива та окуляра. Це нововведення сприяло збільшенню лінійного поля мікроскопа. Подібна конструкція набула великої популярності й більшість мікроскопів кінця XVII та першої половини XVIII ст. будувались за цією схемою.

Мікроскопія стала набувати поширення у природознавстві. Спостереження, подібні проведеним свого часу Р. Гуком, були повторені іншими дослідниками. При цьому "пори" Гука називали то пухирцями (Н. Грю), то мішечками (М. Мальпігі). Наступниками Р. Гука були зроблені перші мікроскопічні описи рослинних і тваринних тканин, зокрема Н. Грю виділив у рослинах щільні та пухкі тканини. Останні ("паренхіми") він порівнював з піною пива чи яєчного білка, вважаючи їх рідкими утвореннями, а щільні тканини нагадували йому переплетення мережива чи полотна. Ця аналогія і сприяла закріпленню терміну "тканина", яким з того часу почали позначати організовані сукупності клітин, подібних за структурою та функціями.

Окремий напрямок досліджень був пов'язаний з удосконаленням звичайної лупи. Так, Я. Сваммердам у 1670-х рр. сконструював прилад, за допомогою якого можна було швидко змінювати лупи з різними збільшеннями, послідовно переходячи від більш слабких до більш сильних.

Неймовірних успіхів у вдосконаленні лупи досяг голландський мікроскопіст А. ван Левенгук (Тонізсон). Його "мікроскоп" (а насправді лупа (рис. 2.3, А)) складався із двох срібних платівок з отворами, у які була вбудована лінза. Позаду розташовувався

об'єктотримач. Спостерігати об'єкти можна було в прохідному світлі. Окремі "мікроскопи" Левенгука забезпечували збільшення у 270 разів.



Рис. 2.1. Мікроскоп Р. Гука
(за Львіним М., 1954)

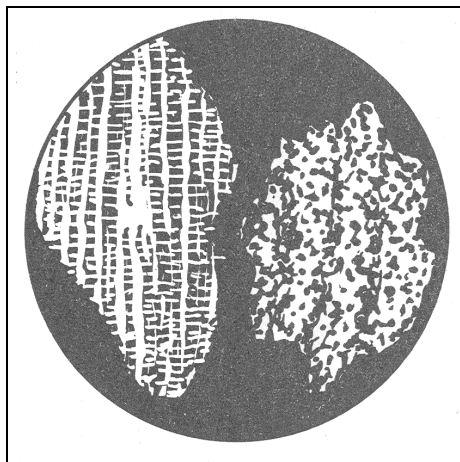


Рис. 2.2. Клітини корка на малюнку
(малюнок Р. Гука)

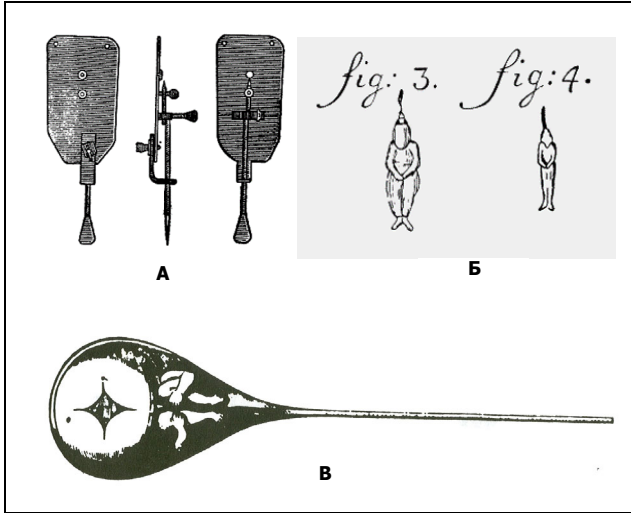


Рис. 2.3. "Мікроскоп" А. ван Левенгука (А)
і сперматозоїди з малюнків
А. ван Левенгука (Б) та Н. Хартсекера (В)

У 1674 р. Антоні ван Левенгук уперше повідомив про відкриття одноклітинних організмів, а ще через дев'ять років – бактерій. Разом із Н. Хартсекером у 1678 р. він уперши побачив сперматозоїд, помилково вважаючи при цьому, що виявив справжній зародок людини, який у подальшому не зазнає суттєвих перебудов, а лише збільшується в розмірах (рис. 2.3, Б, В).

А. ван Левенгуку також належить першість у відкритті еритроцитів, проте він так і не зміг визначити подібності рослинної та тваринної клітин. Пізніше, у 1781 р., клітини тварин описав Ф. Фонтана, а в 1812 р. Д. Мольденгауер за допомогою методу мацерації відділив окремі клітини. Однак і ці дослідження не привели до розуміння як універсальності клітинної будови, так і того, чим насправді є клітина.

Наприкінці XVII ст. та протягом XVIII ст. мікроскопічна техніка зазнає подальшого розвитку: ускладнюється система освітлення, поліпшується якість лінз, з'являються оригінальні моделі мікро-

скопів (скажімо, перший стереомікроскоп сконструйований Н. Грю). Подальший розвиток ідеї гуківського мікроскопа знайшов свою реалізацію в мікроскопах Д. Маршалла (бл. 1693) та Е. Кульпепера (бл. 1730 р.). Ці мікроскопи збільшували зображення від 40 до 140 разів (рис. 2.4). У мікроскопі Є. Дівіні (1667) уперше з'являється окуляр з двох плоскоопуклих лінз, опуклі поверхні яких були направлені одна на одну. Це дозволило покращити рівномірність збільшення об'єктів, що досліджуються, зберігши чіткість їхнього зображення в усіх ділянках поля зору. У 1672 р. німецький оптик І. Х. Штурм уперше сконструював об'єтив, що складався із двох лінз. А в 1685 р. Г. фон Ах конструює мікроскоп із шістьма лінзами.

В оригінальній конструкції мікроскопа Ф. Бонанні (Бонануса) (1691) з горизонтальним розміщенням тубуса стало можливим проводити мікроскопіювання у прохідному світлі, що дозволило досліджувати об'єкти при збільшенні вже у 200–300 разів. Конструкція Д. Бонануса спиралася на попередні розробки Дж. Кампані (бл. 1665), який уперше застосував предметний столик з отвором, та К. Тортони (1685), мікроскоп якого містив об'єктотримач із двох скелець, між якими кріпився об'єкт, котрий розглядався у прохідному світлі. Зауважимо, що до цього часу всі мікроскопи дозволяли розглядати об'єкти лише у відбитому світлі. Ще одне удосконалення, запропоноване в 1716 р. німецьким оптиком К. Г. Гертелем, дозволило покращити освітлення об'єкта і поліпшити мікроскопіювання у світлі, що проходить: він доповнив конструкцію мікроскопа предметним столиком, що обертався, і дзеркалом підсвічування під ним.

Із 1770-х рр. при мікроскопіюванні почали застосовувати набори змінних об'єтивів, що дозволило змінювати збільшення мікроскопа. Проте якість зображення у цих пристроях обмежувалась численними *абераціями* – похибками в зображенні, викликаними відхиленням променів від ідеального напрямку. Перших успіхів у подоланні аберацій було досягнуто в 1784 р., коли Ф. Т. У. Епінус на основі теоретичних узагальнень Л. Ейлера виготовив перший мікроскоп з ахроматичним об'єтивом. Пізніше, у 1808 р., ця модель була вдосконалена І. Г. Тідеманом.

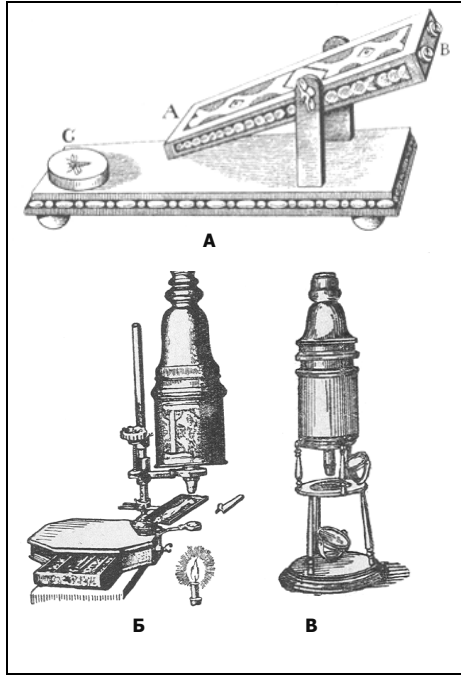


Рис. 2.4. Мікроскопи кін. XVII-XVIII ст.:
 А – стереомікроскоп Н. Грю,
 Б – Д. Маршалла, В – Е. Кульпепера
 (за Львіним М., 1954)

Створення й подальше вдосконалення ахроматичних об'єктивів, завдяки роботам Й. Фраунгофера, Д. Б. Амічі, Г. С. Плесля та інших, зробило мікроскопічні спостереження більш достовірними й дозволило розпочати систематичне вивчення тканинної та клітинної організації різних тваринних і рослинних організмів. Це, у свою чергу, дозволило в 1871 р. Ф. Фонтана побачити й замалювати ядра та ядерця у клітинах шкіри вугра. Згодом (1825–1827) Я. Е. Пуркінє описав ядро в яйцеклітині курки, а потім ядра в клітинах різних тканин тварин. У 1833 р. Р. Броун, спостерігаючи за клітинами орхідей, уперше описує ядро, зробивши висновок, що воно є обов'язковою частиною рослинної клітини.

У 20–30-ті рр. XIX ст. Я. Пуркінє формулює поняття про "протоплазму" (цитоплазму) як основний вміст живої клітини (головним у клітині почали вважати вже не її стінку, а саме вміст – протоплазму). 1836 р. учень Пуркінє Г. Валентин описує у ядрі ядерце.

Поступово починає накопичуватись матеріал про мікроскопічну організацію тканин тваринних і рослинних організмів та будову "клітин", уперше побачених Р. Гуком. Завершенням цього періоду є дослідження А. Дютроше, П. Горянінова, Я. Генле, М. Шлейдена та особливо Т. Шванна.

Накопичений величезний фактичний матеріал з мікроскопії живих об'єктів вимагав чіткого наукового аналізу й систематизації. 1837 р. Я. Пуркінє вперше формулює гіпотезу про єдність клітинної будови тварин і рослин. У 1838 р. ботанік М. Шлейден (рис. 2.5) зробив перші узагальнення стосовно клітинної будови всіх рослинних організмів. Зоолог Т. Шванн у 1839 р. поширює це узагальнення на всі тваринні організми (а також на одноклітинних), що й лягло в основу першого варіанта *клітинної теорії*, яка постулювала єдність клітинної будови всіх тваринних і рослинних організмів та принципову схожість (гомологію) клітин тваринних і рослинних організмів.

Разом із тим, М. Шлейден і Т. Шванн поділяли прийняті на той час, але хибні, погляди, згідно з якими клітини утворюються шляхом кристалізації міжклітинної рідини, центром якої вважалось ядро. Тривалий час це положення було частиною клітинної теорії. Зауважимо, що на час створення клітинної теорії, Б. Дюмортьє та Г. Моль уже описали поділ клітин нитчастих водоростей (1832–1835). Проте М. Шлейден і Т. Шванн віднесли до цих результатів з недовірою, оскільки під час поділу наявність ядра не спостерігалась, тоді як за вже прийнятим твердженням Р. Броуна воно має бути наявним у будь-якій клітині. Однак поступово накопичувались факти на користь результатів Б. Дюмортьє та Г. Моля. 1840 р. Ф. Унгер описує поділ клітин камбіальних клітин під час росту деревини. 1848–1861 рр. В. Гофмейстер спостерігає й замальовує окремі стадії мітотичного поділу.

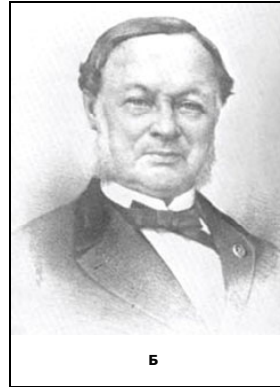


Рис. 2.5. Засновники клітинної теорії
М. Шлейден (А) і Т. Шванн (Б)

Хибне твердження щодо походження кліни виправив Р. Вірхов, який у 1855 р. сформулював тезу "кожна клітина від клітини" (*omnis cellula e cellula*), довівши, що єдино можливим шляхом утворення клітин є їхній поділ.

Детальний опис процесів поділу клітин і відкриття хромосом пов'язані з працями цілого ряду науковців. 1872 р. Е. Руссов описує хромосоми в метафазі та анафазі мітотичного поділу хвощів, у 1873 р. А. Шнейдер – фази поділу зиготи турбеллярії *Mesostomum*. 1874 р. І. Д. Чистяков наводить опис поділу клітин плауна і хвоща, заперечуючи прямий поділ ядерець та ядра. У 1875 р. детальний опис процесів мітозу здійснено Е. Страсбургером (спірогіра, пилоч цибулі, плаун), О. Бючлі (круглі черви, молюски, комахи) і В. Майзелем (жаба, ссавці). У 1878 р. поділ клітин епідермісу хвоста тритона описує П. І. Перемєжко. Цього ж року В. Шлейхер описує хромосоми та вводить термін "каріокінез", а В. Флеммінг – поділ клітин личинки саламандри та вводить термін "мітоз". 1880 р. О. В. Баранецький описує спіральну будову хромосом. 1883–1884 рр. Е. ван Бенеден і Е. Гейзер виявляють явище розщеплення хромосом під час поділу клітин, а в 1887 р. В. Флемінг описує мейоз (тип поділу, характерний для статевих клітин).

Створення клітинної теорії в середині XIX ст. було подією величезного значення. Вона не лише стала підґрунтям для розвитку таких дисциплін, як ембріологія, гістологія, фізіологія, теорія еволюції, але й заклала підвалини ідеї єдності всієї живої природи.

З розвитком уявлень про структуру живої клітини поглиблювались знання і про її хімічний склад. Визначальна роль у розвитку цитохімії (гістохімії) – науки про хімічний склад клітин і окремих її компонентів – належить французькому біологу Ф.-В. Распайлю. І хоча хімічні реакції ставили на зрізах мікропрепаратів і до нього (на зрізах рослинних тканин уже були виявлені танін і галова кислота (метод Лінка, 1807), крохмаль (метод де Клобі, 1814)), проте саме Ф.-В. Распайль уперше теоретично обґрунтував уже існуючі гістохімічні методи й розробив ряд нових, окресливши напрям перспективного розвитку гістохімії як науки. Він запропонував використовувати ксантопротеїнову реакцію для визначення білків, фурфуролову – вуглеводів, альдегідну – триптофану. Модифікувавши ряд методів аналітичної хімії, учений застосував їх для визначення окремих речовин на мікроскопічних об'єктах. Ним також було розроблено техніку мікроспалювання для визначення вмісту в тканинах деяких неорганічних сполук і окремих хімічних елементів. І хоча Науковий комітет Академії наук Франції не визнав революційних для свого часу підходів Ф.-В. Распайля, це не зупинило ані його самого, ані його послідовників.

У другій половині XIX ст. наукова думка не могла розвиватися без подальших успіхів гістологічної техніки та методів мікроскопічного дослідження. У цей період почали застосовувати водяні й масляні імерсійні об'єктиви, нові фіксатори (формалін, осмієва кислота), був винайдений мікротом. Було розроблено низку нових гістохімічних методик, упроваджено в практику анілінові барвники й гематоксилін, що суттєво прискорило розвиток уявлень про структурованість протоплазми (цитоплазми) клітини. У 1857 р. А. Кьолікером уперше було описано мітохондрії у м'язових клітинах, а в 1894 р. Р. Альтманом і в 1897 р. К. Бенда – на інших об'єктах (власне, К. Бенда й запропонував термін "мітохондрія"). Під назвою "тигроїд" Ф. Ніслем описано

гранулярну ендоплазматичну сітку. У 1875–1876 рр. Е. ван Бенеденом та В. Флеммінгом описано клітинний центр, у 1888 р. Т. Г. Бовері запропонував термін "центросома". К. Бенда в 1889 р. відкриває пластиди. У 1898 р. К. Гольджі, використавши техніку імпрегнації сріблом, відкрив пластинчастий комплекс, названий на його честь апаратом Гольджі. Метод імпрегнації сріблом дозволив започаткувати дослідження цитоскелета, провести фундаментальні дослідження нервової системи (С. Рамоні-Кахаль) і створити основи нейрогістології.

У Російській імперії (і, зокрема, на теренах України) у другій половині XIX ст. працював видатний біолог – І. І. Мечников, котрий відкрив явище фагоцитозу, яке він інтерпретував як захисну реакцію організму. Визнанням заслуг ученого стало присудження йому спільно з П. Ерліхом у 1908 р. Нобелівської премії за розробку вчення про імунітет.

Значному прогресові в цитологічних, гістологічних і ембріологічних дослідженнях сприяло створення в 1886 р. К. Цейсом і Е. Аббе світлового мікроскопа, який дозволяв аналізувати об'єкти, розміри яких були на межі теоретично можливої роздільної здатності світлового мікроскопа. Це стало можливим завдяки створенню Е. Аббе теорії світлової мікроскопії на основі хвильової теорії світла. Він показав, яку роль у формуванні зображення відіграють об'єктив та окуляр, створив класифікацію аберацій, що викривлюють зображення при мікроскопії, та сформулював поняття про межу роздільної здатності світлового мікроскопа. Е. Аббе створив оригінальну конструкцію конденсора та впровадив у мікроскопію цілий ряд інших технічних новацій. Зокрема, він вповні реалізував ідею, уперше висловлену ще в 1678 р. Р. Гуком, про створення імерсійного об'єктива. Перші такі об'єктиви в 1840 р. виготовив Дж. Б. Амічі, а в 1867 р. Е. Гундлах створив об'єктив для гліцеринової імерсії. У 1872 р. К. Цейс та Е. Аббе запроваджують виробництво водно- та масляно-імерсійних об'єктивів.

Наприкінці XIX ст. було розроблено основи методу ліофільного сушіння, з'явилися методи культивування клітин і тканин (І. Скворцов, Р. Гаріссон, А. Каррель та ін.).

Завдяки успіхам, досягнутим у сфері вивчення тонкої будови клітини, у кінці XIX ст. були закладені підвалини сучасної цитології.

XX століття відкрило перед цитологією та гістологією нові горизонти – з'явилися принципово нові методи й напрями досліджень. У практику цитології та гістології були впроваджені методи прижиттєвого аналізу, що сприяло розвитку цито- та гістофізіології. Стали широко застосовувати методи прижиттєвого введення барвників, у 1900 р. М. Гайдуков розробив метод дослідження живих об'єктів у мікроскопі темного поля. 1903 р. Р. Зігмонді та Г. Ф. Зідентопф сконструювали перший темнопольний мікроскоп. Тоді ж був винайдений мікроманіпулятор, за допомогою якого можна проводити операції на окремих клітинах (видалення ядер, розрізи клітин тощо) з метою визначення їхньої ролі та значення в життєдіяльності організму.

Відкриття явища радіоактивності зробило можливим появу нового методу – авторадіографії, уперше застосованого А. Лекассанем у 1924 р. За його допомогою стало можливо відслідковувати шлях різних речовин у процесі функціонування клітини. Цього ж року Р. Фельген і Х. Россенбек запропонували метод визначення ДНК, який згодом став класичним.

Загалом XX ст. відзначається суттєвим прогресом у мікроскопічній техніці. У 1912 р. Р. Райф сконструював перший ультрафіолетовий мікроскоп. Згодом, у 1930 р., О. О. Лебедев створив перший інтерференційний мікроскоп, а в 1932 р. Ф. Зерніке винайшов фазово-контрастний, у 1930-х рр. побачили світ перші електронні мікроскопи (у 1931 р. перший прототип такого мікроскопа розробили Е. А. Руска та М. Кноль).

Р. Г. Вільямс і В. Г. Віков у 1944 р. розробили метод контрастування металом і вже через рік К. Р. Портер, А. Клод і Е. Ф. Фуллам використали електронний мікроскоп для вивчення клітин у культурах після їхньої фіксації та забарвлення. У 1948 р. П. Пізу й Р. Ф. Бейкеру вперше вдалося проаналізувати в електронному мікроскопі зрізи біологічних об'єктів. Ще через декілька років (1952) Дж. Палладе, К. Р. Портером і Ф. С. Шестрандом було детально розроблено методи фіксації та виготовлення тонких зрізів. Це, зокрема, дозволило Г. Е. Хакслі

показати, що скелетний м'яз містить сітки білкових філаментів, які перекриваються. Таким чином, було отримано докази на користь гіпотези "ковзних ниток", що пояснює принцип скорочення м'яза. У 1930-ті рр. було закладено основи й іншого методу електронної мікроскопії – сканувальної (растрової). М. Кноль у 1935 р. запропонував ідею такого мікроскопа, а в 1938 р. фон Ардене П. створив його першу діючу модель.

Фундаментальним методом кількісного аналізу складу клітини став розроблений у 1936 р. Т. Касперсоном метод цитофотометрії.

У 1930–1940-х рр. удосконалюються гістохімічні методи. Так, А. Шабаш у 1939 р. запропонував метод виявлення глікогену, а Г. Гоморі й Х. Такамацу – лужної фосфатази. У 1942 р. Ж. Браше винайшов спосіб одночасного виявлення ДНК і РНК.

У 1941 р. А. Кунс уперше використав зв'язані з флуоресцентними барвниками антитіла для виявлення певних антигенів. Так виник метод імуноцитохімії (імуногістохімії). Він дозволив вивчати вибірково вміст і розподіл у клітині окремих білків.

У другій половині ХХ ст. завдяки широкому застосуванню просвічувальних і сканувальних електронних мікроскопів було здійснено прорив у вирішенні деяких наукових питань, зокрема у вивченні біологічних мембран. Так, створення в 1953 р. ультрамікроскопа (К. Р. Портер і Дж. Блом) разом із використанням запропонованого А. М. Глауртом та Р. Х. Глауртом середовища для замикання – аралдиту – дозволили Дж. Робертсону в 1957 р. створити першу тришарову модель біологічної мембрани. Того ж року М. Л. Стиром винайдено метод заморожування-сколювання, який згодом був удосконалений завдяки працям Х. Мура й К. Мюреталера, а в 1966 р. Х. Ч. Брентон застосував його для вивчення внутрішньої будови біологічних мембран.

Суттєвий успіх цитології того часу був пов'язаний з відкриттям нових органел. У 1945 р. К. Портером за допомогою електронного мікроскопа було досліджено й описано ультраструктуру ендоплазматичної сітки. У 1955 р. К. де Дюв описує лізосоми, а в 1965 р. – пероксисоми. Також у середині 1950-х років Дж. Паладе описує рибосоми (сам термін "рибосома" був запропонований Р. Робертсом у 1958 р.). Останньою у 1980-х роках Н. Кадершем

та Л. Ромом була описана структура, якій вони дали назву волт (від англ. *vault* – купол, вежа собору, склепіння) – загадкова органела рибонуклеопротеїнової природи з невідомими функціями.

У 1955–1959 рр. К. Холл, С. Бреннер і Д. Хорн розробили метод негативного контрастування, а С. Сінгер уперше використав антитіла, зв'язані з феритином для виявлення молекул клітини за допомогою електронного мікроскопа. Так була започаткована електронна імуногістохімія. Дещо пізніше, у 1963 р., Д. Сабатіні, К. Бенш і Р. Барнет почали використовувати глутаральдегід і осмієву кислоту для фіксації зразків для електронної мікроскопії.

Значного розвитку набули методи культури тканин і клітин, які дали можливість проводити вивчення функціонування окремих клітин у стандартизованих умовах. У межах цього напряму стало можливим вивчення, зокрема, ембріональних клітин. Ці методи внесли суттєвий вклад у розвиток такого наукового напрямку, як молекулярна біотехнологія.

У 1952 р. Е. Номарський описав нову систему диференціального інтерференційного контрасту. Також у 1950-х рр. С. Ньюбері конструює перший рентгенівський мікроскоп.

Науковий інтерес до прижиттєвого вивчення клітин в умовах клітинної культури зумовив появу та подальший розвиток нових мікроскопічних методів. Першим із них став метод конфокальної мікроскопії, який, у поєднанні з імуногістохімічним забарвленням, дозволив створювати тривимірне зображення живої клітини. Першу робочу модель такого мікроскопа було створено в 1955 р. М. Мінскі для вивчення нервових закінчень у шкірі. Новим словом у мікроскопії стала сканувальна зондова мікроскопія, яка дала змогу досліджувати поверхню об'єкта з нечуваною до цього часу точністю. Перший сканувальний зондовий (тунельний) мікроскоп (у якому було застосовано так званий "тунельний ефект") був сконструйований у 1981 р. Г. Біннігом і Г. Рорером. Наступного року Д. Пол запропонував сканувальний близькопольний мікроскоп, роздільна здатність якого досягала 50 нм. У 1989 р. побачив світ близькопольний акустичний мікроскоп з розділь-

ною здатністю 10 нм, а через п'ять років (1994 р.) – безапertureний близькопольний оптичний мікроскоп, роздільна здатність якого становила 1 нм.

Систематичні цитологічні та гістологічні (*гістологія* – наука, що вивчає будову, функції та розвиток тканин) дослідження на теренах України почалися в ХІХ ст., що було пов'язано зі створенням кафедр гістології на медичних факультетах Київського, Харківського й Львівського університетів. Корифеями української цитології та гістології стали видатні вчені – В. Бец, Н. Хржонщевський, В. Шимонович.

Першу в Україні кафедру гістології організував і очолив Н. Хржонщевський у 1867 р. на медичному факультеті Харківського університету. Наукові роботи колективу кафедри стосувалися вивчення будови надниркових залоз, легень, кровопостачання нирок. Н. Хржонщевський запропонував метод прижиттєвої ін'єкції барвників у клітини та тканини.

У Львівському університеті в 1896 р. було організовано гістологічну лабораторію під керівництвом професора Г. Кадія, а через рік кафедру гістології та ембріології (*ембріологія* – наука, що вивчає закономірності утворення та розвитку зародка) очолив професор В. Шимонович. Він досконало володів гістологічною технікою, на основі власного ілюстративного матеріалу підготував підручник гістології людини, який витримав одинадцять перевидань п'ятьма мовами. Наукові праці вченого були присвячені вивченню гістофізіології надниркових залоз, а також нервових закінчень.

Розвиток цитологічної науки в Україні у ХХ ст. нерозривно пов'язаний із розвитком гістології та ембріології, а також із перетворенням медичних факультетів університетів на самостійні вищі навчальні заклади та відкриттям медичних інститутів, де створювалися кафедри гістології.

Українська наука дала світу визначних ембріологів. М. Кащенко, вивчаючи будову людських атрофічних зародків, започаткував патологічну ембріологію. Він перший описав у сполучнотканинній основі ворсинок людського хоріона великі округлі клітини, які отримали назву клітин Гофбауера. С. Шахов завідував кафедрою гістології Київського (1930–

1953), а потім Одеського (1954–1958) медичного інституту. Його основні роботи присвячені вивченню ембріогенезу людини в нормі та патології.

Нині кафедри гістології та ембріології функціонують у багатьох вищих навчальних медичних закладах України.

Кафедра гістології в Київському університеті святого Володимира (тепер Київський національний університет імені Тараса Шевченка) була створена в 1868 р. Першим її завідувачем став професор П. І. Перемежко. Йому належать класичні роботи з мікроскопічної будови й ембріогенезу селезінки, щитоподібної залози, гіпофіза. Він описав особливості перебігу мітозу клітин епідермісу, сполучної тканини, ендотелію, лейкоцитів. У 1906–1924 рр. кафедрою завідував Ф. Ломінський – один із засновників гістофізіологічного напрямку в морфології. Він уперше описав мітотичний поділ у нейробластів. Професор Ломінський досліджував структуру кришталіка, фізіологічну дегенерацію посмугованих м'язових волокон, реактивні зміни клітин підшлункової залози.

У 30-ті роки ХХ ст. дослідженнями з експериментальної морфології, анатомії, гістології та трансплантації керував О. Івакін. За його участю в період, коли він очолював кафедру, був надрукований перший український підручник з анатомії людини з елементами гістології та ембріології. Для навчання студентів при кафедрі було створено гістологічний музей.

У 1944 р., коли у складних умовах післявоєнної розрухи відновлював свою діяльність Київський університет, кафедру анатомії, гістології та ембріології очолив професор Б. Г. Новиков, наукові інтереси якого завжди були пов'язані з проблемами біології розвитку, які формувалися під впливом О. О. Ковалевського, О. М. Северцова та І. І. Шмальгаузена. Б. Г. Новиков вивчав роль гіпоталамо-гіпофізарної системи в регуляції процесів розмноження, росту, формотворення та пристосування нейроендокринної системи до факторів зовнішнього середовища, зокрема сезонну циклічність розмноження і фотоперіодизм. У 1959 р. Б. Г. Новиков організував на базі Інституту фізіології Київського університету відділ фізіології розвитку, який став визначним осередком експериментальної біології як у складі

інституту, так і біологічного факультету. За його ініціативою на біологічних факультетах університетів було введено нормативний курс "Біологія індивідуального розвитку".

У 1981 р. на посаду завідувача кафедри цитології, гістології та біології розвитку було обрано доктора медичних наук, Лауреата Державної премії України В. М. Гордієнко, учня відомого гістофізіолога Б. В. Альошина. Наукові дослідження на кафедрі під його керівництвом були пов'язані з патоморфологічним аналізом ролі пептидергічних і нейромедіаторних систем гіпоталамуса в контролі функцій ендокринних залоз в онтогенезі та при метастазуванні злоякісних пухлин.

МІКРОСКОПІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ КЛІТИН

Історія розвитку методу світлової мікроскопії нараховує не одне століття, однак і сьогодні він залишається незамінним методом дослідження клітин. Значний прогрес у цілому ряді напрямків наукових досліджень пов'язаний з розробкою нових моделей мікроскопів. Визнанням внеску сучасних методів мікроскопії в розвиток біології стало вручення Нобелівської премії 2014 р. Е. Бетцигу, В. Е. Мернеру та С. Хеллю за створення флуоресцентної мікроскопії надвисокої роздільної здатності.

Різноманітні моделі мікроскопів за принципами створення зображення сьогодні можна поділити на декілька груп. До першої слід віднести *оптичні, або світлові, мікроскопи*, у яких зображення формується завдяки проходженню променів видимого світла через лінзи, виготовлені зі скла. До цієї групи також відносять ті різновиди мікроскопії, що використовують інфрачервоні та ультрафіолетові промені. До другої групи мікроскопів належать *електронні мікроскопи*, у яких зображення створюється завдяки потоку електронів, а як лінзи використовують потужні електромагніти, здатні відхиляти потік заряджених часток. У *рентгенівських мікроскопах* використовують електромагнітне випромінювання з довжиною хвилі від 0,01 до 1 нм.

Оскільки електромагніти чи скляні лінзи не можуть суттєво вплинути на напрямок руху цих променів, то в рентгенівських мікроскопах використовують спеціальні лінзи, принцип роботи яких заснований на явищі зворотного променезаломлення (так звані лінзи Снігір'єва). Останню групу мікроскопів становлять різноманітні *сканувальні силові (або сканувальні зондові) мікроскопи*, у яких зображення створюється завдяки взаємодіям різної природи між детектором та поверхнею досліджуваного зразка.

ОПТИЧНА МІКРОСКОПІЯ

Світлова мікроскопія

Світловий мікроскоп складається із двох систем – оптичної та механічної. Перша система забезпечує створення зображення об'єкта, а друга підтримує частини першої в певному положенні. До оптичної системи належать дзеркальце, конденсор з діафрагмою та системою світлофільтрів, об'єктив, окуляр, біокулярна насадка. До механічної – основа мікроскопа, штатив, мікро- та макрогвинти, гвинт конденсора, предметний столик із препаратом, револьверна голівка (на якій кріпляться об'єктиви), тубус.

Світло від його джерела (дзеркальце чи освітлювальний пристрій) іде до конденсора (рис. 2.6, А), який збирає окремі промені в пучок на препараті. Після проходження крізь об'єкт промені світла потрапляють до системи лінз об'єктива, де формується первинне зображення. За допомогою лінз об'єктива це зображення додатково збільшується.

Загальне збільшення мікроскопа вираховують як результат множення збільшення об'єктива на збільшення окуляра та (якщо мікроскоп біокулярний) на збільшення біокулярної насадки. Так, збільшення мікроскопа з об'єктивом $\times 40$, окуляром $\times 10$ і біокулярною насадкою $\times 1,5$ буде 600-кратним ($40 \times 10 \times 1,5 = 600$). За допомогою світлового мікроскопа вдається досягнути збільшення у 2000–2500 разів.

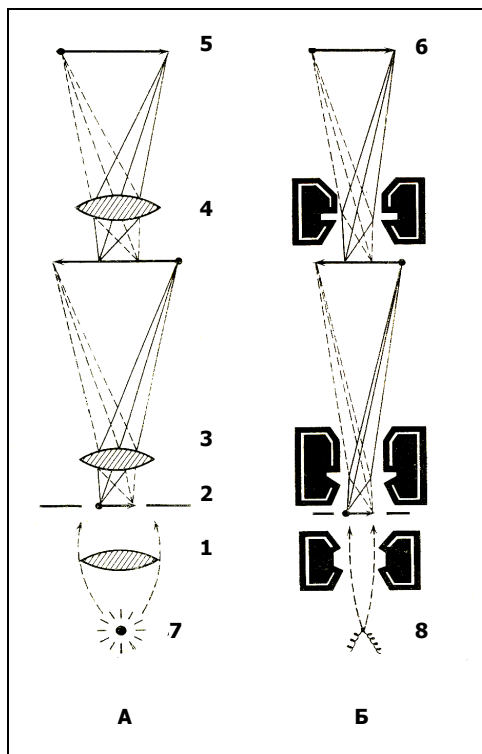


Рис. 2.6. Хід променів у світловому (А) та електронному (Б) мікроскопах:
 1 – конденсор; 2 – препарат; 3 – об'єктив; 4 – окуляр; 5 – зображення;
 6 – фотопластинка; 7 – джерело світла; 8 – джерело електронів
 (за Ченцовим Ю.С., 1995)

Збільшення мікроскопа залежить від його **роздільної здатності**, тобто найменшої відстані між двома точками, які помітні роздільно. Чим менша частка помітна в мікроскоп, тим більша його роздільна здатність. Остання, у свою чергу, установлюється апертурою об'єктива (апертура – "діючий" отвір оптичної системи, визначається розмірами лінз або діафрагмами) і довжиною хвилі світла.

Роздільна здатність мікроскопа обчислюється за формулою:

$$d = (0,61 \times \lambda) / (n \times \sin \alpha),$$

де d – роздільна здатність;

- λ – довжина світлової хвилі (ділянка видимої частини – 400–700 нм);
- n – показник заломлення середовища між препаратом і першою (фронтальною) лінзою об'єктива;
- α – кут (рис. 2.7) між оптичною віссю об'єктива та найбільш відхиленим променем, який потрапляє на об'єктив (*апертурний кут* або кут дифракції променів).

Величину $n \times \sin \alpha$, яка є постійною для кожного об'єктива, називають *числовою апертурою*.

Для світлової мікроскопії знаменник формули оптимізований наступним чином: для світла даної довжини світлової хвилі роздільну здатність можна обчислити за наближеною формулою $d \approx \lambda / 2$.

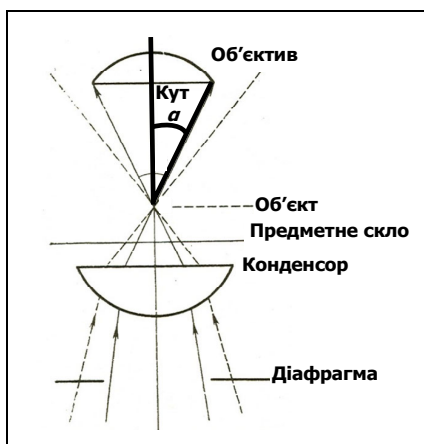


Рис. 2.7. Апертурний кут об'єктива мікроскопа (кут α)

Підвищення роздільної здатності мікроскопа, що є необхідною умовою деталізації структури клітини, досягається двома шляхами. По-перше, збільшенням числової апертури об'єктива, по-друге, зменшенням довжини хвилі світла, яким освітлюється об'єкт.

З метою збільшення числової апертури збільшують "кут зору" об'єктива (як у таких з великим збільшенням) або застосовують його спеціальні імерсійні модифікації. Простір між препаратом і фронтальною лінзою такого спеціального об'єктива заповнюють *імерсійною рідиною*. Як такі рідини використовують воду ($n = 1,33$), гліцерин ($n = 1,45$), кедрову олію ($n = 1,51$) (порівняно з n повітря, що дорівнює 1). Оскільки показник заломлення імерсійних рідин більше 1, то числова апертура об'єктива зростає, і в нього можуть потрапляти промені, які утворюють з оптичною віссю об'єктива більший кут, ніж у тому випадку, коли між фронтальною лінзою об'єктива та препаратом міститься повітря.

Інший шлях збільшення роздільної здатності мікроскопа передбачає застосування світла з довжиною хвилі меншою, ніж у променів видимого світла (фіолетове світло – близько 400 нм, зелене – близько 550 нм, червоне – близько 700 нм).

Обидві можливості збільшення роздільної здатності мікроскопа швидко вичерпуються. Так, при дослідженні препарату в променях білого світла без застосування імерсійних рідин d дорівнює 200–350 нм (або 0,2–0,35 мкм). Для порівняння, людське око має роздільну здатність 100 мкм (0,1 мм), отже, за допомогою приладу її буде збільшено в 1000 разів.

Модифікації світлового мікроскопа

Сьогодні існує багато різноманітних моделей світлових мікроскопів, які забезпечують можливість всебічного дослідження клітинних структур та їхніх функцій. Одним із різновидів світлового мікроскопа є *мікроскоп порівняння*, який дозволяє в одному полі зору побачити два об'єкти, котрі містяться на двох різних предметних столиках. Його використовують для більш зручного порівняння об'єктів (скажімо, нормальні та патологічно змінені клітини), оскільки він дозволяє тримати в одному полі зору як досліджуваний, так і еталонний об'єкти.

Стереомікроскоп дозволяє сприймати об'єкти об'ємно. Зображення предмета утворюють стереопару, що забезпечує передачу зображення об'єктів відповідно до того, як їх окремо бачить праве і ліве око людини. Існують дві основні оптичні схеми

стереомікроскопів – схема Аббе і схема Грену. У *схемі Аббе* є один об'єктив, складений з лінз великого діаметра, через який ведеться спостереження за допомогою променів, що вийшли під кутами стереоскопічності (11°). Завдяки такій схемі створюється велике поле зору, відсутні спотворення зображення при малих збільшеннях і можлива повна корекція аберацій об'єктива. Спостереження ведеться за допомогою бінокулярної насадки. Більшість моделей стереомікроскопів дослідного і лабораторного класу засновані саме на такій схемі. У *схемі Грену* два ідентичні об'єктиви нахилені під кутом близько 14° один до одного таким чином, що два оптичні канали повністю незалежні. Така схема забезпечує істотно більшу глибину фокусу, проте значне менше поле зору, порівняно зі схемою Аббе.

Іншою модифікацією є *інвертовані мікроскопи*, тобто мікроскопи, призначені для спостереження за об'єктом знизу, через предметне скло, чашку Петрі, скло колби чи лабораторного планшета. Такі мікроскопи часто застосовують для спостереження за культурами клітин.

Ряд модифікацій світлового мікроскопа пов'язані з використанням різних типів *візуальних насадок: монокулярних* (з одним окуляром, для спостереження одним оком) чи *бінокулярних* (дозволяють дивитися на препарат двома очима). Візуальні насадки можуть мати додатково фото- та відеовихід для фіксації зображення на фото- чи відеотехнічні пристрої. *Подвійні насадки* забезпечують можливість спостереження для двох спеціалістів одночасно. Також існують різновиди *насадок з додатковими візуальними виходами*, які забезпечують можливість одночасного спостереження 3–9 особами.

Мікроскопія в темному полі

Мікроскопія в темному полі, яка ґрунтується на явищі розсіювання світла між двома середовищами, що мають різні показники заломлення світла, вимагає застосування спеціального *темнопольного мікроскопа*, темнопольний конденсор якого забезпечує бічне освітлення об'єкта. Клітини препарату містять дрібні структури різної оптичної щільності й при освітленні збоку на загальному темному фоні вони починають світитися. Світлова пляма, яка

утворюється внаслідок розсіювання світла кожною часткою, за розмірами більша від самої частки. Це робить доступними для вивчення елементи клітини, розміри яких менші ніж 0,2 мкм, у відбитому від них світлі (*ефект Тиндаля*). Однак на роздільну здатність цей метод не впливає (тобто дрібні об'єкти, розташовані на відстані 200 нм будуть виглядати як один суцільний об'єкт).

Темнопольний мікроскоп широко застосовують при дослідженні мікроорганізмів і клітинних культур. Це дозволяє відокремити живі клітини, у яких світиться лише оболонка, від мертвих, котрі світяться яскраво. Крім того, він відкриває перспективи для дослідження внутрішньоклітинних структур, мітохондрій і міофібрил.

Поляризаційна мікроскопія

Поляризаційний мікроскоп (застосовується метод поляризаційного контрасту у світлі, що проходить) дозволяє виявляти об'єкти, здатні змінювати площину поляризації світлового променя. Таку здатністю мають об'єкти, фізичні властивості яких є неоднаковими в різних напрямках – *анізотропні* (до них належать, скажімо, деякі кристали й волокна), на відміну від усіх інших об'єктів – *ізотропних*. Кожна світлова хвиля, крім таких характеристик, як амплітуда коливань, довжина хвилі, фаза, має ще й певну площину, в якій ці коливання відбуваються (рис. 2.8). У світлі, джерелом якого є сонце або настільна лампа, кожна хвиля світла має свою площину поляризації. Таке світло називається *неполяризованим*.

Деякі речовини, наприклад *ісландський шпат*, здатні вибірково пропускати через себе лише хвилі з визначеною площиною поляризації, а решту "гасити". За таким принципом працюють поляризатор і аналізатор поляризаційного мікроскопа. Поляризатор міститься на шляху світла *до об'єкта*. Отже, об'єкт освітлюється поляризованим світлом, яке має одну єдину площину поляризації. Аналізатор розташований *за об'єктом* і дозволяє проходити крізь себе лише такому світлу, *площина поляризації якого перпендикулярна площині поляризації світла, яке пройшло крізь поляризатор*.

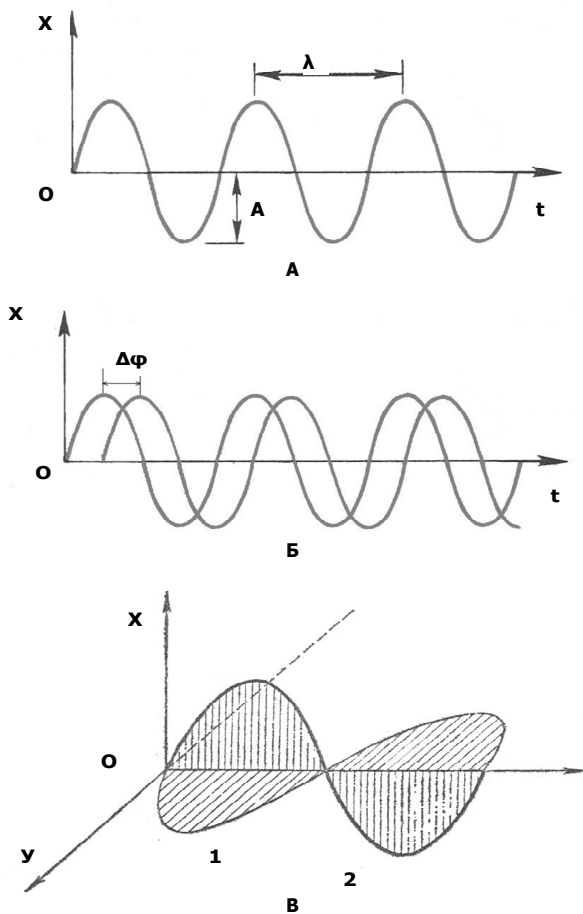


Рис. 2.8. Основні характеристики світлової хвилі:
 А – хвиля з амплітудою A та довжиною світлової хвилі λ ;
 Б – дві хвилі з однаковою амплітудою і довжиною хвилі,
 фази яких різняться на $\Delta\phi$; В – дві хвилі (1 і 2)
 з однаковою амплітудою та довжиною хвилі,
 коливання якої відбуваються в різних площинах

Таким чином, якщо досліджуваний об'єкт є ізотропним, а отже, нездатним змінити площину поляризації світла, то світлові промені крізь аналізатор не пройдуть, а поле зору буде темним.

Якщо ж на препараті є анізотропні структури, то ситуація стає дещо іншою. У цьому випадку світло розділяється на дві частини. Перша ("звичайний" промінь) не зазнає змін і зберігає вихідну площину поляризації. Друга має ті самі характеристики, що й звичайний промінь, за винятком площини поляризації, яка змінюється на перпендикулярну. Саме цей промінь, "повернутий навколо своєї осі", зможе пройти крізь аналізатор. Тому анізотропні об'єкти будуть виглядати в поляризаційному мікроскопі світлими. За допомогою додаткової пластини (λ -пластини) можна надати зображенню кольору – анізотропні об'єкти будуть виглядати забарвленими.

Фазово-контрастна та інтерференційна мікроскопія

Фазово-контрастна мікроскопія дає можливість отримувати контрастні зображення "прозорих", незабарвлених об'єктів, які практично неможливо побачити за допомогою стандартних методів світлового мікроскопічного аналізу. Метод ґрунтується на тому, що окремі ділянки "прозорого" препарату, відрізняються за показником заломлення світла (швидкістю проходження світла). Тому світлові хвилі (всі хвилі від одного джерела освітлення коливаються в одній фазі, тобто є *когерентними*), які проходять крізь них, поширюються з різною швидкістю, тобто має місце *зсув фаз*. За допомогою системи спеціальних кільцевих діафрагм на конденсорі та в об'єктиві у фазово-контрастному мікроскопі промені, які "відхилились на об'єкті", проходять дещо відмінний шлях, порівняно з променями, які пройшли повз нього.

Отже, світло проходячи через кільцевий отвір спеціального конденсора потрапляє на препарат. При цьому воно може заломитися (*дифрагувати*) на деяких деталях клітини (мембрани, внутрішньоклітинні компоненти), що мають дещо відмінні показники заломлення. Решта світла проходить через препарат не дифрагуючи. В об'єктиві "недифраговане" та "дифраговане" світло пройдуть загалом через різні ділянки фазової пластинки (через периферію та центр), що дасть можливість додаткового зсуву фази саме дифрагованого світла. Надалі відбувається *інтерференція* (накладання) "дифрагованого" та "недифрагова-

ного" світла, що тепер коливаються практично у протифазі. Фазові зміни при інтерференції перетворюються на світлові коливання різної амплітуди, що й формує контрастне зображення препарату, у якому розподіл освітленості відповідає розподілу фаз. Людське ж око чутливе саме до змін інтенсивності світла (а не фазових зсувів), яке залежить від амплітуди світлової хвилі. Відповідно, ті місця на препараті, що утворювали "дифраговане" світло будуть виглядати темнішими, за сусідні ділянки (*позитивний фазовий контраст*). При *негативному фазовому контрасті* "уповільнення по фазі" зазнає саме "недифраговане" світло, унаслідок чого досліджувані об'єкти виглядають світлими на темному тлі.

Застосування фазово-контрастного мікроскопа дозволило вивчити процес мітозу, будову хромосоми, включення, проаналізувати характер впливу на клітину різних хімічних сполук, зокрема токсинів і отрути. Цей метод широко застосовується при вивченні живих клітин.

Для фазово-контрастної мікроскопії характерне виникнення своєрідного "гало" – візуального ефекту навколо контуру досліджуваного об'єкта. Чим товстіший об'єкт, тим більш вираженим стає "гало", що призводить до втрати інформації. Одним із шляхів зменшення цього ефекту є використання методу *варел-контрасту*, за якого застосовується об'єктив із двома фазовими кільцями та розташована в конденсорі діафрагма з прорізю у вигляді кільцевого сектора розміром приблизно 1/3–1/4 діаметра самої діафрагми. При варел-контрастній мікроскопії поєднуються ефекти бічного освітлення під нахилом (для створення якого й використовується ця специфічна діафрагма) і фазового контрасту. Ефект "гало" зникає, зображення набуває псевдорельєфності. Цей метод широко застосовується для дослідження живих клітин у культурах.

Іншим шляхом удосконалення фазово-контрастної мікроскопії й позбавлення ефекту "гало" є *аподізований фазовий контраст*. При застосуванні цього методу використовується удосконалене фазове кільце, на якому по обидва боки фазозсувної пластини наносять два напівпрозорі покриття (плівки), що знижують інтенсивність світла, що дифрагує у зразку під малими кутами. При

використанні цього методу досягається більший контраст зображення, ніж у звичайному фазово-контрастному мікроскопі.

Інтерференційна мікроскопія (або метод інтерференційного контрасту) певним чином подібна до фазово-контрастної. Вона також дозволяє виявляти об'єкти, здатні впливати на фазу коливань світлової хвилі. Проте в інтерференційному мікроскопі світловий промінь, що має освітлювати об'єкт, розділяється на два когерентні (тобто однакові за всіма фізичними характеристиками). Один промінь проходить повз об'єкт, а інший – крізь нього. Після цього промені "зливаються", *інтерферують*. Якщо в об'єкті немає структур, котрі змінюють фазу коливань, при інтерференції виникає промінь інтенсивніший, ніж обидва вихідних. Якщо ж зсув фази відбувся, то промені взаємно гасяться й об'єкт виглядає темнішим. Мікроскоп дає змогу з високою точністю визначати фазовий зсув, за яким можна визначити кількість відповідної речовини на препараті.

Диференційно-інтерференційно-контрастна мікроскопія (ДІК-мікроскопія, або мікроскоп Номарського) поєднує, до певної міри, принципи поляризаційної та інтерференційної мікроскопії. У ДІК-мікроскопі спочатку за допомогою поляризатора утворюється поляризоване світло, яке далі потрапляє на призму Номарського – оптичного пристрою, який поділяє промінь на два, що йдуть на відстані 0,2 мкм і мають при цьому взаємно перпендикулярні площини поляризації. Промені проходять через сусідні ділянки препарату, котрі можуть відрізнятися за своїми властивостями та здатністю зсувати фазу одного променя відносно іншого.

Далі обидва промені потрапляють в об'єкти, де зустрічають на своєму шляху другу призму Номарського. На цей раз відбувається об'єднання двох променів в один зі спільною площиною поляризації, тобто відбувається інтерференція двох променів. Аналізатор, що стоїть далі на шляху об'єднаного променя, "вибирає" лише ту частину світла, яка має "визначену" ним площину поляризації. В інтерференційній картині світлішими виглядають зони, які не змінювали фазу коливань, на відміну від темніших, що утворюються при інтерференції про-

менів з різною фазою. За допомогою спеціальної додаткової пластини можна досягти додаткового кольорового контрасту.

ДІК-мікроскопія дозволяє отримувати якісне, позбавлене "гало" зображення прозорих об'єктів. Широкого вжитку цей метод набув у технологіях екстракорпорального запліднення.

Ще одним різновидом мікроскопії, за якого застосовується принцип перетворення фазових градієнтів на зразку на зміну інтенсивності світла, є *хофманівська модуляційна контрастна мікроскопія* (ХМКМ). У цьому мікроскопі використовуються спеціальний конденсор і об'єктив зі щілинними діафрагмами та поляризатор. Метод є популярним при дослідженні живих клітин, а також у технологіях екстракорпорального запліднення.

Усі перераховані вище види мікроскопії розширюють можливості дослідження об'єктів мікросвіту, проте не дозволяють суттєво збільшити роздільну здатність мікроскопа.

Ультрафіолетова мікроскопія

Як зазначалось вище, роздільна здатність світлового мікроскопа приблизно дорівнює половині довжини світлової хвилі. Отже, якщо взяти світло з меншою, порівняно з денним світлом, довжиною хвилі (скажімо, ультрафіолетове), то роздільну здатність мікроскопа можна було б значно збільшити. Проте людське око нездатне бачити ультрафіолетове випромінювання. Тому в *ультрафіолетовому мікроскопі* зображення виводять на фотоплівку або на люмінесцентний екран, що й дає змогу побачити зображення.

Флуоресцентна мікроскопія

Серед методів вивчення малих об'єктів *флуоресцентна (люмінесцентна) мікроскопія* посідає особливе місце. У флуоресцентному мікроскопі об'єкт також освітлюється ультрафіолетовим світлом, джерелом якого є спеціальна ртутна чи ксенонова лампа. Проте прилад даного типу застосовується для аналізу структур та молекул, здатних до флуоресценції (флуорофорів) – короткотермінового випромінювання під впливом ультрафіолетових променів з більшою довжиною світла. Так, хлорофіл у хлоро-

пластах за дії ультрафіолету світиться червоним світлом. У тому ж випадку, коли об'єкт не має здатності до флуоресценції, препарат може бути забарвлений спеціальними флуоресцентними барвниками, які можна виявити у флуоресцентному мікроскопі.

Конфокальна мікроскопія та мікроскопії надвисокої роздільної здатності

Надзвичайно важливим методом, який дозволяє вивчати дуже дрібні об'єкти й водночас створювати тривимірні реконструкції живих клітин, є *конфокальна мікроскопія*. Цей метод полягає в тім, що за об'єктивом установлюють діафрагму, яка зменшує поле зору практично до точки, проте дозволяє підвищити роздільну здатність і контрастність. Додатково саме світло фокусують також на тій самій точці препарату (рис. 2.9).

Зображення створюється шляхом "сканування" препарату, тобто об'єкт досліджується точка за точкою. Сканувати можна не лише одну площину, а декілька, одну за одною. По закінченні сканування на екрані комп'ютера відтворюється об'ємне зображення досліджуваного об'єкта. Як правило, конфокальний принцип поєднують з використанням флуоресценції. Застосовують також не звичайне світло, а лазер. Сучасні конфокальні мікроскопи за роздільною здатністю можна порівняти з ультрафіолетовими та електронними мікроскопами, проте, на відміну від останніх, конфокальні дозволяють досліджувати живі об'єкти.

Удосконаленням конфокального мікроскопа стала *двофотонна лазерна мікроскопія*. У цьому методі використовується *двофотонний ефект*: два фотони з низькою енергією (інфрачервоне світло 700–1000 нм) збуджують одну молекулу флуорофору, яка, у свою чергу, випромінює один квант світла видимої частини спектра (400–500 нм). Для створення достатньої інтенсивності інфрачервоного світла застосовується високочастотний сапфіровий лазер. Для посилення інтенсивності світла, що випромінюється флуорофором, використовується фотоелектронний помножувач. Поєднання цього принципу та конфокального мікроскопа (зображення створюється шляхом сканування зразка крапка за крапкою) дає можливість досягти

роздільної здатності 30–40 нм (що є значно вищим показником порівняно з таким в інших типах оптичних мікроскопів).

Подальше удосконалення цієї групи мікроскопів призвело до появи методів *світлової листової флуоресцентної мікроскопії* (СЛФМ), яка дозволяє значно прискорити процес сканування, що важливо для спостереження живих об'єктів.

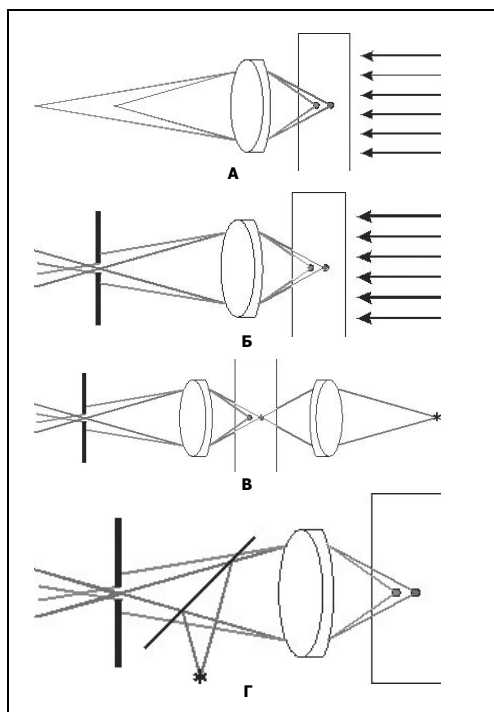


Рис. 2.9. Принцип роботи конфокального мікроскопа: А – хід променів у звичайному світловому мікроскопі, коли у фотоприймальній пристрій потрапляє світло з різних точок зразка; Б – застосування діафрагми дозволяє істотно знизити фонове підсвічування від точок зразка поза аналізованою ділянкою; В – додаткове підвищення контрасту досягається застосуванням підсвічування, що фокусує світло в аналізовану точку; Г – схема зі світлоділильною пластинкою спрощує конструкцію мікроскопа за рахунок подвійного використання об'єктива (для підсвічування та збирання відбитого сигналу)

(за Штейном Г. І., 2007)

У цьому методі тонкий прошарок зразка (кілька сотень нанометрів завтовшки) освітлюється перпендикулярно до напрямку спостереження лазером, промінь якого після проходження через циліндричну лінзу набуває форми плаского листа. Спостереження ведуть подібно до таких у флуоресцентному конфокальному мікроскопі. Проте сканування за допомогою світла, що "подається у площині" (замість точки як у конфокальній мікроскопії), дозволяє підвищити у 100–1000 разів швидкість сканування. У цьому мікроскопі знижений фоновий сигнал, зображення має високу контрастність, як і в конфокальному мікроскопі.

Гратчаста світлова листова мікроскопія (ГСЛМ) є подальшим удосконаленням принципів цього методу. Для того, щоб позбутись артефактів, поява яких викликана неідеальністю листового пучка світла, було застосовано гратчасту модель його зміщення крок за кроком з подальшою цифровою обробкою зображення, яка дозволяє позбутись розмитості, викликані похибками форми світлового пучка (технологія структурованого підсвічування). При цьому було поліпшено роздільну здатність флуоресцентного мікроскопа. Одночасне сканування за допомогою семи окремих пласких променів не лише дозволило додатково прискорити процес сканування, але й неочікувано знизило фототоксичність методу.

Гратчаста світлова листова мікроскопія є одним із методів **флуоресцентної мікроскопії надвисокої роздільної здатності**, за розробку яких у 2014 р. Е. Бетциг, В. Е. Мернер та С. Хелль отримали Нобелівську премію. До цих методів відносять також методи двох наступних груп.

Перша (**детермінована надвисока роздільна здатність**) об'єднує методи, в основі яких лежить явище нелінійної реакції на збудження, притаманна ряду флуорофорів, що використовуються при мікроскопії біологічних об'єктів. До цієї підгрупи належать, зокрема, метод мікроскопії **вимушеного виснаження випромінювання** (*Stimulated Emission Depletion Microscopy*, STED-мікроскопія), у якому надвисока роздільна здатність забезпечується шляхом вибіркової дезактивації флуорофорів; **мікроскопія виснаження основного стану** (*Ground State Depletion Microscopy*, GSD-мікроскопія), у якій подібний до по-

переднього методу ефект досягається опроміненням зразка світлом лише однієї довжини хвилі (що потребує залучення спеціальних флуорофорів); **мікроскопія зворотного насичення переходів оптичної флуоресценції** (*Reversible Saturable Optical Fluorescent Transition Microscopy*, RESOLFT-мікроскопія), у якій межа роздільної здатності долається за рахунок тимчасового "перемикання" так званих флуоресцентних білків, що оборотно перемикаються (*reversible switchable fluorescent proteins, rsFPs*) між двома станами – флуоресцентним і темним, за якого вони не можуть "відправляти" флуоресцентні сигнали при відповідному освітленні. У RESOLFT-мікроскопії поєднуються принципи STED- і GSD-мікроскопії. Структури, розташовані зазвичай дуже близько одна до одної, щоб "відокремити" їхнє зображення у звичайному світловому мікроскопі, зчитують послідовно, як і у випадку конфокальної мікроскопії.

До другої групи належать методи **стохастичної (випадкової) надвисокої роздільної здатності**. У цих методах використовується складна часова поведінка складних молекулярних джерел світлового випромінювання, що дає змогу відокремлювати в часі сигнали від близько розташованих флуорофорів. До цієї групи належить, зокрема, метод **оптичної флуктуації зображення надвисокої роздільної здатності** (*Super-Resolution Optical Fluctuation Imaging*, SOFI-мікроскопія), за якого здійснюється комп'ютерна постобробка ряду зображень, зроблених у послідовні часові інтервали, завдяки чому вдається виявити окремі флуоресцентні випромінювачі, що випромінюють з різними характеристиками, але розташовані надзвичайно близько один від одного. До цієї групи відносять також численні методи **мікроскопії локалізації поодиноких молекул** (*Single-Molecule Localization Methods*, SMLM), такі як SPDM (*Spectral Precision Distance Microscopy*), PALM (*Photo Activated Localization Microscopy*), FPALM (*Fluorescence Photo-Activation Localization Microscopy*), STORM (*Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*) тощо. Успішність цих методів досягається за рахунок тонких методик точкового освітлення об'єктів, цифрової обробки отриманих зображень тощо. Роздільна здатність таких методів знаходиться в нанометровому діапазоні.

Метод *мікроскопії структурованого випромінювання* (*Structured Illumination Microscopy, SIM*) ґрунтується на освітленні зразка світловим потоком певної складної моделі з подальшою комп'ютерною обробкою на основі математичних процедур Фур'є-аналізу. Застосовані системні модифікації дозволяють досягти надвисокої роздільної здатності.

Також потужний обчислювальний апарат використовується у *цифровій голографічній мікроскопії* (*Digital Holographic Microscopy, DHM*). У цьому методі інформація від фронту світлових хвиль у цифровому вигляді записується як голограма, з якої комп'ютер обчислює зображення об'єкта за допомогою чисельного алгоритму реконструкції. Об'єктив, що формує зображення у традиційній мікроскопії в цьому апараті, замінений на комп'ютерний алгоритм.

На сьогоднішній день флуоресцентна мікроскопія надвисокої роздільної здатності постає як напрямок мікроскопії, який найбільш динамічно розвивається. Це сприяє постійній появі нових і видозміні існуючих методів, що, у свою чергу, відкриває нові можливості для прижиттєвого дослідження молекулярних процесів у клітинах та їхніх угрупованнях.

ЕЛЕКТРОННА МІКРОСКОПІЯ

Просвічувальна (трансмійсна) електронна мікроскопія

Важливим етапом у розвитку мікроскопічної техніки стало створення *електронного мікроскопа*. Його загальний план будови досить схожий із планом будови звичайного світлового або ультрафіолетового мікроскопів. Тільки замість світлових променів у ньому використовується потік електронів, випромінюваний із електронної гармати. Між катодом і анодом електронної гармати створюється напруга 50–150 кВ, яка розганяє електрони до великої швидкості. При цьому вони мають дуже малу довжину хвилі, тому електронний мікроскоп практично вирішує проблему роздільної здатності при вивченні біологічних об'єктів, оскільки в ньому можна побачити навіть окремі атоми, а не тільки молекули. Роздільна здатність сучасного електронного мікроскопа дося-

гає 0,1 нм. Проте тут постають кілька інших проблем. Так, електрони дуже дрібні, а тому навіть молекули в повітрі здатні неконтрольовано відхиляти напрямок їхнього руху. Отже, із корпуса електронного мікроскопа треба відкачати повітря. У світловому мікроскопі промені світла фокусують скляні лінзи, але тут їх не можна застосувати, оскільки скло не просто відхилить електрони, а взагалі не пропустить їх далі. Тому замість скляних конденсора, об'єктива та окуляра в електронному мікроскопі послуговуються потужними електромагнітами.

Звичайно, жодна людина ще не бачила електрон "неозброєним оком", тому зображення в електронному мікроскопі створюється на люмінесцентному екрані чи фотоплівці. Така фотографія називається *електронограмою*. Знімки зазвичай чорнобілі, тобто об'єкти на них різняться лише за ступенем яскравості, який залежить від того, наскільки "проникні" для електронів ті чи інші об'єкти. Але іноді ділянки з однаковим ступенем освітленості додатково забарвлюють у якийсь колір, ділянки з іншим ступенем освітленості – в інший і т. д. У результаті утворюється електронограма із "симульованими кольорами".

Описаний тип електронного мікроскопа називається *просвічувальним, або трансмісійним* (рис. 2.10). Він дозволяє розглянути досить тонкі зрізи на препаратах (до 0,1 мкм). Товстіші – просто затримують, зупиняють потік електронів. Проте часто досліднику необхідно встановити тривимірну будову клітини. Для розв'язання цієї проблеми застосовують різні підходи. Один із них полягає у створенні тривимірної реконструкції на основі серійних зрізів. З цією метою зображення певної структури на кожному серійному зрізі послідовно вводять у комп'ютер і за допомогою спеціальної програми відтворюють тривимірний вигляд даної структури.

Високовольтна електронна мікроскопія

Іншим підходом у вивченні малих об'єктів є застосування *високовольтного електронного мікроскопа*. Цей різновид звичайного трансмісійного мікроскопа відрізняється використанням вищої напруги (1–3 млн Вт), що дозволяє розігнати електрони до більшої швидкості, а отже, вони набувають здатності проходити через тов-

тіший зріз препарату. Більш того, препарат можна розглядати на різних рівнях, безпосередньо створюючи уявлення про тривимірну будову досліджуваних структур. Роздільна здатність високовольтного електронного мікроскопа становить близько 0,5 нм.

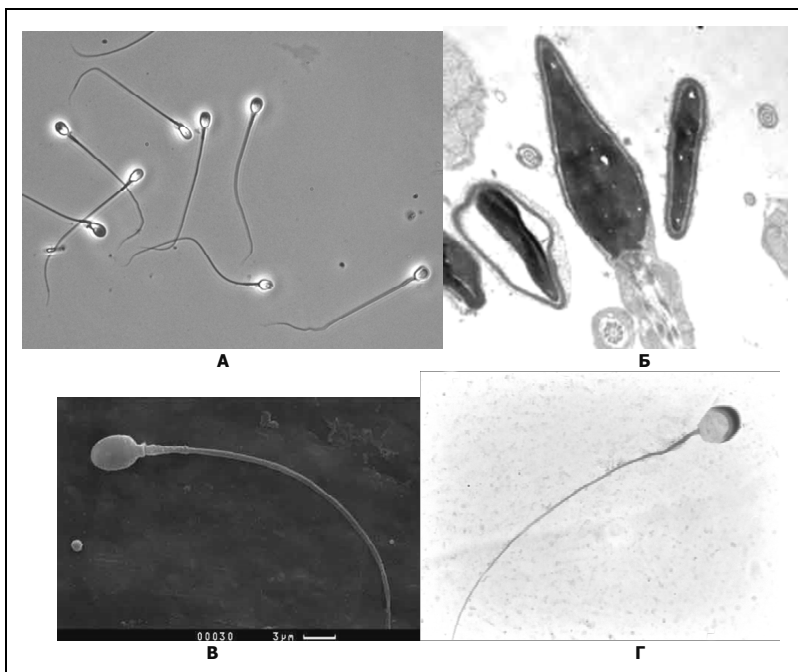


Рис. 2.10. Зображення, отримані з використанням різних типів мікроскопів:

А – фазово-контрастний; Б – трансмісійний електронний;

В – сканувальний електронний, Г – світловий

(А – режим доступу: <http://www.ya-zdorova.ru/lechenie/areas/andrology/spermogram/>;

Б, В – режим доступу: <http://www.myshared.ru/slide/404667/>)

Кріоелектронна мікроскопія

Кріоелектронний мікроскоп (заморожувальний електронний мікроскоп) дозволяє вивчати заморожені за температури рідкого азоту суспензії вірусів, бактерій, дрібних клітин тощо, або заморожені зрізи (до 200 нм товщиною), виготовлені на кріоультрамикротомі. За допомогою цього мікроскопа можна вивчати нефіксований матеріал.

Заморожений зразок досліджують в електронному мікроскопі за просвічувальним алгоритмом (зазвичай використовуються електронні мікроскопи з напругою 200 кВ).

Зрізи для криоелектронної мікроскопії залишаються неконтрастованими, тому для підвищення якості зображення застосовують фільтри, що відсікають частину електронів залежно від їхньої енергії. Також використовуються методи цифрового аналізу зображення.

На сьогодні метод криоелектронної мікроскопії дає змогу досліджувати об'єкти з роздільною здатністю до 0,22 нм (на рівні окремих молекул).

Сканувальна (растрова) електронна мікроскопія

Для вивчення поверхонь біологічних об'єктів, зокрема тривимірної будови сколів клітин, застосовують *сканувальну, або растрову, електронну мікроскопію*. При цьому методі пучок електронів проходить уздовж поверхні досліджуваного об'єкта й відбивається від нього в різні боки. Спеціальні детектори фіксують напрямки, у якому відбивається потік електронів, і на основі цього створюється тривимірна реконструкція поверхні досліджуваного об'єкта. Растрову електронну мікроскопію за способом формування зображення, загальною схемою руху електромагнітних хвиль можна порівняти з мікроскопією у відбитому світлі.

РЕНТГЕНІВСЬКА МІКРОСКОПІЯ

Рентгенівські мікроскопи

Дослідження об'єктів, розміри яких зіставні з "розмірами" рентгенівських хвиль, стало можливим із застосуванням *рентгенівських мікроскопів*. Зображення формується електромагнітними хвилями з довжиною від 0,01 до 1 нм. А отже, такий мікроскоп за цим параметром займає місце між оптичними та електронними мікроскопами. Роздільна здатність сучасних рентгенівських мікроскопів досягає 5 нм.

Однак рентгенівські промені неможливо фокусувати скляними лінзами, які застосовуються в оптичних мікроскопах, оскільки показник їхнього заломлення у різних середовищах відрізняється дуже мало, практично завжди дорівнюючи 1. З іншого боку, рентгенівські промені не відхиляються електричними та магнітними полями, що робить неможливим використання для фокусування цих променів електромагнітні "лінзи", як це має місце в електронних мікроскопах. Тому в сучасних рентгенівських мікроскопах використовують лінзи, "робота" яких заснована на ефекті зворотного променезаломлення, що ґрунтується на різниці коефіцієнтів заломлення у конденсованій речовині відносно повітря. Функції лінзи при цьому виконує лінзоподібна порожнина всередині матеріалу, яку назвали *лінзою Снігирьова*.

Оскільки рентгенівські промені, як і ультрафіолетові промені й потоки електронів, людське око не сприймає, для візуалізації зображення застосовують фототехніку або електронно-оптичні перетворювачі.

Нині використовують два типи рентгенівських мікроскопів: проєкційні та відображувальні.

Проекційні рентгенівські мікроскопи

Висока проникна здатність рентгенівських променів використовується у *проекційних рентгенівських мікроскопах*. У цих апаратах досліджуваний об'єкт розташовується перед джерелом випромінювання та просвічується рентгенівськими променями. Оскільки коефіцієнт поглинання рентгенівського випромінювання залежить від розмірів атомів, крізь які воно проходить, стає можливим отримувати інформацію не лише про структуру об'єкта, але й про його хімічний склад.

Проекційні рентгенівські мікроскопи побудовані з камери, у протилежних кінцях якої містяться джерело випромінювання та реєструючий пристрій. Для отримання чіткого зображення необхідно, щоб кутова апертура джерела була якомога меншою.

У мікроскопах цього типу донедавна взагалі не використовувалися додаткові оптичні прилади. Максимальне збільшення отримували завдяки розміщенню об'єкта на мінімально можливій відстані від джерела рентгенівського випромінювання. Для

цього фокус трубки виставлявся безпосередньо на вікні рентгєнівської трубки або на вершині голки анода, розміщеної поблизу вікна трубки. Останнім часом розроблено мікроскопи, у яких використовуються зонні платівки Френеля (діафрагма з отворами у вигляді концентричних кілець, що має вибірково пропускати інформацію про зображення лише від однієї точки й "гасити" від сусідніх) для фокусування зображення. Роздільна здатність таких мікроскопів досягає 30 нм.

Відображувальні рентгєнівські мікроскопи

Явище заломлення рентгєнівських променів при ковзному падінні застосовано у **відображувальному рентгєнівському мікроскопі**. У мікроскопах цього типу використовуються прийоми, що дозволяють добитися максимального збільшення. Так, зображення створюється завдяки складній системі дзеркал, а для фокусування рентгєнівського випромінювання застосовуються вигнуті монокристали.

Підсумовуючи, зауважимо, що рентгєнівські мікроскопи набули широкого застосування в різних сферах науки, у тому числі в біології та медицині. Завдяки ним можна отримати мікрорентгєнографії зрізів клітин завтовшки 200 мкм. Важливою їхньою перевагою є можливість спостерігати нефіксовані живі клітини.

СКАНУВАЛЬНА ЗОНДОВА (СКАНУВАЛЬНА СИЛОВА) МІКРОСКОПІЯ

Сканувальні зондові мікроскопи

Існує клас мікроскопів, призначених для отримання зображення поверхні та її локальних характеристик – **сканувальні зондові мікроскопи (СЗМ, сканувальні силові мікроскопи)**. Процес формування зображення заснований на скануванні поверхні зондом. У загальному випадку такі мікроскопи дозволяють отримати тривимірне зображення поверхні (топографію) з високою роздільною здатністю.

Дія сканувального зондового мікроскопа заснована на взаємодії поверхні зразка із зондом (кантилевер, голка, або оптичний зонд). За малої відстані між поверхнею і зондом дію сил взаємодії (відштовхування, тяжіння тощо) і прояв різних ефектів (скажімо, тунелювання електронів) можна зафіксувати за допомогою сучасних засобів реєстрації. Для цього використовують різні типи сенсорів, чутливість яких дозволяє зафіксувати малі за величиною відхилення. Для отримання повноцінного растрового зображення використовують різні пристрої розгортки по осях X і Y (наприклад, п'єзотрубки, плоскопаралельні сканери тощо).

На перший погляд СЗМ має близькі характеристики до растрової електронної мікроскопії (до певної міри ці методи доповнюють один одного). Проте мають місце суттєві відмінності. Так, СЗМ дозволяють отримати не псевдотривимірне зображення, як на растровому електронному мікроскопі, а істинно тривимірний рельєф поверхні зразка. Різні методи СЗМ дозволяють вивчати як провідну, так і непровідну поверхню, тоді як дослідження растрового електронного мікроскопа обмежено металевими репліками (відбитками) поверхонь біологічних об'єктів. Робота СЗМ не потребує вакууму й дозволяє вивчати біологічні об'єкти без попередньої обробки, живими. Також важливим є те, що методи СЗМ мають потенційно вищу роздільну здатність, що наближається до значень, притаманних трансмісійній електронній мікроскопії. Водночас, можливості СЗМ обмежені порівняно малим полем сканування з мінімальним перепадом висот. Крім того, сканування СЗМ відбувається доволі повільно.

Сьогодні існує цілий ряд СЗМ. Це тунельний мікроскоп, атомно-силовий, близькопольно-оптичний мікроскоп та ін.

Сканувальний тунельний мікроскоп

Тунельна мікроскопія заснована на явищі квантової природи, що отримало назву *тунельного ефекту*, або *тунелювання*, яке полягає в можливості подолання мікрочасткою (у даному випадку електроном) певного потенційного бар'єра. У тунельному мікроскопі це проявляється у стрибку електрона через діелектрик тоді, коли два провідники (досліджувана поверхня та голка

детектора-кантилевера) наближаються на відстань, порівняну з розміром атома. Рух електронів, пов'язаний з тунельним ефектом, отримав назву *тунельний струм*.

У тунельному мікроскопі металева голка (кантилевер) підводиться до зразка на відстань у кілька ангстремів (0,1 нм). При створенні різниці потенціалів між поверхнею досліджуваного об'єкта (наприклад, репліка – відбиток сколу клітини) і голкою виникає тунельний струм. Його величина експоненційно залежить від відстані між зразком і голкою.

У процесі сканування голка рухається вздовж поверхні зразка, тунельний струм підтримується стабільним за рахунок дії зворотного зв'язку: при зміні сили струму голка піднімається або опускається, відтворюючи коливання рельєфу поверхні. Такі зміни фіксуються, і на їхній основі будується карта висот. Інший підхід передбачає рух голки на фіксованій висоті над поверхнею зразка. У цьому випадку фіксується зміна величини тунельного струму, і на основі цієї інформації йде побудова топографії поверхні (рис. 2.11).

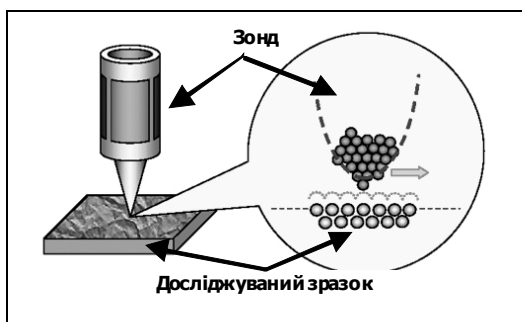


Рис. 2.11. Принцип дії тунельного мікроскопа
(за Мироновим В.Л., 2004)

У 1986 р. Г. К. Бінніг і Г. Рорер, розробники тунельного сканувального мікроскопа отримали Нобелівську премію разом з автором електронного мікроскопа Е. А. Руска.

Сканувальний тунельний мікроскоп дозволяє не лише вивчати поверхню об'єкта, але й маніпулювати окремими атомами.

Так, намагаючись продемонструвати реальність нанотехнологій, Д. Айглер та Е. Швайцер у 1990 р. використали тунельний мікроскоп для того, щоб 35-а атомами ксенону написати на нікелевій поверхні слово "IBM".

Атомно-силова мікроскопія

Атомно-силові мікроскопи (АСМ) використовують пружну консоль (кантилевер) для визначення рельєфу поверхонь тіл, які не є провідниками струму. Серед іншого, за допомогою АСМ можна вивчати і рельєф поверхні живих клітин.

Кантилевер рухається вздовж поверхні зразка, взаємодіючи з нею за рахунок вандерваальсових та інших сил (рис. 2.12). При цьому консоль зазнає деформації. Промінь лазера, спрямований на зовнішню поверхню консолі, відбивається і потрапляє на фотодетектор. За найменших відхилень консолі напрямок руху лазерного променя суттєво змінюється, що й реєструється фотодетектором. В інших моделях АСМ п'єзовібратором збуджуються коливання кантилевера з певною частотою та фазою. При наближенні до поверхні на кантилевер починають діяти сили, які змінюють його частотні параметри. У такий спосіб, відстежуючи частоту й фазу коливань кантилевера, можна зробити висновок про зміну сили, що діє з боку поверхні й, відповідно, про рельєф поверхні.

Залежно від характеру дії сили між кантилевером та поверхнею зразка виділяють три режими роботи АСМ: контактний, напівконтактний та безконтактний. При контактному режимі кантилевер постійно безпосередньо контактує з досліджуваною поверхнею. Цим методом можна досліджувати металеві репліки (відбитки) живих об'єктів, але не самі живі клітини.

При роботі в безконтактному режимі п'єзовібратором на деякій частоті (найчастіше резонансній) збуджуються коливання зонда. Сила, що діє з боку поверхні, приводить до зміни амплітудно-частотної та фазово-частотної характеристик зонда (його амплітуда й фаза змінюють значення). Система зворотного зв'язку підтримує постійною амплітуду коливань зонда, а зміна частоти й фази в кожній точці записується. Зонд при цьому режимі до поверхні зразка не торкається.

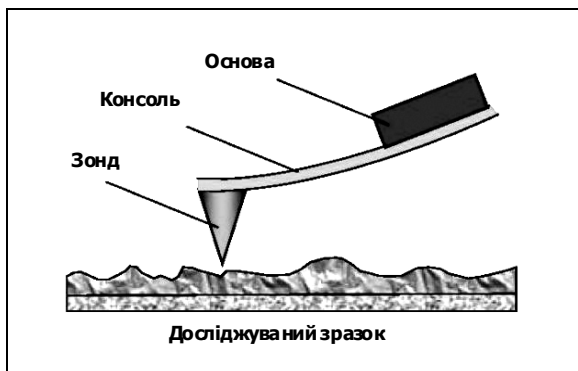


Рис. 2.12. Взаємодія кантилевера з досліджуваним зразком при АСМ
(за Мироновим В.Л., 2004)

Найбільш поширеним є напівконтактний режим, за якого кантилевер коливається як і при безконтактному режимі, але в нижній точці коливань доторкується до досліджуваного об'єкта. Цей режим, що є найуніверсальнішим, дозволяє для більшості зразків отримувати зображення поверхні з роздільною здатністю до 1–5 нм.

Подальший розвиток АСМ зумовив появу таких різновидів СЗМ, як *магнітно-* та *електросилова мікроскопія*. У мікроскопах цих типів після визначення рельєфу поверхні методом АСМ кантилевер підіймається на певну відстань над зразком і повторно сканує його, фіксуючи зміни електричного (електросиловий мікроскоп) чи магнітного (магнітно-силовий мікроскоп) поля.

Близькопольна оптична мікроскопія

Апертурні близькопольні оптичні мікроскопи є різновидом СЗМ, при якому як зонд використовується мініатюрна діафрагма з отвором у декілька нанометрів.

Відповідно до законів хвильової оптики, видиме світло (з довжиною хвилі декілька сотень нанометрів) проникає в маленький отвір на відстань, зіставну з розмірами самого отвору. Якщо в межах цієї відстані, у так званому "ближньому полі", розташу-

вати зразок, то можна зареєструвати розсіяне ним світло. Перемищуючи ж діафрагму в безпосередній близькості від зразка, як у тунельному чи атомно-силовому мікроскопі, можна отримати растрове зображення поверхні. Зображення при цьому реєструється шляхом "фіксації" розподілу інтенсивності оптичного випромінювання залежно від положення діафрагми. Контраст на створених близькопольними оптичними мікроскопами (БОМ) зображеннях визначається процесами відбиття, заломлення, поглинання та розсіювання світла, які залежать від локальних оптичних властивостей зразка.

В апертурних близькопольних мікроскопах субхвильова діафрагма виготовляється зі світловолокна. Через таку світловолоконну діафрагму проходить світло, яким освітлюється зразок, і за її участю (у сучасних моделях) відбувається реєстрація світла, відбитого від зразка (рис. 2.13.).

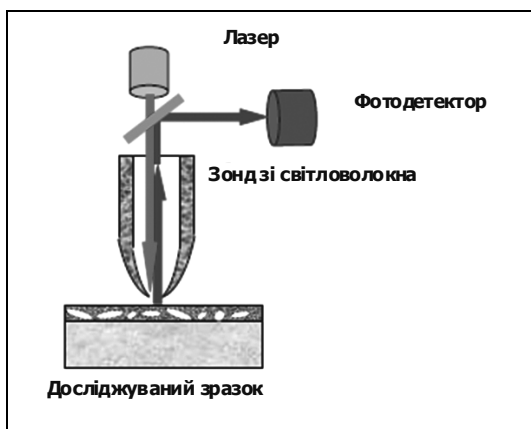


Рис. 2.13. Принцип дії апертурної БОМ
(за Мироновим В.Л., 2004)

У БОМ також може бути використаний ефект флуоресценції, або двофотонний ефект. Контроль відстані між детектором та зразком здійснюється аналогічно з АСМ: на світловолокно подаються автоколивання, спостерігаючи за змінами параметрів

яких можна судити про відстань між зразком і світловолоконном. Роздільна здатність апертурних БОМ досягає 13 нм.

Безапертурні близькопольні оптичні мікроскопи як зонд використовують тонку голочку, наближену на субхвильову відстань до зразка. Відсутність фізичних обмежень розміру вершини зонда в безапертурних БОМ дозволяє досягти в них роздільної здатності менше 1 нм.

МЕТОДИ ПІДГОТОВКИ МАТЕРІАЛУ ДЛЯ ЦИТОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ КЛІТИН

Кожен із методів, який використовують в експериментальній цитології, має свої переваги, недоліки та характерну (специфічну, а інколи й унікальну) сферу застосування.

Порівняння результатів, отриманих із використанням різних методів, дає можливість різнобічної характеристики досліджуваного об'єкта.

Розрізняють методи досліджень прижиттєві (*вітальні*) і *фіксованого матеріалу*.

ПРИЖИТТЄВІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Головною проблемою, із якою стикається дослідник при вивченні живих об'єктів, є низький показник заломлення світла вмістом живої клітини. Тому для спостереження за живими об'єктами застосовують методи темного поля, фазового контрасту, поляризаційну, флуоресцентну та конфокальну мікроскопію. Для виділення окремих структур спеціально для прижиттєвих досліджень використовують також барвники з якомога меншою токсичністю (*вітальні барвники*), які беруть у мінімальних концентраціях. Це янус зелений, нейтральний червоний, метиленовий синій тощо. При вивченні живих об'єктів, яким не влас-

тива власна флуоресценція, у люмінесцентній мікроскопії по-слуговуються флуоресцентними барвниками – *флуорохромами*.

Часто виникає необхідність втручання дослідника у процеси, що відбуваються в живій клітині. Для цього застосовують **мікрургію** (*мікрохірургію*). За допомогою спеціальних приладів (мікроманіпуляторів) та інструментарію (скляних голок, піпеток, петель, електродів тощо) можна видаляти й пересаджувати із клітини в клітину ядра, окремі органели, визначати прижиттєву кислотність внутрішньоклітинних структур, вимірювати різницю потенціалів та ін.

Метод культури тканин і клітин

Особливим методом дослідження живих об'єктів є **метод культури тканин і клітин**. При цьому окремі клітини або невеликі ділянки органів вміщують у спеціальне поживне середовище, сприятливе для життєдіяльності та розмноження клітин. У такий спосіб можна спостерігати весь життєвий цикл клітин, вивчати їхню стійкість до окремих факторів зовнішнього середовища або вплив тих чи інших біологічно активних речовин безпосередньо на ті чи інші клітини. Подібні дослідження (*in vitro*) дозволяють зробити висновки саме про безпосередню взаємодію клітини й зовнішнього чинника. Проте в організмі впливи різноманітні та, як правило, опосередковані, тому результати досліджень у клітинних культурах механічно ніколи не переносять на живий організм. У цьому разі слід проводити дослідження *in vivo*, тобто на живому об'єкті.

Метод авторадіографії

Для вивчення шляхів руху та перетворення речовин у клітині застосовують **метод авторадіографії**. Ним можна скористатися для дослідження як клітин у культурі, так і фіксованого матеріалу. Для вивчення клітин у цей спосіб у поживне середовище, культуру клітин (в їжу або в кров досліджуваного об'єкта) вводять речовину – попередник молекули, топографію біосинтезу якої потрібно вивчити. При цьому ця речовина повинна мати

у своєму складі радіоактивний ізотоп (наприклад, ізотоп водню – тритій), що поступово розпадається. Місця його розпаду виявляються завдяки фотоемulsії, яка наноситься на препарат чи поверхню досліджуваних клітин по закінченні терміну експерименту. Варіюючи час, який мічений радіоактивним ізотопом попередник перебуває в організмі або клітині, можна встановити шляхи його руху по клітині чи органах тіла тощо.

МЕТОДИ РОБОТИ З ФІКСОВАНИМ МАТЕРІАЛОМ

Методи роботи з фіксованим матеріалом є широко вживаними у практиці цитологічних досліджень. Інколи (якщо, скажімо, працюють з електронним мікроскопом) попередня обробка матеріалу та умови мікроскопування повністю виключає можливість дослідження живої клітини. У цьому разі найважливішим виявляється вдала *фіксація* клітинного матеріалу, тобто така зупинка життєдіяльності клітини, за якої всі складові клітини залишалися б у місцях прижиттєвої локалізації в незміненому стані.

Розрізняють фізичні й хімічні методи фіксації. До *фізичних методів* відносять заморожування та фіксацію нагріванням або сушінням. Так, для приготування препарату для сканувального електронного мікроскопа застосовують метод *заморожування-сколювання*. Спочатку матеріал заморожують у рідкому азоті, що виключає утворення кристалів льоду, які можуть пошкодити матеріал. Потім заморожені клітини розколюють холодним ножем. Сколи при цьому, як правило, ідуть по середині біліпідного шару мембран. Потім матеріал нагрівають у вакуумі, у результаті частина льоду сублимується (переходить одразу в газоподібний стан). Унаслідок цього процесу поверхня сколу стає рельєфнішою. Потім на неї наносять тонку плівку важкого металу (золота, платини тощо), яка точно повторює рельєф поверхні об'єкта. Відтак власне клітину руйнують кислотою (цей процес називають *травленням*) і об'єктом мікроскопічного дослідження стає саме плівка з важкого металу – *репліка*.

Хімічні методи фіксації – це введення у клітину тієї чи іншої речовини або суміші, яка припиняє в ній процеси життєдіяльності, зупиняючи всі процеси, зокрема процеси аутолітичного руйнування клітини. Різні фіксатори мають різні механізми дії. Деякі (спирти) осаджують (денатурують) білки, для інших (альдегіди) є властивим утворення молекулярних містків, що ковалентно зв'язують органічні молекули, обмежуючи їхню рухливість.

Розрізняють прості та складні фіксатори. *Прості* – це розчини якоїсь однієї сполуки, наприклад, 96°-й етиловий спирт або метанол, формалін (розчин формальдегіду у воді), розчин глутарового альдегіду тощо. *Складні* фіксатори (*фіксувальні суміші*) містять декілька речовин, що забезпечують швидшу (попередню) і надійнішу, але більш повільну фіксацію. Прикладами складних фіксаторів є суміші Буена (формалін – пікринова кислота – оцтова кислота), Карнуа (етанол – хлороформ – оцтова кислота), Нікіфорова (етанол – діетиловий ефір), суміш спирт – оцтова кислота (СОК) тощо.

Для досягнення якісної фіксації необхідно, щоб фіксатор якомога швидше досяг глибинних шарів фіксованого матеріалу, перш ніж прижиттєвий стан структур буде порушений унаслідок аутолітичних процесів, що проходять усередині загиблій клітини. Для цього об'єм фіксуючого розчину має перевищувати об'єм фіксованого матеріалу у 20–100 разів. Сам матеріал необхідно зафіксувати якомога швидше після взяття (біопсії чи забиття піддослідної тварини). З останньою вимогою пов'язані й обмеження щодо розміру фіксованого об'єкта: його діаметр має бути 1–3 мм, але не більше. Адже зі збільшенням розміру зростає час проникнення фіксатора в глибинні його шари, а це може погіршити якість матеріалу внаслідок аутолітичних процесів.

Якщо необхідно уявити цілісну картину в органі чи на великій ділянці тканини, то в цьому разі орган розділяють на зрізи товщиною в декілька міліметрів, що полегшує проникнення фіксатора всередину об'єкта, або ж застосовують метод *перфузії* (уведення фіксуючого розчину через кровоносну систему органа чи цілісного організму). В останньому випадку спочатку кровоносні судини промивають фізіологічним розчином, а потім заповнюють фіксуючою рідиною. Швидкість і якість фіксації під час перфузії робить цей метод досить популярним.

Приготування зрізів клітин

Для якісного мікроскопування необхідно приготувати тонкі зрізи досліджуваної тканини, оскільки товстий її шар є непроникним для світла, а тим більше для електронів. Однак біологічний матеріал досить м'який, і це ускладнює (інколи унеможливує) приготування надто тонких зрізів. Розв'язання цієї проблеми стало можливим із упровадженням у практику цитологів та гістологів спеціальних пристроїв – *мікротомів* – декількох видів.

Вібротом – прилад, за допомогою якого можна отримувати зрізи з матеріалу, який не зазнав додаткової (попередньої) обробки, тобто нефіксованого. Він дозволяє робити зрізи навіть із живого матеріалу, проте лише товщиною близько 20–50 мкм. Заморожувальні мікротомі (*кріотомі*) здатні зменшити товщину зрізу до 10–15 мкм. У цих мікротомах температура об'єкта знижується майже до -20°C . Відомо, що заморожені об'єкти можна розрізати на тонші шари (для прикладу: м'ясо в такому стані можна розрізати на дуже тонкі шматки). Для отримання найтонших зрізів (1–7 мкм і менше) застосовують заливку в пластичні середовища, а саме: целоїдин, парафін, парапласт і епоксидні смоли (епон, аралдит тощо). Целоїдинову, парафінову та парапластну заливку використовують, як правило, для світлової, а епоксидну – для електронної трансмісійної мікроскопії.

Найпоширенішою є заливка в парафін. Однак при його застосуванні певною проблемою є те, що він є гідрофобною речовиною, а більшість фіксаторів – водними розчинами. Ця перепона долається шляхом проводки матеріалу через ряд взаєморозчинних середовищ і в такий спосіб доведення його до парафіну. Наприклад, фіксований матеріал проводять через спирти, концентрація яких зростає, потім уміщують в органічний розчинник (ксилол, бензол, хлороформ тощо). Після того матеріал занурюють у суміш органічного розчинника з парафіном (парапластом) (так звана "гістологічна каша") і, нарешті, у чистий парафін (або парапласт).

Залитий після цього в парафіновий або парапластний блок матеріал ріжуть на *санному* або *роторному* мікротомі. Ці два

типи приладів відрізняються розташуванням та рухливістю мікротомного ножа і препарату. У роторному мікротомі ніж закріплений нерухомо, а рухається об'єкт. У санному об'єкт подається на 3–7 мкм за один прохід угору, а рухається й робить зріз ніж.

Мікротомний ніж заточують так, щоб уникнути будь-яких нерівностей ріжучої кромки. Тільки її ідеально рівна поверхня забезпечує рівномірну товщину зрізу. Закріплюється ніж під кутом 10–15° до поверхні об'єкта.

Зрізи для електронної мікроскопії заливають в епоксидні смоли й ріжуть на *ультрамікротомі*, що дає можливість отримати їх товщиною в частки мікрметра. Якість зрізів у цьому разі контролюється під мікроскопом, а ніж для ультрамікротома роблять зі скла або алмазу.

Забарвлення зрізів клітин

Для виявлення певних *структур* (клітин, тканин та їхніх складових) отримані на мікротомі зрізи забарвлюють. Розрізняють *оглядові*, що дають можливість роздивитись загальну будову об'єкта, і *спеціальні* методи забарвлення, за допомогою яких можна побачити окремі елементи й деталі будови клітини. Для прижиттєвих досліджень клітин використовують вітальні барвники. Зрізи для електронної мікроскопії забарвлюються зразу під час фіксації. Матеріал у цьому випадку фіксують глутаровим альдегідом і осмієвою кислотою. Остання саме й зв'язується зі структурами в клітині, роблячи їх непрозорими для потоку електронів. Для світлової ж мікроскопії сучасний цитолог має практично невичерпний перелік барвників та їхніх модифікацій, який дозволяє вирішити найрізноманітніші експериментальні задачі.

За фізико-хімічними властивостями барвники поділяють на *гідрофобні* (неполярні) і *гідрофільні* (полярні). Гідрофобні розчиняються в ліпідах і надають їм певного кольору. До цієї групи входять судан чорний, судан III тощо. Гідрофільні барвники поділяють на *кислотні*, *основні*, *нейтральні* та *нейтральні забарвлювальні суміші*. Кислотні забарвлюють основні (еозинофільні або оксифільні) структури в клітині, а основні з'єд-

нуються з базофільними (кислими) структурами. Так, основний барвник гематоксилін забарвлює нуклеїнові кислоти у ядрі, а кислотний барвник еозин – основні білки цитоплазми. Нейтральні ж здатні забарвлювати як кислі, так і основні структури (наприклад, барвник Май-Грюнвальда). Нейтральні забарвлювальні суміші, на відміну від нейтральних барвників, не містять у межах однієї молекули (однієї комплексної сполуки) основні та кислотні реакційні групи, натомість суміш складається із різних молекул, що мають відповідні кислотні чи основні властивості. Прикладом такого барвника є триацидна суміш Біонді – Ерліха – Гейденгайна (суміш оранжу G, кислого фуксину та метилового зеленого).

Розрізняють також забарвлення *прогресивне* й *регресивне*. При першому препарат поступово зв'язує барвник, доки колір не досягає оптимуму. У разі другого препарат спочатку перефарбовують, після чого надлишок барвника відмивають, доки не буде досягнуто оптимуму.

Після забарвлення постійні препарати замикають у спеціальне середовище. Для цього використовують канадський або ялицевий бальзам (витяжки з кедрового або ялицевого дерева), синтетичне середовище DPX тощо. При цьому, якщо середовище не водорозчинне, то після забарвлення (наприклад, гематоксиліном та еозином) препарат необхідно зневоднити. Для цього його проводять через спирти зростаючої концентрації, органічний розчинник і замикають у вибране середовище (скажімо, канадський бальзам).

ЦИТОХІМІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для вивчення хімічного складу клітин і розташування певних *класів* хімічних речовин у клітині застосовують цитохімічні методи. В основі їх лежать методи аналітичної хімії, якими послуговуються для аналізу складу розчинів, але адаптовані під конкретні умови приготування цитологічного пре-

парату. Тобто на препараті ставлять певну хімічну реакцію, за результатами якої роблять висновок про наявність або відсутність певного класу речовин у складі клітини. При цьому цитохімічні реакції є чутливішими, ніж відповідні реакції аналітичної хімії, оскільки результат реакції оцінюється не на око, а під мікроскопом, а отже, можна побачити найдрібніші часточки продукту реакції. Так, для реакції берлінської блакиті, завдяки якій можна виявити іони заліза, відповідна цитохімічна реакція є в 10000 разів чутливішою, ніж при проведенні цієї реакції в пробірці.

Нині відомо багато цитохімічних реакцій, які набули широкого поширення: нінгідринова (для виявлення білків), ШКК-реакція на вуглеводи, реакція Фельгена на виявлення ДНК тощо. Важливим класом гістохімічних реакцій є реакції на виявлення ферментів. У цьому випадку на препарат наносять розчин субстрату реакції, яку каталізує фермент, а потім цитохімічно виявляють продукт цієї реакції. За розташуванням нерозчинного продукту визначають локалізацію досліджуваного ферменту. У такий спосіб виявляють кислу й лужну фосфатазу, пероксидазу та інші ферменти.

ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для виявлення *певного типу* молекул існують методи імуногістохімії. Вони дозволяють вибірково визначати локалізацію певних молекул, навіть за умови їхньої високої подібності до інших (наприклад, пролактину людини та пролактину птаха). Однак визначенню піддаються лише достатньо складні органічні речовини, які при введенні в організм тварини здатні викликати специфічну імунну відповідь – утворення антитіл. Імуногістохімічні методи засновані на використанні саме *антитіл* – складних білкових молекул, які виробляються спеціалізованими клітинами й здатні зв'язувати молекули, котрі індукували їхнє утворення – *антигени*. Специфічність

зв'язування антитіл з антигенами є надзвичайно високою, що й використовується в імуногістохімії.

Саме утворення комплексу антиген – антитіло є ключовим у будь-якому імуногістохімічному методі. Зв'язані ж антитіла виявляють по-різному. Можна помітити їх флуорохромом і побачити його в люмінесцентному мікроскопі, можна – радіоактивною міткою, яку виявлятимуть так само, як і в разі авторадіографії, а можна й ферментом, який буде встановлено гістохімічно. Для підвищення чутливості методу застосовують метод подвійних антитіл, коли до антитіл I порядку, що безпосередньо зв'язують досліджуваний білок, приєднуються так звані вторинні антитіла ("антитіла, що виявляють антитіла"), які вже й мають бути знайдені одним із описаних вище методів.

МЕТОДИ КІЛЬКІСНОЇ ОЦІНКИ

Для встановлення функціонального стану клітини іноді недостатньо лише визначити якісний склад цитоплазми, білків ядра тощо. Надзвичайно велике значення має з'ясування кількості досліджуваної речовини, що міститься в клітині. Суху масу речовини дозволяє визначити метод *інтерференційної мікроскопії*. Існує можливість кількісно оцінити результати авторадіографії.

Що ж стосується кількісної оцінки результатів цитохімічних та імуногістохімічних реакцій, то найважливішим методом у цьому разі вважають *цитофотометрію*. Метод заснований на здатності забарвлених продуктів реакції поглинати світло заданої довжини хвилі. Зрозуміло, що для адекватної оцінки результатів усі препарати повинні мати однакову товщину, крім того, має бути стандартизована сама процедура забарвлення. Цитофотометрично можна визначати й кількість незабарвлених продуктів, наприклад нуклеїнових кислот, спроможних поглинати ультрафіолетове світло, а також здатних до флюоресценції речовин.

МЕТОД ДИФЕРЕНЦІЙНОГО ЦЕНТРИФУГУВАННЯ

Різниця в щільності та питомій вазі частин клітини використовується для відокремлення однакових органел із певної суміші клітин. Для цього клітини спочатку гомогенізують, а потім отриманий гомогенат центрифугують при різних швидкостях обертання центрифуги. Першими (при найменших швидкостях) осідають агрегати з кількох клітин, потім – цілі клітини. Далі – ядра й мітохондрії, після них – гранулярна ЕПС, потім – гладенька ЕПС, апарат Гольджі, лізосоми (так звана мікросомальна фракція). Останніми (при найбільших обертах) осідають великі макромолекулярні комплекси (рибосоми тощо). Після кожного циклу обертання осад відбирають і далі центрифугують лише надосадову рідину.

Модифікацією описаного методу є центрифугування у градієнті щільності. У цьому випадку в центрифужну пробірку шарами наносять сахарозу або інший гелеутворювальний агент із різною щільністю (від найбільш до найменш щільного). Після однократного центрифугування описані фракції опускаються у пробірці на різну глибину, що дає змогу одразу їх розділити.

ВИКОРИСТАННЯ ФОТО-, КІНО- І ВІДЕОТЕХНІКИ ТА КОМП'ЮТЕРНИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Фото-, кіно- та відеотехніку застосовують у цитології в першу чергу для фіксації отриманого зображення. Інколи, скажімо, при ультрафіолетовій та електронній мікроскопії, це є чи не єдиний метод узагалі отримати зображення досліджуваного об'єкта. При вивченні живих об'єктів підвищується роль кіно- та відеотехніки, за допомогою якої фіксують рух живих клітин, процеси поділу тощо. Особливо важливою в цьому разі є *сповільнена (цейтраферна) кінозйомка*, яка дає можливість потім побачити рух клітин у прискореному темпі.

Комп'ютерна цифрова обробка зображення підвищує його якість і навіть дозволяє виявити структури, котрі на оригінальних фотографіях виглядають малоконтрастними, розмитими. Оцифровані зображення використовуються також для морфометричних вимірювань (площі, периметра, діаметра досліджуванних структур).

Запитання для самоперевірки

1. Особливості розвитку цитології в кінці XIX ст.
2. З якими методами досліджень пов'язаний бурхливий розвиток цитології та гістології у XX ст.?
3. Які етапи можна виділити в історії вивчення клітин?
4. Ким були створені перші мікроскопи?
5. Які новації в мікроскопічній техніці з'явилися наприкінці XVII – на початку XVIII ст.?
6. Роль Я. Е. Пуркіньє в розвитку цитології.
7. Роль Т. Шванна в розвитку цитології.
8. Який внесок зробив М. Шлейден у розвиток цитології?
9. Значення досліджень Р. Вірхова для розвитку цитології.
10. Ким був описаний поділ клітини та його стадії?
11. Яку роль відіграли роботи Р. Броуна в розвитку цитології?
12. Внесок Р. Гука в розвиток цитології.
13. Значення діяльності А. Левенгука для розвитку цитології.
14. Походження поняття "клітина".
15. Ким і коли були описані основні органели клітини?
16. Назвіть елементи оптичної частини мікроскопа. Яке їхнє призначення?
17. опишіть хід променів у світловому мікроскопі.
18. Яка різниця між роздільною здатністю та кратністю збільшення мікроскопа?
19. Як розрахувати роздільну здатність мікроскопа?
20. Що таке числова апертура мікроскопа?
21. Які імерсійні рідини ви знаєте? З якою метою їх використовують?
22. Чому не є доцільним створення світлового мікроскопа з дуже великою кратністю збільшення (наприклад, близько $\times 10000$)?
23. У чому полягають відмінності між мікроскопом порівняння та стереомікроскопом?

24. Необхідно дослідити структури, розміри яких менше ніж 0,2 мкм, але більше ніж 0,1 мкм. Який метод світлової мікроскопії можна використати для дослідження?
25. Які методи світлової мікроскопії дозволяють побачити структури, дещо менші за роздільну здатність звичайного світлового мікроскопа? Для чого використовують мікроскоп порівняння?
26. Яким мікроскопом слід користуватися, щоб вивчити структуру клітинної мембрани товщиною 7–10 нм? Чому?
27. Опишіть принцип дії поляризаційного мікроскопа.
28. Охарактеризуйте метод фазово-контрастної мікроскопії.
29. Порівняйте можливості фазово-контрастного та диференційно-інтерференційного контрастного мікроскопів.
30. Охарактеризуйте метод варел-контрасту.
31. Які переваги інтерференційної мікроскопії?
32. Чи впливає на роздільну здатність мікроскопа використання для освітлення ультрафіолету? Відповідь обґрунтуйте.
33. Деякі речовини в клітині мають здатність флуоресцювати за дії ультрафіолетових променів. Який мікроскоп можна використати для їхніх досліджень? Чи можливе кількісне дослідження? Що можна зробити, якщо в самої речовини відсутня первинна люмінесценція?
34. Дайте визначення конфокальної мікроскопії.
35. Що таке двофотонний ефект? Яке значення він має для конфокальної мікроскопії?
36. Електронна мікроскопія та її різновиди.
37. Охарактеризуйте особливості рентгенівської мікроскопії. Які типи рентгенівських мікроскопів ви знаєте?
38. Що таке сканувальна зондова мікроскопія?
39. Дайте характеристику тунельній мікроскопії. Що таке тунельний ефект?
40. Порівняйте растрову електронну та атомно-силову мікроскопію.
41. Які існують режими атомно-силової мікроскопії?
42. Охарактеризуйте близькопольну оптичну мікроскопію.
43. Які методи прижиттєвого дослідження клітин ви знаєте?
44. Що таке вітальні барвники? Які з них ви знаєте?
45. За допомогою якого методу можна визначити шляхи транспорту речовин у клітині? Відповідь обґрунтуйте.
46. Відомо, що до складу нуклеїнових кислот входять азотисті основи. Які з них слід помітити для вибіркового виявлення у клітині ДНК і РНК за методом авторадіографії.
47. Перерахуйте основні етапи приготування постійного препарату?

48. Як зафіксувати матеріал для цитологічних досліджень?
49. Що таке фіксація? Які речовини можуть застосовуватися як фіксатори?
50. Які типи мікротомів вам відомі? З якою метою їх використовують?
51. Як отримати зрізи тканин для світлової мікроскопії, не заливаючи їх у парафін або інші пластичні речовини?
52. Чим відрізняється процес виготовлення препаратів для світлової та електронної трансмісійної мікроскопії?
53. Які структури в клітині називаються базофільними й оксифільними?
54. До якої групи барвників відносять гематоксилін і еозин? Які структури в клітині вони забарвлюють?
55. Які існують методи забарвлення клітин?
56. Порівняйте методи цитохімії та імуноцитохімії.
57. До складу клітин входять різні органічні речовини. Якими відомими вам методами можна виявити їхній якісний склад?
58. Клітини відрізняються одна від одної різним складом білків (антигенів). Якими методами можна визначити ці відмінності?
59. Що дозволяє визначити цитофотометрія? У чому полягає принцип методу?
60. Перед дослідником поставлено завдання – виявити структури, що містять ДНК і РНК. Які методи він повинен використати? Якими методами можна визначити кількість цих речовин?
61. Які кількісні методи визначення речовин у клітині вам відомі?
62. Назвіть методи одержання ізольованих органел.
63. Для чого застосовують мікрохірургію?
64. З якою метою послуговуються кіно-, фото- та відеотехнікою в цитологічних дослідженнях.

Рекомендована література

Аристов В. В. Современные достижения рентгеновской оптики преломления / В. В. Аристов, Л. Г. Шабельников // *Успехи физических наук.* – 2008. – Т. 178, № 1. – С. 61–83.

Бляхер Л. Я. История биологии с древнейших времён до начала XX века / Л. Я. Бляхер, Б. Е. Быховский, С. Р. Микулинский. – М. : Наука, 1972. – 564 с.

Егорова О. В. С микроскопом на "ты". Шаг в XXI век. Световые микроскопы для биологии и медицины / О. В. Егорова. – М., 2006. – 406 с.

Загальна цитологія і гістологія : підручник / М. Е. Держинський, Н. В. Скрипник, Г. В. Островська та ін. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2010.

История биологии (с начала XX века и до наших дней) / под ред. Л. Я. Бляхера. – М. : "Наука", 1975. – 660 с.

Клетки / под ред. Б. Льюина и др. : пер. с англ. – М. : БИНОМ, Лаборатория знаний, 2011.

Миронов В. Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии / В. Л. Миронов. – Нижний Новгород, 2004. – 110 с.

Световая микроскопия в биологии. Методы / под ред. А. Лейси: пер. с англ. – М. : Мир, 1992. – 464 с.

Штейн Г. И. Руководство по конфокальной микроскопии / Г. И. Штейн. – СПб. : ИНЦ РАН, 2007. – 77 с.

Molecular Biology of the Cell / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis et al. – N. Y., 2013.

Molecular cell biology / H. Lodish, A. Berk, A. Kaiser et al. – N. Y., 2013.

Розділ 3

СТРУКТУРА Й ФУНКЦІЇ БІОЛОГІЧНИХ МЕМБРАН

Уявити "клітинний світ" без мембран неможливо. Плазматична мембрана оточує клітину, визначає її межі й підтримує необхідні відмінності між цитозолем і позаклітинним середовищем. Усередині еукаріотичних клітин мембрани ендоплазматичної сітки, апарату Гольджі, мітохондрій та інших мембранних органел зберігають характерні відмінності між вмістом кожної органели й цитозолем. Трансмембранні градієнти іонів, утворені за рахунок роботи спеціалізованих мембранних білків, можуть використовуватися для синтезу АТФ, бути рушійною силою трансмембранного перенесення певних розчинених речовин або, у випадку нервових і м'язових клітин, створювати й передавати електричні сигнали. У всіх клітинах плазматична мембрана містить білки, які працюють як "сенсори" зовнішніх сигналів, дозволяючи клітині змінювати свою поведінку у відповідь на стимули зовнішнього середовища, включаючи сигнали від інших клітин (такі білкові сенсори, або *рецептори*, передають через мембрану не молекули, а "інформацію").

Незважаючи на різницю у функції, всі біологічні мембрани мають загальну структуру: вони є дуже тонкою плівкою ліпідів і білків, які утримуються разом в основному завдяки нековалентним взаємодіям. Клітинні мембрани – це динамічні, рідкі структури; більшість молекул, що входить до їхнього складу, безперервно рухається у площині мембрани (*латерально*). *Ліпідний бішар* (молекули ліпідів організовані у безперервний подвійний шар) є базовою рідинною структурою мембрани, слугуючи від-

носно непроникним бар'єром для більшості розчинених у воді молекул. Білкові молекули, котрі пронизують ліпідний бішар (*трансмембранні білки*), опосередковують практично всі інші функції мембрани, скажімо, транспорт через неї певних молекул або каталіз зв'язаних із мембраною реакцій типу синтезу АТФ. У плазматичній мембрані деякі трансмембранні білки функціонують як "зв'язувальні" структури, які з'єднують цитоскелет через ліпідний бішар або з позаклітинним матриксом, або із сусідньою клітиною, тоді як інші слугують рецепторами для сприйняття і перетворення хімічних сигналів оточуючого їх середовища.

ХІМІЧНИЙ СКЛАД І ЗАГАЛЬНІ ПРИНЦИПИ ОРГАНІЗАЦІЇ БІОЛОГІЧНИХ МЕМБРАН

Хоча мембранні системи клітини є місцем зосередження великої кількості найважливіших клітинних процесів, вони, однак, тривалий час залишалися невідомими. Більш того, навіть після їхнього відкриття принципи структурно-функціональної організації цих систем викликали дискусії в багатьох дослідників.

Уперше ідею про існування специфічного утворення, яке оточує кожну клітину, висунув у середині ХІХ ст. К. Бернар. Вивчаючи проникнення барвників у клітини, у 1855 р. К. Негеллі також дійшов висновку, що зовнішня частина протоплазми має бути вкрита особливою оболонкою, яка відіграє роль бар'єра проникності. Три десятиліття потому, повторюючи досліди К. Негеллі, В. Пфєффер показав, що ступінь набухання клітини залежить від концентрації оточуючого її розчину. У 1890 р. В. Пфєффер на основі досліджень К. Бернара й К. Негеллі сформулював поняття клітинної, або плазматичної, мембрани як утворення, що регулює надходження у клітину та вихід із неї різних речовин.

Перші дослідження хімічного складу й молекулярної організації мембрани пов'язані з іменем Е. Овертона, який у 1902 р.,

вивчаючи закономірності проникнення у клітину різних за природою речовин і виявивши, що найшвидше надходять жиророзчинні речовини, припустив, що мембрана повністю або частково утворена ліпідами. У 30-ті рр. ХХ ст. Е. Гортер і Ф. Грендел висунули припущення, що плазматична мембрана складається з подвійного шару ліпідів, який має бути пов'язаний з білками. У 1935 р. Л. Даніеллі й Г. Даусон на основі проведеного аналізу поверхневого натягнення на межі поділу ліпідів з іншими речовинами висунули гіпотезу стосовно будови біологічних мембран, за якою останні складаються з подвійного ліпідного бішару, укритего із зовнішнього та внутрішнього боків моношарами білків. Грунтуючись на ній, у 60-ті роки Дж. Робертсон стверджував, що всі мембрани однакові й побудовані саме за таким принципом.

Протягом досить тривалого часу ця думка лишалась непохитною, але й вона не встояла під тиском нових наукових доказів. Пошук спільних закономірностей і відмінностей в організації "родинних" мембран привів до розуміння того, що мембрани різних клітин і органел різняться за хімічним складом і за функціями, чому відповідає і певна структура мембрани. Крім того, було доведено, що висунуте свого часу В. Освальдом припущення про те, що плазматична мембрана клітин завдяки своїм властивостям напівпроникності є тією структурою, яка "генерує" різницю потенціалів – вірне.

Нині найприйнятнішою є *рідинно-мозаїчна модель* структури мембрани, висунута С. Сенгером і Дж. Нікольсоном у 1972 р. та вдосконалена С. Сенгером у 1981 р. За цією моделлю певна частина ліпідів, що входить до складу плазматичної мембрани (близько 30 %), пов'язана із внутрішніми білками, а інші перебувають у рідкому стані, формуючи "ліпідне озеро", у якому "вільно плавають" внутрішні білки (рис. 3.1). На поверхні ліпідного шару розташовуються водорозчинні (поверхневі) білки.

Ця модель передбачає можливість взаємодії поверхневих і внутрішніх або *інтегральних* мембранних білків з утворенням специфічних агрегатів (усередині або на поверхні мембрани) з гідрофільними порами чи каналами. Дана модель не супере-

чить і набути численним доказам як хімічної, так і структурної гетерогенності клітинних мембран. І хоча всі вони мають бути певним чином хімічно та структурно подібними (організація ліпідів у вигляді бішару, наявність поверхневих і внутрішніх, у тому числі інтегральних, білків, а також вуглеводів на зовнішніх боках плазматичних мембран), різні їхні види мають різний якісний і кількісний склад ліпідних, білкових і вуглеводних компонентів. Так, у мембран із домінуючою бар'єрною та ізоляційною функцією (скажімо, у плазмолемі шваннівських клітин, що формують мієлінову оболонку нервових волокон) вміст ліпідів становить до 80 % від їхнього складу, а функціонально активні (ЕПС, мітохондрій) містять більше білків (до 70 %). Крім того, мембрани виявляють себе як достатньо лабільні системи, здатні в нормі адекватно "реагувати" на зміни різних функціональних станів організму.

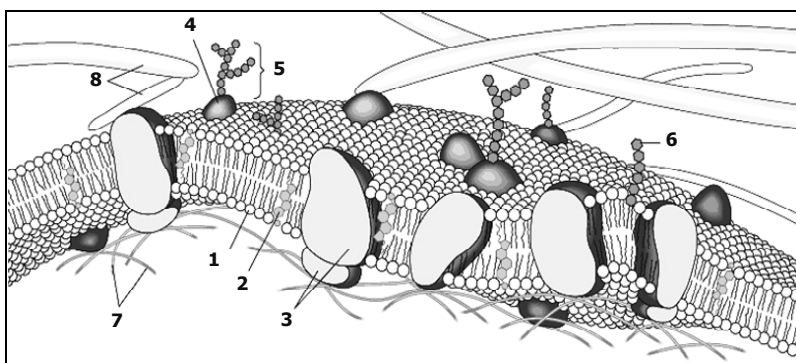


Рис. 3.1. Схематичне тривимірне зображення ділянки клітинної мембрани.

- 1 – фосфоліпід; 2 – холестерол; 3 – білки; 4 – глікопротеїн;
 - 5 – вуглеводні залишки глікопротеїну; 6 – гліколіпід;
 - 7 – мікрофіламенти; 8 – волокна позаклітинного матриксу
- (за Равеном П., Джонсоном Г., Сінгером С. та ін., 2005, зі змінами)

У попередніх розділах уже йшлося про те, що еукаріотична клітина сьогодні постає як складна, скоординована система мембран і їхніх утворень. Крім плазматичної мембрани, яка, власне, формує клітину, відокремлюючи її від зовнішнього

середовища, і забезпечує підтримання внутрішньоклітинного гомеостазу, клітини містять гетерогенну за хімічним складом і специфікою організації систему внутрішньоклітинних мембран. Це мембрани ЕПС, апарату Гольджі, лізосом, мітохондрій, пластид, численних внутрішньоклітинних вакуоль (піноцитозних, фагоцитозних, секреторних тощо) а також ядерні мембрани, кожна із яких має свою особливість структурно-функціональної організації. Уже зазначалося, що мембрана містить велику кількість білків, частина із яких має ферментативну активність. Деякі з цих ферментів локалізовані лише в певних мембранах, визначаючи їхню хімічну і функціональну "індивідуальність" (виступаючи при цьому їхніми хімічними маркерами) (табл. 3.1).

Мембрана є місцем активної синтетичної "діяльності". На мембранах грЕПС здійснюється синтез білків мембран ЕПС, апарату Гольджі, плазматичної мембрани, а також секреторних білків і лізосомних ферментів (цитозольний синтез забезпечує білкові потреби мітохондрій, ядра, пероксисом і власне цитозолю; синтез клітинних білків детально буде проаналізовано в розд. 9). Ліпіди мембран також синтезуються на ЕПС (глЕПС) і переносяться до плазматичної мембрани. Перенесення як білків, так і ліпідів здійснюється *транспортними пухирцями*, а отже, компоненти транспортуються у вигляді "готових" мембран, а це означає, що "наступна" мембрана походить лише з "попередньої".

Таблиця 3.1

Приклади ферментних маркерів деяких мембран

Мембрана	Маркерний фермент
Плазматична (базолатеральна)	аденілатциклаза
Плазматична (апикальна)	Na ⁺ -K ⁺ -АТФаза, 5'-нуклеотидаза
Внутрішня мітохондріальна	Сукцинатдегідрогеназа, цитохромоксидаза
Зовнішня мітохондріальна	Моноамінооксидаза
Апарат Гольджі	Галактозилтрансфераза

Біологічні мембрани є складними надмолекулярними комплексами, до складу яких входять ліпіди, білки, вуглеводи й неорганічні речовини (вода, іони Ca^{2+} , Mg^{2+}). Слід підкреслити, що всі біологічні мембрани мають принципово однаковий хімічний склад, подібні закономірності організації хімічних компонентів, однак при цьому в них є істотні відмінності у структурі, які залежать від типу мембран і особливостей їхніх функцій.

До загальних принципів організації мембрани можна віднести:

– *неоднорідність* (білки, вуглеводи й навіть різні за хімічною будовою ліпіди, із яких побудована мембрана, розташовуються в ній "мозаїчно", що надає різним ділянкам мембрани певних хімічних, фізичних та функціональних відмінностей);

– *лабільність* (частина мембранних складових перебуває у стані безперервного руху);

– *високий рівень асиметричності* (зовнішній і внутрішній шари мембрани різняться якісним і кількісним складом ліпідів; білки, мозаїчно розташовані серед ліпідів, мають чітке розмежування поза- та внутрішньоклітинних доменів).

У цьому розділі увагу зосереджено переважно на особливостях структурно-функціональної організації плазматичної мембрани еукаріотичних клітин.

МЕМБРАННІ ЛІПІДИ

Ліпідний бішар – базова структура всіх клітинних мембран. Усі мембранні ліпіди *амфіфільні* (*амфипатичні*), тобто складаються з *гідрофільної* ("любить воду"), або *полярної*, частини й *гідрофобної* ("боїться води"), або *неполярної*, частини. Молекули ліпідів становлять близько 50 % маси більшості клітинних мембран тварин (майже вся інша маса – білки), і 80 % із них припадає на *фосфоліпіди* (табл. 3.2).

Як уже згадувалося вище, кількісний і якісний склад ліпідів (як і інших складових) у біологічних мембранах визначається характером їхньої функціональної "спрямованості". Од-

нак певні групи ліпідів є домінуючими, базовими у складі будь якої мембрани, створюючи "схоже" молекулярно-хімічне, а отже, певною мірою, і функціональне "середовище", що визначається їхніми фізико-хімічними властивостями. Такими найпоширенішими ліпідами в мембранах тварин є *фосфогліцериди*, *сфінгомієліни* і *холестерол*. Слід підкреслити, що частка цих ліпідів у мембранах еукаріотичних клітин різних типів суттєво варіює, що певним чином визначає біологічні функції цих клітин (або окремих клітинних органел).

Таблиця 3.2

Ліпідний склад різних клітинних мембран

Ліпід	Відсоток від усіх мембранних ліпідів за масою			
	Плазмолема гепатоцитів	Плазмолема еритроцитів	Мітохондріальні мембрани	ЕПС
Холестерол	17	23	3	6
Фосфатидилетаноламін	7	18	28	17
Фосфатидилсерин	4	7	2	5
Фосфатидилхолін	24	17	4	40
Сфінгомієлін	19	18	0	5

Фосфоліпіди (складні ліпіди) – основний клас ліпідів біологічних мембран – складні ефіри багатоатомних спиртів та вищих жирних кислот – складаються з полярної "голівки" і двох гідрофобних вуглеводневих "хвостів" (рис. 3.2).

Залежно від багатоатомного спирту, що входить до складу "голівки" ліпиду, фосфоліпіди прийнято поділяти на фосфогліцериди (містять залишок *гліцеролу*), фосфосфінголіпіди (містять залишок *сфінгозину*), фосфоінозитиди (містять залишок *інозитолу*). До складу гідрофільної "голівки" фосфоліпиду, крім залишку спирту, входить зв'язаний з ним негативно заряджений фосфат і додаткова група атомів, яка в багатьох випадках містить нітроген і несе позитивний заряд.

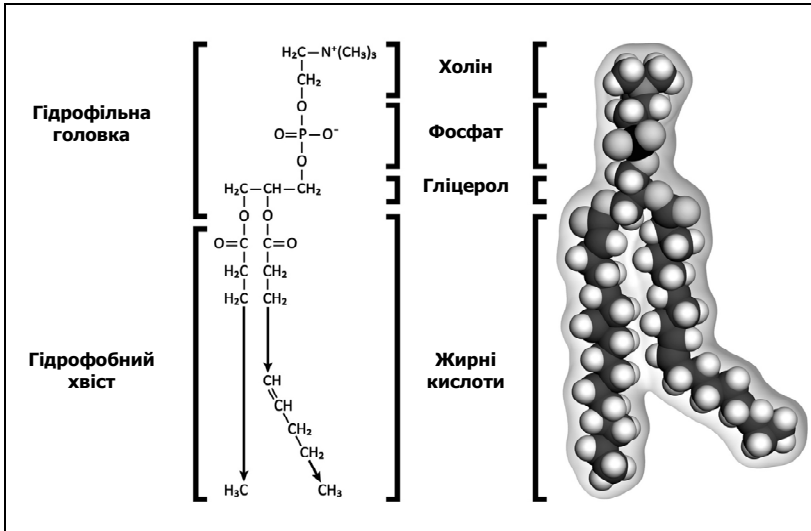


Рис. 3.2. Структура мембранного фосфоліпиду

"Хвости", утворені вищими жирними кислотами, відрізняються за довжиною (вони можуть містити від 14 до 24 атомів карбону). Один із "хвостів" зазвичай має один (або більше) подвійний *цис*-зв'язок, тобто він утворений *ненасиченою* жирною кислотою. У іншого "хвоста" подвійних зв'язків немає, це означає, що він утворений *насиченою* жирною кислотою). Як показано на рис. 3.2, кожний подвійний *цис*-зв'язок створює невеликий вигин (*кінк*) у "хвості". Різниця в довжині й насиченості жирнокислотних (ацильних) "хвостів" впливає на те, як фосфоліпідні молекули укладені в бішарі та, відповідно, на плинність мембрани. Це пояснюється тим, що атоми карбону, які утворюють подвійні зв'язки, не здатні вільно обертатися, займають фіксовану позицію і створюють вигини у вуглеводневому ланцюзі, що запобігає щільній упаковці ліпідних хвостів і збільшує плинність мембрани в цілому. Крім того, коротші "хвости" упаковані в менш щільні структури, що також сприяє зменшенню в'язкості мембрани. Загалом стабільність взаємодії залишків вуглеводневих ланцюгів

жирних кислот зумовлюється їхньою довжиною, насиченістю та розгалуженістю. Більшість мембранних фосфоліпідів містить у своїх ацильних ланцюгах один або більше *цис*-подвійних зв'язків (жирні кислоти при цьому називають відповідно *моно*- та *поліненасиченими*, що знижує щільність їхньої упаковки та збільшує рухливість. У результаті мембрана стає менш в'язкою за фізіологічної температури.

Основними фосфоліпідами у більшості клітинних мембран тварин, про що вже йшлося вище, є **фосфогліцериди**, які мають у своїй основі трикарбоний спирт **гліцерол**. Два довголанцюжкові жирнокислотні "хвости" через складноефірний зв'язок з'єднані з двома сусідніми карбонними атомами гліцеролу, третій атом карбону якого зв'язаний із залишком фосфорної кислоти та певною "голівковою" групою – вітаміном В4 (деякі вчені вважають його несправжнім вітаміном, а вітаміноподібною речовиною) – *холіном* (фосфатидилхолін, або лецитин) (рис. 3.2), аміноспиртом *етаноламіном* (фосфатидилетаноламін, або кефалін), гідроксіамінокислотою *серіном* (фосфатидилсерин) тощо. Варіюючи жирні кислоти і "голівкові" групи, клітини синтезують велику кількість різних типів фосфогліцеридів (серед яких найпоширенішими у клітинних мембранах ссавців є згадані вище *фосфатидилхолін*, *фосфатидилетаноламін* та *фосфатидилсерин*).

Другим за поширеністю типом мембранних ліпідів можна вважати **сфінгомієліни** (належать до групи *сфінголіпідів*), що синтезуються із аміноспирту сфінгозину (а не з гліцеролу). Сфінгозин є довгим ацильним ланцюгом з аміногрупою (NH₂) і двома гідроксильними групами (OH) на кінці молекули. У сфінгомієліні жирнокислотний "хвіст" зв'язаний з аміногрупою, а фосфохолінова група – із кінцевою гідроксильною групою. Друга гідроксильна група залишається вільною і робить свій внесок у полярні властивості сусідньої "голівкової" групи завдяки своїй здатності утворювати водневі зв'язки з "голівками" сусідніх ліпідів, молекулами води або мембранними білками.

Третьою за поширеністю ліпідною сполукою мембран є **холестерол** (еукаріотичні мембрани містять до одної молекули холестеролу на кожен молекулу фосфоліпиду). Становить від 40 до 60 % усіх ліпідів мембрани ссавців.

Холестерол належить до стероїдів. Він має жорстку циклічну структуру (структуру кілець), із якою пов'язана одна полярна гідроксильна група й короткий неполярний вуглеводневий ланцюг (рис. 3.3).

Полярна група (ОН) надає молекулі холестеролу слабких амфифільних властивостей. Замкнута структура кілець, будучи гідрофобною та розташовуючись між жирнокислотними (також гідрофобними) доменами інших ліпідів (рис. 3.4), спричинює менш щільну упаковку ненасичених жирнокислотних ланцюгів, що робить внутрішню частину бішару більш плинною.

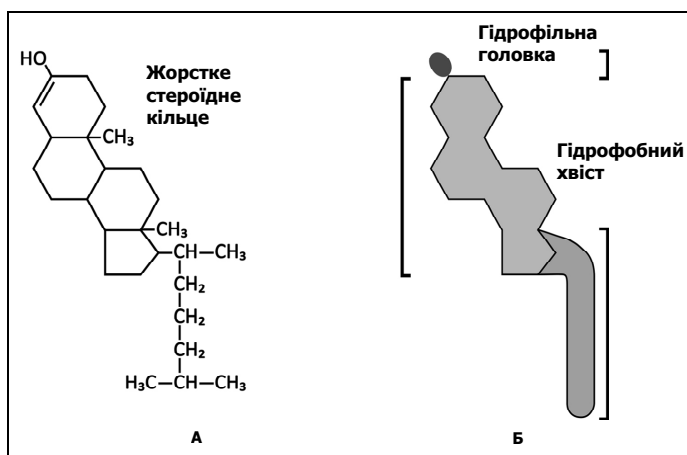


Рис. 3.3. Формула (А), схема (Б) холестеролу

Таке зниження в'язкості сприяє латеральному переміщенню ліпідів у площині ліпідного бішару. Разом із тим, ОН-група холестеролу, розташовуючись дуже близько до "голівок" інших ліпідів, "цементує" гідрофільні частини компонентів мембрани, зменшуючи тим самим її проникність для невеликих молекул.

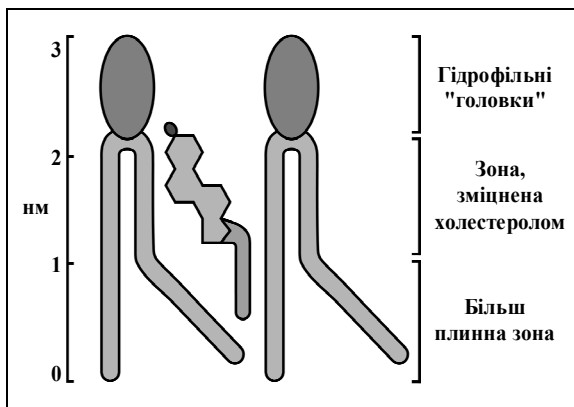


Рис. 3.4. Холестерол у ліпідному бішарі. Схема
(за Албертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Дж. та ін., 2013)

Слід зауважити, що в рухливій мембрані можуть виникати "порожнини", утворені вигином *цис*-подвійного зв'язку в ацильному ланцюгу ліпиду, які полегшують рух через неї дрібних водорозчинних молекул, скажімо, глюкози. Беручи до уваги фізико-хімічні властивості холестеролу, легко зрозуміти, що він не залишиться "байдужим" у таких ситуаціях: холестерол заповнює такі "порожнини", водночас сприяючи більш щільній упаковці мембрани в ділянці гідрофільних доменів. Зазначимо, що хоча молекули холестеролу здатні легко перескакувати між шарами (явище називається "фліп-флоп"), вони, як правило, локалізуються у зовнішньому шарі (потовщуючи його при цьому).

Великий дослідницький інтерес до фізико-хімічних властивостей мембран різного походження, локалізації й функціональної "спрямованості" (що не є дивним, беручи до уваги той факт, що еукаріотичний світ є світом мембранним) привів до з'ясування того, що ліпідний склад типової клітинної мембрани нараховує від 500 до 1000 різних видів ліпідів. Таке різноманіття відображає, у першу чергу, різноманітні комбінації "голівкових" груп, довжини й насиченості вуглеводневих "хвостів" основних класів ліпідів. Однак, крім цього, мембрани містять різноманітні структурно не схожі *мінорні* ліпіди, із яких принаймні деяка частина виконує

важливі функції. *Інозитольні фосфоліпіди* (фосфоінозитиди), скажімо, містяться у дуже незначних кількостях (тобто є мінорними), однак відіграють ключову роль у мембранному транспорті й сигналізації клітини (детальніше це питання розглядатиметься в розд. 5). Однак, незважаючи на "кількісне представництво" в мембрані, біологічна роль ліпідів кожної із згаданих груп визначається їхніми фізико-хімічними властивостями.

Здатність молекул ліпідів утворювати бішар

Сама амфіфільна природа і форма фосфоліпідних молекул змушує їх формувати бішари у водному середовищі. Нагадаємо, що гідрофільні молекули легко розчиняються у воді, бо містять заряджені або незаряджені, але полярні групи, здатні утворювати енергетично вигідні електростатичні й водневі зв'язки з молекулами води. Тоді як гідрофобні молекули не розчиняються у воді, оскільки майже всі їхні атоми незаряджені або неполярні, і, відповідно, не здатні утворювати енергетично вигідні взаємодії з водою. Розташовуючись у ній, такі гідрофобні молекули "змушують" прилегли до них молекули води формувати схожі на лід структури. Оскільки вода в такому стані більш упорядкована, ніж просто в розчині, то утворення цих структур збільшує вільну енергію. Однак невикладність цього процесу знижується, якщо гідрофобні молекули (або гідрофобні частини амфіфільних молекул) групуються таким чином, щоб взаємодіяти з найменшою кількістю молекул води.

Гідрофільні й гідрофобні ділянки ліпідних молекул поведуть себе аналогічним чином. А отже, ліпідні молекули спонтанно (самовільно) агрегують для того, щоб "сховати" свої гідрофобні вуглеводневі "хвости" всередину і "виставити" гідрофільні "голівки" назовні (де вони контактують з навколишнім, водним, середовищем) (рис. 3.5). Залежно від специфіки організації "хвостів" вони можуть робити це у два способи: або формуючи специфічні *міцели* (які можна вважати ліпідними біополімерами), у яких "хвости" розташовані всередину (характерно для *моногліцеридів*, які містять лише один залишок жирної кислоти у "хвості"), або утворюючи двошарові плівки, або *бішари*,

у яких гідрофобні "хвости" розташовані між гідрофільними "голівками" (характерно для *дигліцеридів*, що містять два ацильні залишки у "хвості") (рис. 3.5).

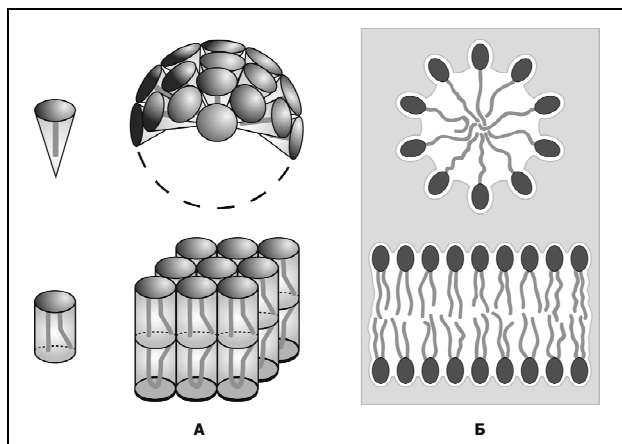


Рис. 3.5. Упаковка ліпідних молекул у водному оточенні:

А – моногліцериди утворюють міцели (зверху),
дигліцериди утворюють бішари (знизу);

Б – поперечний зріз ліпідної міцели (зверху) і ліпідного бішару (знизу)
(за Албертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Дж. та ін., 2013)

Такі самі сили, що змушують ліпіди утворювати бішари, є відповідальними за самовідновлення мембран. Розрив у бішарові створює вільну межу з водою, а оскільки це енергетично невигідно, то ліпіди намагаються реорганізуватися таким чином, щоб "усунути" таку межу. Існуюча "заборона" вільних границь має важливі наслідки: єдиним засобом її уникнути є замикання бішару самого на себе з формуванням закритого компартменту (що лягло в основу життя клітини і що є прямим наслідком амфіфільної природи молекул фосfolіпідів).

Отже, ліпідний бішар здатний формуватися і, у випадку невеликих розривів, відновлюватися спонтанно (при великих розривах еукаріотичних плазматичних мембран їхнє відновлення відбувається шляхом злиття з мембранами внутрішньоклітинних везикул). Ліпідний бішар є стійким завдяки своїм термодинамічним властивостям (а не за рахунок формування ковалентних зв'язків).

Плинність мембрани

Однією з найважливіших властивостей ліпідного бішару є його плинність. Ще у 80-х рр. ХХ ст. було з'ясовано, що окремі молекули ліпідів здатні вільно дифундувати у межах ліпідного бішару. У дослідах із штучними ліпідними бішарами у формі сферичних (везикули, які називають *ліпосомами* (рис. 3.6)) і пласких (так звані *чорні мембрани*) бішарів було показано, що молекули фосфоліпідів у них дуже рідко мігрують із моношару на одному боці до моношару на іншому (процес такого переміщення відомий як "*фліп-флоп*" *перехід*). Однак холестерол є винятком із цього правила, він переходить із одного моношару в інший дуже швидко. З іншого боку, молекули ліпідів легко міняються місцями зі своїми сусідами в межах моношару (відбувається швидка *латеральна дифузія*). Крім цього, з'ясувалося, що молекули ліпідів швидко обертаються вздовж своєї довгої осі (*обертальна дифузія*) і мають гнучкі вуглеводневі ланцюги.

Вивчення поведінки ліпідів у ізольованих біологічних мембранах і мембранах живих клітин показало такі самі результати: ліпідний компонент біологічної мембрани є двомірною рідиною, у якій молекули, що її складають, вільно рухаються у латеральному напрямку. Як і в штучних бішарах, молекули ліпідів залишаються зазвичай в одному моношарі, що створює проблеми для їхнього синтезу: фосфоліпідні молекули утворюються лише в одному моношарі мембрани, в основному, у цитоплазматичному моношарі мембрани ЕПС (про це детально йтиметься в розд. 10). Якщо б синтезовані молекули не могли достатньо швидко мігрувати в нецитоплазматичний моношар, то новий ліпідний бішар неможливо було б синтезувати. Ця проблема вирішується особливим класом трансмембранних ферментів – *транслокаторів фосфоліпідів*, які каталізують швидкий "фліп-флоп" перехід фосфоліпідів із одного моношару в інший.

Плинність клітинних мембран має чітко контролюватися, бо, скажімо, ефективність багатьох процесів мембранного транспорту, як і функціонування мембранних ферментів, знижується при збільшенні в'язкості бішару до значення, що перевищує порогову величину.

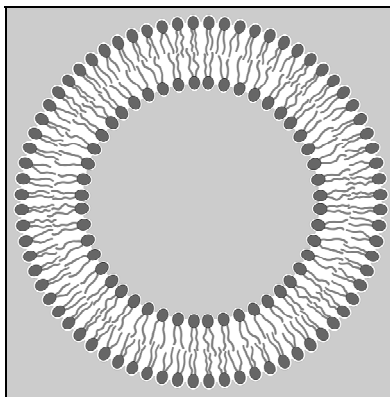


Рис. 3.6. Структура ліпосоми. Схема

Як було показано в експериментах на штучних бішарах, плинність ліпідного бішару залежить від його складу та температури. Чим довші й насиченіші ацильні ланцюги, тим щільніше вони можуть бути "упаковані". Менша ж довжина ланцюга заважає вуглеводневим "хвостам" взаємодіяти один з одним як у межах одного моношару, так і в межах різних. А подвійні *цис*-зв'язки приводять до утворення кінків у вуглеводневих ланцюгах, що протидіє щільній упаковці ліпідів. А отже, у цьому випадку мембрана буде більш плинною і буде зберігати такий свій стан за більш низьких температур, тоді як щільна упаковка знижує плинність бішару. При цьому плинність мембрани є вищою в гідрофобній зоні, а гідрофільні зони, які містять полярні "голівки" ліпідів, суттєво менш рухливі.

Проте не лише хімічні особливості жирнокислотних ланцюгів ліпідів визначають рівень плинності мембран. Не менш важливою в регуляції плинності ліпідних бішарів є й роль холестеролу. Він вбудовується в бішар таким чином, що його гідроксильна група опиняється поблизу полярних "головок" фосфоліпідів, а його жорсткі плоскі стероїдні кільця взаємодіють з ділянками їхніх вуглеводневих ланцюгів, розташованих ближче до "головок" (частково їх іммобілізуючи) (рис. 3.4). Знижуючи плинність перших декількох CH_2 -груп вуглеводневих ланцюгів молекул фосфоліпідів, холестерол робить ліпідний

бішар у цій ділянці менш "деформованим", і, як наслідок, зменшує проникність бішару для малих розчинених у воді молекул. При цьому ділянки жирнокислотних ланцюгів, до яких холестерол "не дотягується", формують більш плинну зону. А значить, холестерол, суттєво не впливаючи на рівень загальної латеральної плинності мембрани (навпаки, його високі концентрації, властиві еукаріотичним плазматичним мембранам, перешкоджають зближенню й кристалізації вуглеводневих ланцюгів), певним чином змінює плинність у її "трансмембранній площині".

Оскільки ліпідний шар є двовимірною рідиною, можна очікувати, що більшість типів молекул ліпідів розподілені в моношарі рівномірно (вандерваальсові сили тяжіння між сусідніми вуглеводневими "хвостами" є недостатньо селективними, щоб утримувати молекули фосfolіпідів разом). Однак у деяких випадках певні ліпіди можуть тимчасово зближуватися, утворюючи динамічну мозаїку спеціалізованих доменів – **ліпідні рафти** (англ. raft – пліт).

Деякі спеціалізовані ділянки плазматичної мембрани, наприклад залучені до ендоцитозу **кавеоли**, збагачені сфінголіпідами і холестеролом. Припускають, що спеціалізовані білки, які збираються в таких кавеолах, допомагають стабілізувати рафти. До того ж вуглеводневі ланцюги сфінголіпідів є довшими і прямішими за такі в інших мембранних ліпідів, значить, утворений рафт буде товстішим за інші ділянки бішару й буде краще утримувати мембранні білки. А отже, можна вважати, що формування мембранних рафтів є результатом "взаємостабілізації" певних ліпідів і білків. Утворені рафти у своїх межах стабілізують і концентрують білки, призначені, скажімо, для транспорту в мембранних везикулах або білки сигнальних каскадів плазмолемі, які переводять зовнішньоклітинний сигнал у внутрішньоклітинний.

Асиметрія ліпідного бішару

Практично в усіх мембранах моношари ліпідного бішару значно відрізняються за ліпідним складом. Так, у мембрані еритроцитів людини майже всі холінвісні фосfolіпіди (фосфатидилхолін, сфінгомієлін) розташовані в зовнішньому моношарі,

тоді як ліпіди, що містять у "голівці" термінальну аміногрупу (фосфатидилетаноламін, фосфатидилсерин), переважно сконцентровані у внутрішньому. Така ліпідна асиметрія є вкрай важливою для клітини. Так, фосфатидилсерин, розташований у внутрішньому моношарі, підтримує значну різницю в заряді між двома моношарами.

Ліпідна асиметрія є дуже важливою і для трансформації позаклітинного сигналу у внутрішньоклітинний: у відповідь на певні позаклітинні сигнали активуються специфічні цитозольні ферменти, суттєва частина яких для реалізації своєї участі у формуванні "клітинної реакції" на отриманий сигнал має зв'язатися з "голівками" певних ліпідів цитоплазматичного моношару. Наприклад, фермент *протеїнкіназа С*, активуючись у відповідь на певні позаклітинні сигнали, зв'язується із цитоплазматичним боком плазмолемі, де наявний фосфатидилсерин, необхідний для її "каталітичної діяльності".

Існує ще один важливий спосіб трансформації позаклітинного сигналу у внутрішньоклітинний за участю фосфоліпідів. Плазматична мембрана містить специфічні ферменти – *фосфоліпази*, які, активуючись позаклітинним сигналом, розщеплюють молекули певних фосфоліпідів на "фрагменти", що діють як короткоживучі внутрішньоклітинні медіатори. Наприклад, *фосфоліпаза С* розщеплює мінорні фосфоінозитольні фосфоліпіди в цитоплазматичному моношарі плазмолемі з утворенням двох "фрагментів". Один із яких (*діацилгліцерол*) залишається у мембрані і сприяє активації згаданої вище протеїнкінази С, а другий (*інозитол-3-фосфат*), виходячи в цитозоль, викликає вивільнення іонів Ca^{2+} із глЕПС клітин (про це детально йтиметься в розділі "Інформаційні міжклітинні взаємодії"). Крім того, *діацилгліцерол* здатний за певних обставин розпадатися далі з вивільненням найпоширенішої в мембранах ссавців C_{20} -поліненасиченої жирної кислоти – *арахідонової*. Остання ж, у свою чергу, є попередником для синтезу *ейкозаноїдів*. Окиснені ейкозаноїди (простагландини, тромбоксани (перша група), а також гідрокси-, гідроксипероксижирні кислоти й лейкотрієни (що становлять другу групу) є гормоно-

подібними речовинами (медіаторами) із сильним, але короткочасним ефектом. Так, простагландини утворюються через 10–20 с після стимуляції клітини, їхній синтез відбувається протягом 1–5 хв, після чого зупиняється. Вони (а також лейкотриєни) залучені до розвитку запальних, температурних і больових реакцій, індукції згортання крові, регуляції артеріального тиску тощо.

Ще одним важливим прикладом ролі ліпідної асиметрії мембран є її "використання" у тваринному організмі для "виявлення" мертвих клітин. При *апоптозі* (вид запрограмованої клітинної загибелі; детальніше розглядатиметься в розд. 13) тваринної клітини фосфатидилсерин, розташований зазвичай, про що вже згадувалося, у цитоплазматичному моношарі плазмолемі, швидко переходить у зовнішній, де його наявність є сигналом, скажімо, для макрофагів (запускається *фагоцитоз*).

Прикладом крайньої ліпідної асиметрії мембран є розташування в них *гліколіпідів*. Останні часто утворюють рафти, зв'язуючись між собою частково за рахунок водневих зв'язків між їхніми цукровими залишками, частково за участю вандерваальсових взаємодій між довгими і прямими вуглеводневими ланцюгами. Причиною асиметрії розташування гліколіпідів у бішарі є додавання (або модифікація доданих попередньо у грЕПС) вуглеводних груп до ліпідних молекул у *люмені* (внутрішньому просторі замкнутого мембранного компартменту) апарату Гольджі (детальніше див. розд. 10). А отже, компартмент, у якому вони синтезуються, топологічно еквівалентний позаклітинному середовищу. Після "доставки" шляхом *екзоцитозу* гліколіпідів у плазмолему їхні вуглеводні групи розташовуються на зовнішній поверхні клітин (рис. 3.7). У випадку, коли гліколіпіди потрапляють в органелу вакуолярної системи, наприклад лізосому, вуглеводні компоненти залишаються оберненими в її люмен (також топологічно еквівалентний позаклітинному середовищу).

Серед гліколіпідів плазмолемі тваринних клітин (вони становлять близько 5 % усіх ліпідних молекул зовнішнього моношару) найскладнішими є *гангліозиди*, які містять олігосахариди з одним або декількома залишками *сіалової кислоти*, за рахунок яких молекули набувають сумарного від'ємного заряду. Їхня присутність

змінює електричне поле мембрани і концентрації іонів, особливо іонів Ca^{2+} , поблизу її поверхні, значення чого недооцінити неможливо. Не менш важливою є й участь гліколіпідів у процесах клітинного розпізнання: прикріплені до мембрани вуглеводз'язувальні білки (*лектини*) взаємодіють з вуглеводними групами гліколіпідів і глікопротеїнів при адгезії клітин (це детально обговорено в розділі "Загальні принципи міжклітинних взаємодій").

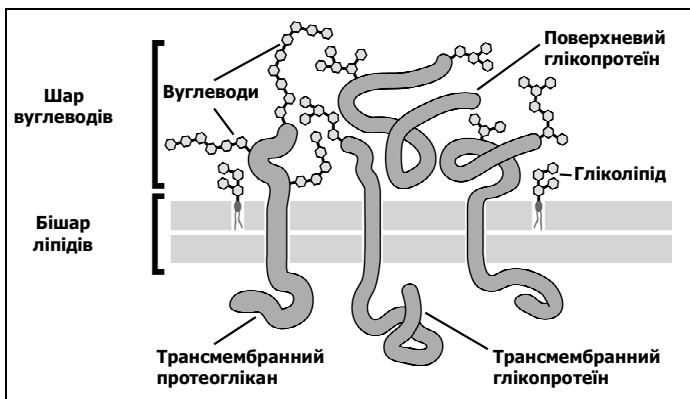


Рис. 3.7. Вуглеводний шар зовнішньої поверхні плазматичної мембрани еукаріотичної клітини. Схема

Існуюча ліпідна асиметрія зовнішнього та внутрішнього шарів мембрани підтримується за рахунок спеціальних механізмів. Цьому сприяє й надзвичайно низька швидкість дифузії ліпідів між шарами. Транслокація ж ліпідів шляхом перескакування з використанням спеціального механізму дозволяє клітинній мембрані адекватно реагувати на зміну фізіологічних умов (або фізіологічних вимог).

МЕМБРАННІ БІЛКИ

Незважаючи на те, що ліпідний бішар слугує структурною основою біологічних мембран, саме мембранні білки виконують більшість її специфічних функцій, а отже, надають кожному типу клітинних мембран специфічних функціональних власти-

востей. Тому кількісний і якісний склад білків у різних мембранах суттєво варіює. Так, у типовій плазмолемі білки становлять близько 50 % її маси, тоді як у внутрішній мітохондріальній мембрані (яка бере участь у синтезі АТФ) їхній відсоток сягає 75 %, а в мієліновій мембрані (служить для електричної ізоляції аксонів нервових клітин) – лише 25 %.

Мембранні білки суттєво відрізняються і за своєю структурою, і характером взаємодії з ліпідним бішаром. Частина білків повністю перетинає ліпідний бішар так, що частина їхніх ділянок розташовується по обидва боки мембрани (рис. 3.8, 1–3). Такі *трансмембранні* білки є амфіфільними: їхні гідрофобні ділянки знаходяться в мембрані та взаємодіють з гідрофобними "хвостами" ліпідних молекул усередині бішару, тоді як гідрофільні взаємодіють з водою по обидва боки мембрани. Інші білки розташовуються в цитозолі, зв'язуючись із цитоплазматичним моношаром ліпідного бішару або за участю амфіфільного "α-ланцюга" на поверхні білка (рис. 3.8, 4), або за допомогою одного чи декількох ковалентно зв'язаних з ними ліпідних ланцюгів (рис. 3.8, 5). Деякі білки повністю розташовуються на зовнішній поверхні клітини (стосується переважно плазматичної мембрани), з'єднуючись з ліпідним бішаром лише ковалентними зв'язками з фосфатидилінозитолом у зовнішньому ліпідному моношарі плазмолемі (рис. 3.8, 6). Деякі ж білки зовсім не проникають у гідрофобну частину ліпідного бішару, вони зв'язуються з поверхнею мембрани за участю нековалентних взаємодій з іншими білками (рис. 3.8, 7, 8). Білки останнього типу (їх називають *периферійними*) легко відділяються від мембрани відносно м'якими методами виділення (наприклад, розчинами з високим рН, які впливають на білок-білкові взаємодії, не порушуючи при цьому ліпідного бішару). Трансмембранні білки і білки, поєднані з мембраною ліпідними групами або гідрофобними поліпептидними ділянками, що проникають у гідрофобну серцевину ліпідного бішару, такими методами відділити не можна. Їх прийнято називати *інтегральними мембранними білками*.

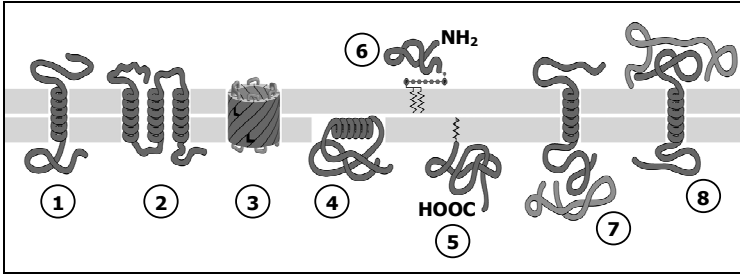


Рис. 3.8. Способи прикріплення білків до ліпідного бішару (пояснення в тексті)
(за Албертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Дж. та ін., 2013)

Спосіб прикріплення білка до ліпідного бішару певною мірою відображає його функцію. Так, трансмембранні білки, здатні функціонувати з обох боків мембрани, виконують функцію *рецепторів* і *транспортерів*. Перші, зв'язуючись із сигнальними молекулами на зовнішньому боці плазмолемі, генерують на її протилежному боці внутрішньоклітинні сигнали, які запускають реакції клітинної відповіді. Транспортний же білок для перенесення маленьких гідрофільних молекул через гідрофобний непроникний бар'єр ліпідного бішару, формує специфічний трансмембранний "шлях". Білки, які функціонують лише по один бік ліпідного бішару, будучи "на початку своєї кар'єри" цитозольними, у відповідь на позаклітинний сигнал можуть зазнавати такої модифікації, унаслідок якої вони, скажімо, ковалентно приєднують одну чи декілька ліпідних груп, за участю яких набувають можливості рекрутуватися до плазмолемі, генеруючи клітинну відповідь (коли сигнальний шлях вимикається, ліпідні групи відщеплюються і білки повертаються в цитозоль). Так може працювати, зокрема, згадана вище протеїнкіназа С.

Більшість трансмембранних білків, будучи структурно гетерогенними за своїми позамембранними доменами, орієнтовані в самій мембрані достатньо стандартно. Оскільки пептидні зв'язки у самому білку є полярними, то за відсутності води в гідрофобній серцевині мембрани амінокислотні залишки змушені формувати водневі зв'язки між собою. А це найбільш ефективно

відбувається тоді, коли поліпептид упакований у регулярну ***α-спіраль***, що перетинає мембрану. Саме в такий спосіб "організуються" більшість трансмембранних білків. У випадку, коли вони один раз перетинають мембрану, їх називають ***однопрохідними трансмембранними***, або ***монотопними*** (рис. 3.8, 1), якщо декілька разів – ***багатопрохідними трансмембранними***, або ***політопними*** (рис. 3.8, 2) (останні становлять до 20 % усіх білків нашого організму).

У випадку політопності білки можуть мати ділянки, які "упаковуються" в мембрану, проникаючи у простір між α -спіралями без взаємодії з гідрофобним центром ліпідного бішару. А значить, їм немає необхідності максимізувати кількість утворених водневих зв'язків, і вони можуть мати різноманітну вторинну структуру (рис. 3.9, А) (такі структурні домени важливі для функціонування, скажімо, K^+ -каналів). Зазначимо, що трансмембранні α -спіралі здатні відносно легко ковзати відносно одна одної, що дозволяє білку змінювати свою конформацію для відкриття й закриття іонних каналів, транспорту розчинених речовин або трансформації позаклітинного сигналу у внутрішньоклітинний.

Альтернативним способом упаковки трансмембранних білків, який також вирішує проблему з водневими зв'язками, є формування поліпептидним ланцюгом ***β-структур (β-складок)*** з наступним їхнім "згортанням" у вигляді достатньо жорсткої структури типу закритої "бочки" (так званого ***β-бочонка***) (рис. 3.8, 3; 3.9, Б). Кількість β -структур у β -бочонках коливається від 8 до 22. Білки з таким типом укладки у великій кількості виявлені виключно в зовнішній мембрані мітохондрій, хлоропластів, а також бактерій. Деякі з них (зокрема, *білки-пори*, про що йтиметься далі) формують пори, утворюючи заповнені водою канали для проходження маленьких гідрофільних молекул через ліпідний бішар мембрани. Інші ж слугують рецепторами або ферментами: бочонок працює як жорсткий якір, що утримує білок у мембрані й орієнтує його цитоплазматичні петлі, які утворюють сайти зв'язування для специфічних внутрішньоклітинних молекул.

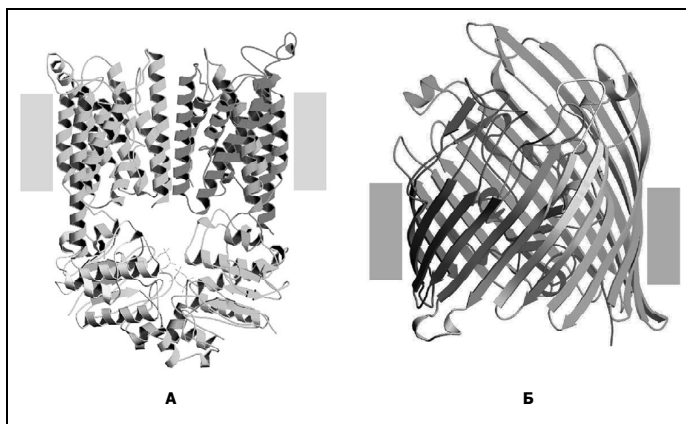


Рис. 3.9. Способи розташування політопних білків у ліпідному бішарі.

Поліпептидний ланцюг упакований у вигляді:

А – α -спіралі;

Б – β -складок, згорнутих у структуру β -бочонка

(за Велайном Р., Кроссом Т., Джейном Б., 2004)

Велика кількість монотопних мембранних білків здатна утворювати *гомодимери*, які утримуються разом сильними і високоспецифічними взаємодіями між двома трансмембранними α -спіралями. Точно так же, трансмембранні α -спіралі політопних білків формують "спіраль-спіральні" взаємодії. І перше, і друге має ключове значення для структури й функції багатьох каналів і транспортерів. Деякі мембранні білки функціонують у складі багатокомпонентних комплексів. Так, комплекс фотосистеми II ціанобактерій містить 19 білкових субодиниць і більше 60 трансмембранних спіралей.

Більшість трансмембранних білків тваринних клітин глікозилзовані. Як і у випадку із гліколіпідами, вуглеводні залишки додаються до білків у люмені ЕПС і апарату Гольджі. Тому олігосахаридні ланцюги завжди розташовані на зовнішньому боці плазмолемі (рис. 3.7) (або обернені в люмен органел вакуолярної системи). А отже, зовнішня поверхня

плазмолемі еукаріотичних клітин виявляється "вкритою" вуглеводами, переважно олігосахаридними ланцюгами, ковалентно зв'язаними з мембранними білками (*глікопротеїни*) або з ліпідами (*гліколіпіди*). Однак на ній зустрічаються й полісахаридні ланцюги рекрутованих у мембрану молекул *протеогліканів*. Останні складаються із довгих полісахаридних ланцюгів, ковалентно зв'язаних із коровими білками, і зазвичай розташовуються ззовні клітини як частина позаклітинного матриксу. Але у деяких протеогліканів їхня білкова частина може поєднуватися з ліпідним бішаром плазмолемі глікозилфосфатидилінозитольним якорем. Подібним чином можуть рекрутуватися у мембрану й молекули глікопротеїнів позаклітинного матриксу.

Часто для опису збагаченої вуглеводами ділянки поверхні клітини використовують терміни *клітинна оболонка*, або *глікокалікс* (рис. 3.7; 3.10). І хоча більшість вуглеводних груп такої оболонки пов'язана з внутрішніми молекулами плазмолемі, вона може містити гліколіпіди та протеоглікани, секретовані в міжклітинний простір, а потім адсорбовані на клітинну поверхню (межа між плазмолемою й позаклітинним матриксом часто є досить розмитою).

Глікокалікс має для клітин суттєве значення: він захищає клітини від механічного й хімічного пошкодження, протидіє клітинному зближенню, а отже, перешкоджає небажаним білок-білковим взаємодіям. Крім цього, олігосахариди глікокаліксу за рахунок свого різноманіття (їхні ланцюги суттєво варіюють за складом, здатні галузитися та утворювати між собою різноманітні ковалентні зв'язки) і розташування на поверхні клітини, ідеально підходять для здійснення процесів клітинного розпізнання (детальніше про це йтиметься у розд. 4).

Як і більшість мембранних ліпідів, мембранні білки не переходять із одного моношару в інший, однак обертаються навколо осі, перпендикулярної площині бішару (*обертальна дифузія*). Крім цього, більшість мембранних білків здатна латерально мігрувати в межах мембрани (*латеральна дифузія*).

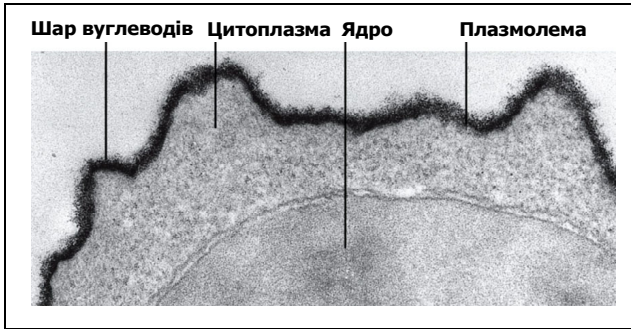


Рис. 3.10. Електроннограма поверхні лімфоцита.
Забарвлення рутенієвим червоним
(за Албертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Дж. та ін., 2013, зі змінами)

ПРИНЦИПИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ЕУКАРІОТИЧНОЇ КЛІТИНИ

У плазматичних мембранах усіх еукаріотичних клітин ліпідний бішар визначає головні структурні особливості (як і в мембранах будь якого типу), тоді як білки відповідають за більшість мембранних функцій. Будучи специфічними рецепторами, ферментами, молекулами адгезії, білки виступають ключовими елементами механізмів міжклітинної сигналізації, розпізнання позаклітинного сигналу та його передачі всередину клітини, процесів формування клітинних ансамблів тощо. Більшість із білків плазмолеми, розташованих на поверхні мембрани, а також певні ліпіди зовнішнього моношару ліпідного бішару ковалентно зв'язані з олігосахаридами, які залучаються до процесів міжклітинного розпізнання та розпізнання між клітинами й молекулами позаклітинного матриксу.

Визначені базові принципи структурно-функціональної організації плазматичної мембрани є загальними для всіх еукаріотичних клітин. Особливості її будови й "режиму роботи"

прямо пов'язані з "функціональним призначенням" клітини. Особливо актуально це для багатоклітинних еукаріотів, на "роботу" плазмолемі яких активно впливають не стільки фактори довкілля, як міжклітинні взаємодії у створених багатоклітинних ансамблях. До складу останніх можуть входити різні за будовою клітини: м'язові, нервові, епітеліальні тощо. Цей факт посилює гетерогенність (структурну й функціональну) поверхонь плазмолемі клітин, які контактують з різними "партнерами". Але навіть у межах відносно однорідної клітинної формації, наприклад в епітеліальних клітинах ниркових каналців, спостерігається поверхнева гетерогенність плазмолемі. У них визначають *базальну клітинну поверхню*, якою клітини контактують з позаклітинним матриксом, *базолатеральну поверхню*, якою вони прикріплюються до інших клітин у тканинному комплексі, та *апикальну*, вільну поверхню, обернену у провіт каналців, тобто у клітині виявляється певна полярність. Зрозуміло, що кожна з поверхонь, потрапляючи в різне "оточення", формує свою власну "індивідуальність" як структурну, так і функціональну. Так, деякі ферменти і транспортні білки плазмолемі локалізовані лише в її апикальному домені (інколи вільно мігруючи у його межах), тоді як інші – лише в базальному і латеральному. Таке асиметричне розташування мембранних білків є необхідним для функціонування епітелію. Зауважимо, що відмінності між різними поверхнями виявлені не лише в білковому, але й ліпідному складі, а значить, клітина здатна обмежувати дифузію між певними доменами не лише молекул білків, а й ліпідів.

Підтримка розподілу як білкових, так і ліпідних молекул забезпечується найчастіше бар'єрами, створеними особливим типом міжклітинних контактів (*щільних контактів*, або *замикальних зон*, про що детальніше йтиметься у розд. 4). Мембранні білки, які утворюють такі контакти, нездатні латерально дифундувати в контактуючих мембранах (вони взаємодіють як і з білками мембрани контактуючої клітини, так і з підмембранними білками власного цитоскелета), що й призводить до *доменізації* останніх. Отже, способом обмеження латеральної

дифузії мембранних білків у даному випадку є їхнє прикріплення до ансамблів макромолекул з обох боків мембрани.

Клітини можуть створювати мембранні домени й без залучення міжклітинних контактів. Молекулярна природа "огорожі" у цьому випадку залишається до кінця незрозумілою. Однак відомо, що доменізація певною мірою може виникати при утворенні багатокомпонентних мембранних комплексів (як, наприклад, згаданий вище комплекс фотосистеми II ціанобактерій), або шляхом прикріплення мембранних білків до певних білків (чи їхніх ділянок) у міжклітинному просторі (що є фактично контактом типу "клітина – позаклітинний матрикс"). Крім того, доменізація може забезпечуватися й лише взаємодією мембранних білків з підмембранними білками цитоскелета. Так, скажімо, характерна двовгнута форма еритроцитів пояснюється взаємодією їхніх мембранних білків із цитоскелетом, який складається переважно із фібрилярного білка спектрину (детальніше див. розд. 7). Спектриновий цитоскелет прикріплений до плазмолемі різними мембранними білками, унаслідок чого утворюється мережа (вона вкриває всю цитоплазматичну поверхню мембрани еритроцита), що легко деформується (це дозволяє клітині витримувати стиснення при проходженні через вузькі капіляри).

Кортикальна сітка цитоскелета (*кортикальний шар*, або *кортекс* цитоплазми) більшості клітин людини (значно більш розвинута і складніша за таку в еритроцитів, збагачена активними філаментами, які в різний спосіб прикріплюються до плазмолемі), обмежує дифузію не лише білків, пов'язаних із нею прямо. Розташовуючись дуже близько до цитоплазматичної поверхні плазмолемі, філаменти здатні створювати механічні бар'єри, які заважають вільній дифузії мембранних білків. Такі бар'єри розділяють мембрану на маленькі тимчасові або постійні домени – *коралі*, у межах яких мембранним білкам "дозволено" вільно дифундувати (хоча інколи тепловий рух змушує кортикальні філаменти тимчасово відійти від плазмолемі, і білок може перейти в сусідню кораль). Припускають, що така "коралізація" грає важливу роль у сигналізації.

Рецептор на поверхні клітини, зв'язуючись із позаклітинною сигнальною молекулою, активується і змінює свою конформацію, що "відкриває можливість" рекрутуватися до його цитоплазматичного домену крупним білковим комплексам, які й заважають рецептору покинути його кораль. Вважається, що утворення коралей сприяє концентруванню активованих сигнальних комплексів, що збільшує швидкість і ефективність процесів сигналізації (детальніше див. у розділі "Інформаційні міжклітинні взаємодії").

Отже, уявлення про те, що мембрана є ліпідним озером, у якому вільно плавають усі білки, виявилось надто спрощеним.

Плазматичні мембрани клітин різної типології набувають "індивідуальності" не лише за рахунок своєрідності доменізації, але й формуючи спеціалізовані утворення. Так, апікальні поверхні клітин згаданих епітеліоцитів можуть мати високоспеціалізовані мембранні вирости – **мікроросинки**, які суттєво збільшують площу поверхні клітини, тим самим збільшуючи, як мінімум, її всисну спроможність. Кожна з мікроросинок має внутрішню основу (скелет) із зв'язаних між собою актинових філаментів, котрі, у свою чергу, зв'язані зі специфічними білками (які й забезпечують актиновому скелету можливість реалізувати своє фізіологічне призначення) і кортикальним цитоскелетом клітини. Останнє робить фізіологічні зміни поверхневого апарату клітини відчутними для внутрішньоклітинного середовища.

Іншим варіантом спеціалізованої модифікації апікальної поверхні є формування **війок**, як, наприклад, в епітеліоцитах покриву дихального шляху в бронхіолах. Війки, як і мікроросинки, мають високоорганізовану систему внутрішнього скелета, що в цьому випадку складається з мікротрубочок, зібраних у певний спосіб. Організована у такий спосіб апікальна поверхня добре пристосована для видалення непотрібних часток із дихальних шляхів (детально будову мікроросинок і війок описано в розділі "Цитоскелет").

МЕМБРАННИЙ ТРАНСПОРТ

ПРОНИКНІСТЬ КЛІТИННИХ МЕМБРАН

Теоретично будь-яка молекула за достатньо тривалий час здатна перетнути позбавлений білків ліпідний бішар за рахунок *дифузії* за градієнтом концентрації. І чим менша за розміром сама молекула, а також, що є важливішим, чим більш вона гідрофобна й чим менше утворює водневих зв'язків (у першу чергу – слабкіше зв'язується з водою), тим швидше вона дифундує через мембрану. Так, маленькі неполярні молекули, наприклад O_2 і CO_2 , легко розчиняються в ліпідних бішарах і, відповідно, швидко через них дифундують. Тоді як маленькі незаряджені, але полярні молекули, такі як вода і сечовина, дифундують через бішар уже повільніше. А для заряджених молекул (іонів, водорозчинних пептидів), незалежно від їхнього розміру, ліпідні шари практично непроникні: заряд і високий рівень гідратації таких молекул не "дозволяє" їм проникати у вуглеводневу фазу бішару.

Бар'єрна функція мембрани дозволяє клітині підтримувати оптимальні концентрації розчинених у цитозолі речовин, які відрізняються від таких у позаклітинному матриксі й у кожному із внутрішньоклітинних мембранних компартментів. Однак, для того щоб цей бар'єр слугував клітинам "на користь", вони повинні вміти переносити певні водорозчинні молекули та іони через мембрану, що необхідно для поглинання поживних речовин, виділення продуктів метаболізму, регуляції внутрішньоклітинної концентрації іонів тощо. Із цією метою клітини використовують спеціалізовані трансмембранні білки, здатні забезпечувати транспорт через ліпідний бішар не лише неорганічних іонів і малих водорозчинних органічних молекул, але й макромолекул і навіть великих часток. Важливість мембранного транспорту підкреслюється тим фактом, що транспортні білки становлять майже 30 % мембранних білків клітини.

Поєднання селективної пасивної проникності та активного (енергетично залежного) транспорту (про що йтиметься нижче)

приводить до значних відмінностей між складом цитозолу, позаклітинного середовища (табл. 3.3) і рідин у замкнених мембранних органелах.

Створюючи різницю в концентрації іонів через ліпідний бішар, клітини запасують енергію у формі електрохімічних градієнтів. За їхньої рахунок здійснюються різноманітні транспортні процеси, передаються електричні сигнали у збудливих клітинах і (у мітохондріях, пластидах і бактеріях) синтезується більша частина АТФ.

Таблиця 3.3

Концентрація іонів усередині та ззовні типової клітини ссавців

Іони	Внутрішньоклітинна концентрація; мМ	Позаклітинна концентрація; мМ
Катіони		
Na ⁺	5–15	145
K ⁺	140	5
Mg ²⁺ (вільні)	0,5	1–5
Ca ²⁺ (вільні)	10 ⁴	1–2
H ⁺	7×10 ⁵ (10 ^{7,2} або pH=7,2)	4×10 ⁵ (10 ^{7,4} або pH=7,4)
Аніони*		
Cl ⁻	5–15	110

* Клітина має містити рівну кількість аніонів і катіонів, тобто бути електронейтральною. Крім Cl⁻ клітина містить велику кількість інших, не згаданих тут аніонів. До того ж, більшість сполук, із яких складається клітина, заряджені негативно: білки, нуклеїнові кислоти тощо. У таблиці наведено концентрації вільних іонів Ca²⁺ та Mg²⁺. У клітині міститься в цілому близько 20 мМ Mg²⁺ і 1–2 мМ Ca²⁺, але більшість цих іонів зв'язані з білками та іншими сполуками, а у випадку кальцію, депоновані в різних органелах.

ПАСИВНИЙ ТРАНСПОРТ

Пасивним транспортом через мембрану прийнято називати такий його різновид, для здійснення якого клітина енергії не витрачає. У цьому випадку речовини транспортуються через мембрану *за градієнтом своєї концентрації*, пасивно (скажімо, із позаклітинного простору, у якому їхня концентрація вища, у цитозоль, де вона нижча).

Як уже зазначалося вище, гідрофобні молекули (O_2 , CO_2 , N_2 , стероїдні гормони) і невеликі незаряджені полярні молекули (вода, сечовина, гліцерин) здатні перетинати ліпідний бішар самостійно, пасивно, шляхом *простої дифузії* за градієнтом концентрації. Полярні молекули (амінокислоти, нуклеотиди, цукри тощо) та іони також можуть "долати" мембрану пасивно, однак "не самостійно" – шляхом транспортування (самостійному переходу через вуглеводневу фазу бішару мембрани їм заважає заряд і високий рівень гідратації). Швидкість перенесення таких речовини хоча й визначається різницею їхньої концентрації по обидва боки мембрани (як і у випадку простої дифузії), проте саме перенесення здійснюється за участю спеціальних допоміжних білкових систем (робота яких не вимагає енергетичних затрат). Такий тип транспорту речовин через мембрану, на відміну від простої дифузії, прийнято називати *полегшеною дифузією* (рис. 3.11).

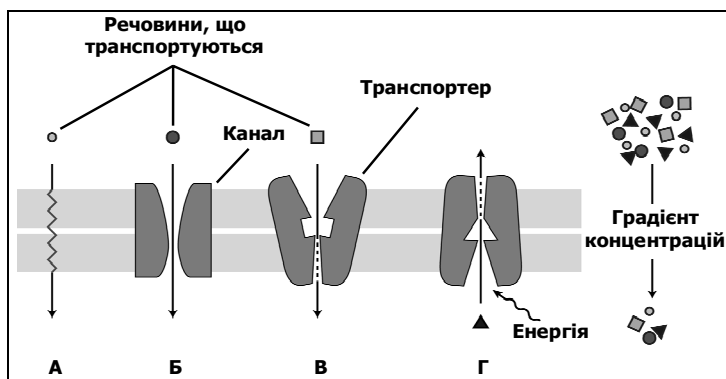


Рис. 3.11. Типи мембранного транспорту. Схема:
 А – звичайна дифузія, Б – дифузія через канал, В – дифузія, опосередкована білками – транспортерами; Г – активний транспорт

"Полегшення" дифузії здійснюється за участю специфічних *мембранних транспортних білків*. Вони наявні в біологічних мембранах будь-якого типу. Такі білки виявляють специфічність щодо речовини, яку вони транспортують: певний транспортний білок "обслуговує" молекули лише певного класу (скажімо, не-

органічні іони, вуглеводи або амінокислоти), а нерідко й лише якогось одного певного представника молекул цих класів.

Усі вивчені на сьогодні мембранні транспортні білки є політопними. Шляхом формування наскрізних "проходів" вони здатні забезпечувати перенесення специфічних гідрофільних речовин через мембрану без їхнього (речовин) прямого контакту з гідрофобною серцевиною ліпідного бішару.

Сьогодні достатньо добре вивчено і функціональну специфіку, і особливості локалізації мембранних транспортних білків, а також визначено два основні їхні класи: **білки-транспортери** (*переносники*, або *перміази*) та **каналоутворювальні білки**, які різняться механізмом перенесення речовин через ліпідний бішар (рис. 3.11).

Усі канали й більшість транспортерів (проте не всі; див. далі Активний транспорт) дозволяють молекулам перетинати мембрану пасивно (полегшена дифузія). Якщо молекули речовини, що транспортується, не мають заряду, то різниця їхньої концентрації по обидва боки мембрани (**градієнт концентрації**) визначає і напрям дифузії, і є її рушійною силою. Якщо ж розчинена речовина несе певний сумарний заряд, то на її транспорт впливає як концентраційний градієнт, так і різниця електричних потенціалів на різних боках мембрани (так званий **мембранний потенціал**). Концентраційний градієнт і електричний градієнт створюють сумарну рушійну силу – **електрохімічний градієнт** – для кожної зарядженої розчиненої речовини.

Зрозуміло, що підвищення електрохімічного градієнта прискорює транспорт шляхом полегшеної дифузії. Однак за безперервного підвищення концентрації субстрату по один бік мембрани (тобто при безперервному підвищенні концентраційного градієнта), швидкість перенесення може зростати не безкінечно – виникає **явище насичення**.

Фактично всі плазматичні мембрани мають різницю електричних потенціалів (градієнт потенціалу), при цьому внутрішній бік мембрани зазвичай заряджений негативно відносно зовнішнього. Такий мембранний потенціал полегшує проникнення у клітину позитивно заряджених іонів, але заважає проходженню всередину іонів, заряджених негативно.

Незважаючи на те, що вода здатна дифундувати через ліпідні бішари "самостійно", практично всі клітини мають специфічні каналні білки (так звані *водні канали*, або *аквапорини*), які значно збільшують проникність мембран для води.

Білки-транспортери

Білки-переносники (перміази), або транспортери, здійснюють перенесення певної розчиненої специфічно зв'язаної з ними речовини (*субстрату*) за рахунок певних зворотних конформаційних змін у своїй структурі (вони складаються переважно з декількох трансмембранних білкових субодиниць), спричинених самим процесом приєднання. Унаслідок таких змін сайт зв'язування субстрату, що транспортується, навперемінно розташовується спочатку по один бік бішару (де його концентрація є вищою), а потім по інший (де його концентрація є нижчою). У результаті розчинена речовина, що зв'язалася з транспортером по один бік мембрани, вивільнюється по інший (рис. 3.12). При цьому переносники не модифікують субстрат, що транспортується, доставляючи його на інший бік мембрани в незміненому стані.

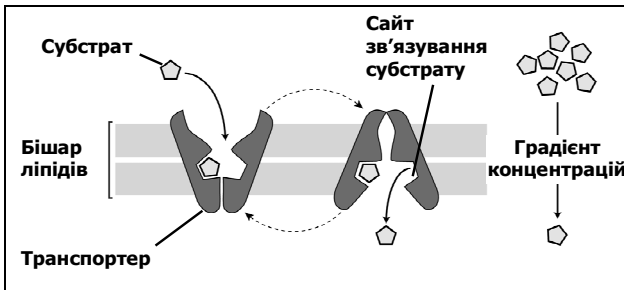


Рис. 3.12. Схема роботи білків-транспортерів

Білки-переносники є вузько специфічними транспортними білками, яким притаманне, як зазначалося вище, явище насичення. Подібне є характерним і для ферментів. Така аналогія дає можливість розглядати перміази як "ферменти", що "каталізують" переміщення речовин через мембрани, не модифікуючи їх

при цьому. Як і в усіх ферментів, зв'язування розчиненої речовини може бути специфічно заблоковане або *конкурентними інгібіторами* (як "борються" за той самий сайт зв'язування, і, у випадку "перемоги", можуть бути транспортовані), або *неконкурентними (алостеричними)* (вони зв'язуються з іншими ділянками переносника і специфічно змінюють його структуру так, що транспортер стає "непрацездатним").

Вузьку специфічність транспортних білків було вперше наочно продемонстровано при вивченні бактеріальних мутацій: з'ясувалось, що певні спадкові зміни, які відбуваються в одному-єдиному певному гені приводять до зникнення у бактерій здатності переносити через плазмолему певні вуглеводи. Аналогічні мутації відомі також і в людини. Вони спричинюють різноманітні спадкові хвороби, пов'язані з порушенням транспорту певних речовин, наприклад, у нирках або кишечнику. Так, при *цистинурії* втрачається здатність транспортувати певні амінокислоти (включаючи цистинзв'язаний димер цистеїну) із сечовини або кишечнику в кров, що викликає накопичення цистину в сечовині й приводить до утворення цистинових "камінчиків" у нирках.

Деякі транспортери, їх прийнято називати *уніпортами*, сприяють руху лише однієї розчиненої речовини з одного боку мембрани на інший. Інші функціонують як *спряжені транспортери*, у яких перенесення однієї речовини залежить від переносу іншої. Якщо такий спряжений транспорт є одночасним перенесенням другої речовини у тому ж напрямку, у якому переноситься перша, то транспортер, що його забезпечує, називають *симпортом*, або *котранспортером*, якщо в протилежному – *антипортом*, або *обмінником* (рис. 3.13).

Каналоутворювальні білки

Канальні білки набагато слабше взаємодіють з розчиненими речовинами, транспорт яких вони забезпечують. Вони формують у ліпідному бішарі заповнені водою пори. Якщо ті відкриті, то певні речовини (як правило, це неорганічні іони відповідного заряду й розміру) вільно проходять через них,

перетинаючи при цьому мембрану. Не дивно, що транспорт через канали відбувається значно швидше (майже в 1000 разів) і ефективніше, ніж транспорт, опосередкований білками-транспортерами.

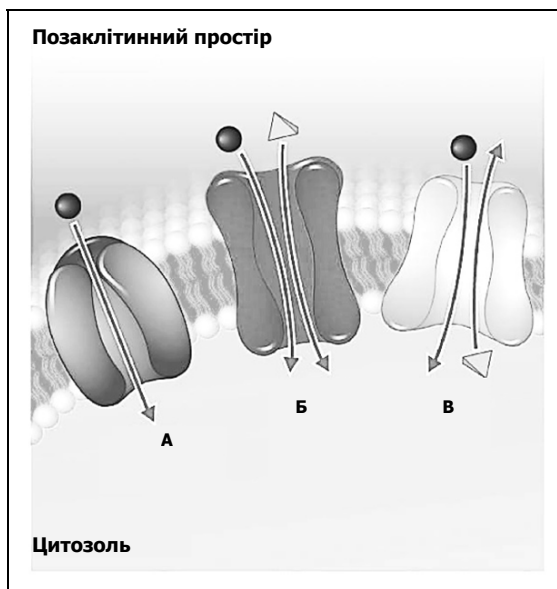


Рис. 3.13. Типи транспортерів.
Схема: А – уніпорт, Б – симпорт, В – антипорт
(за Маріссом Д., 2012)

Представники одного із класів каналотворювальних мембранних білків, наявні практично в усіх тваринних клітинах, формують *щілинні контакти* (цей тип контактів детально буде розглянуто в розділі "Загальні принципи міжклітинних взаємодій") між сусідніми клітинами (плазмолемами обох клітин при цьому роблять "рівний внесок" у формування з'єднувального каналу). Щілинні контакти, як і *порини* (каналотворювальні білки зовнішньої мембрани бактерій, мітохондрій і хлоропластів), мають відносно неспецифічні, великі за роз-

міром і "доступні" пори. Для клітини мати такі пори у плазмолемі було б смертельним: вони б прямо з'єднували цитозоль із позаклітинним простором (насправді, більшість бактеріальних токсинів саме шляхом "формування" таких пор "убивають" еукаріотичні клітини).

Більшість каналних білків плазматичної мембрани тваринних і рослинних клітин, що з'єднують цитозоль із позаклітинним середовищем, за необхідності, мають вузькі високоселективні пори, які можуть швидко відкриватися й закриватися. Оскільки ці білки специфічно пов'язані з транспортом неорганічних іонів, їх називають *іонними каналами*. Вони ніколи не працюють сумісно з джерелом енергії (на відміну від білків-транспортів, які можуть забезпечувати як пасивне, так і активне перенесення речовин, залежно від своєї "специфікації"). Транспорт, який вони здійснюють, завжди пасивний (полегшена дифузія), він дозволяє певним іонам, головним чином Na^+ , K^+ , Ca^{2+} або Cl^- , дифундувати через ліпідний бішар за їхніми електрохімічними градієнтами.

Іонні канали всіх клітин утворені трансмембранними білками й мають дві важливі властивості, які відрізняють їх від простих, заповнених водою пор. По-перше, їм притаманна *іонна селективність*: пропускаючи одні іони, вони не дозволяють проходити іншим. Для того, щоб працював такий фільтр (пропускав іони лише певного розміру й заряду), пори каналів повинні бути в певних місцях достатньо вузькими (найвужчу частину каналу й називають *селективним фільтром*), щоб іони, які проходять, щільно контактували з їхніми стінками (рис. 3.14). При проходженні через канал іони скидають гідратну оболонку, утворюючи після цього слабкі електростатичні зв'язки з полярними амінокислотами вздовж його стінок. Оскільки втрата іоном молекул води є енергетично не вигідною, то він переходить по каналу лише тоді, коли виниклі електростатичні взаємодії компенсують таку втрату. При збільшенні концентрації іонів з одного боку мембрани їхній потік через канал збільшується пропорційно доти, поки не досягне певного максимального рівня (*насичення*).

Другою важливою відмінністю іонних каналів від простих (заповнених водою) пор є те, що вони відкриті не завжди. У них є так звані "*ворота*", які дозволяють їм відкриватися на короткий проміжок часу, а потім знову закриватися (рис. 3.14). Більш того, за тривалої (хімічної чи електричної) стимуляції більшість каналів переходить у закритий "несприйнятливий", або "інактивований", стан, у результаті чого вони перестають відкриватися до припинення стимуляції.

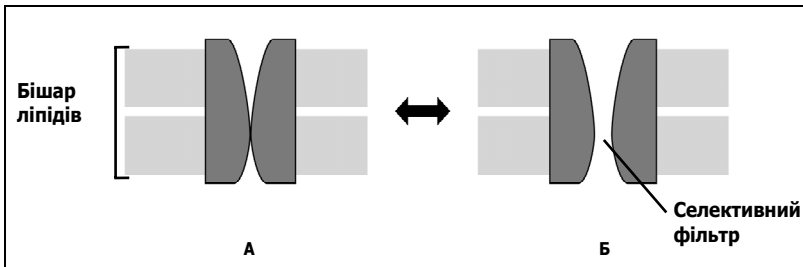


Рис. 3.14. Типовий іонний канал:
А – закрита конформація, Б – відкрита конформація

Основними типами стимулів, які відкривають іонні канали є:

- зміна *трансмембранної різниці потенціалів (потенціалзалежні канали)* (рис. 3.15, А);
- *зв'язування ліганду* (специфічної сигнальної молекули) (*лігандзалежні канали*). Як ліганд можуть виступати позаклітинний медіатор (рис. 3.15, Б), наприклад нейромедіатор (*медіаторозалежні канали*), внутрішньоклітинний медіатор (рис. 3.15, В), наприклад іон (*іонозалежні канали*), або нуклеотид (*нуклеотидзалежні канали*);
- *механічний тиск (механочутливі канали)* (рис. 3.15, Г).

Крім того, активність багатьох каналів регулюється фосфорилуванням і дефосфорилуванням його білкових субодиниць і може змінюватися під впливом різних факторів, у результаті певних метаболічних реакцій, за дії певних токсинів і лікарських речовин.

Першим кристалізованим і вивченим методом рентгенівської дифракції іонним каналом був бактеріальний **канал K^+** . Інформація про його структуру здійснила переворот у нашому розумінні іонних каналів.

Більшість іонних каналів складається з декількох однакових трансмембранних субодиниць, кожна із яких робить внесок у формування загальної центральної пори. Хоча нещодавні дослідження Cl^- -каналів показали, що вони (мінімум деякі з них) складаються із двох однакових субодиниць, кожна із яких має власну пору, через яку рухаються іони Cl^- .

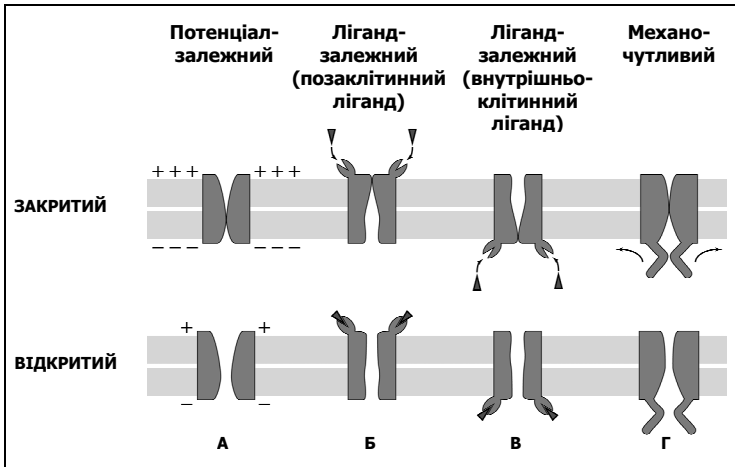


Рис. 3.15. Ворота іонних каналів

K^+ -канал є "класичним" за будовою, він складається з чотирьох однакових субодиниць, кожна з яких містить дві трансмембранні α -спіралі, об'єднані між собою *поровими спіралями* (короткими α -спіралями), які, виступаючи в пору, формують *селективний фільтр* (рис. 3.16).

Із цитоплазматичного боку пора відкриває прохід у центр мембрани. При цьому негативно заряджені амінокислоти, розташовані на цитоплазматичному кінці пори, притягують катіони й відштовхують аніони, тобто роблять канал *катіон-селективним*.

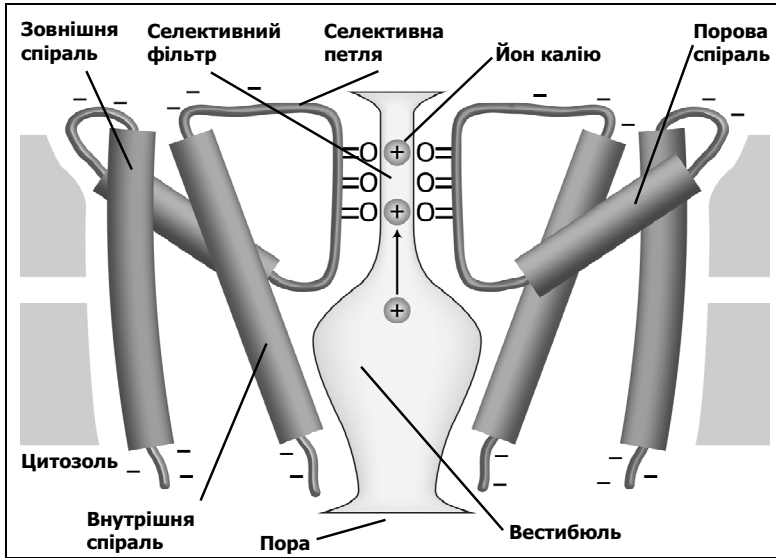


Рис. 3.16. Структура бактеріального K^+ -каналу.
Показано дві трансмембранні α -спіралі (з'єднані поровими спіралями)
двох із чотирьох однакових субодиниць

Структура селективного фільтра зумовлює іонну селективність каналу. Селективні петлі чотирьох субодиниць формують коротку, жорстку пору, вистелену карбонільними атомами кисню їхніх поліпептидних скелетів. Іон K^+ , щоб пройти через фільтр (попередньо подолавши так званий *вестибюль*, у якому він знаходиться ще у зв'язаному з водою стані), має бути *дегідратованим*. У порі (після дегідратації) він взаємодіє (замість молекул води) з карбонільними оксигенами, які вистилають фільтр. Ці оксигени розташовані так, щоб якомога ефективніше "розмістити" K^+ . Інший іон, наприклад Na^+ , хоча й менший за розміром, не може "увійти" у фільтр, оскільки карбонільні оксигени розташовані надто далеко від маленького Na^+ щоб компенсувати енергетичні затрати, пов'язані із втратою води при входженні в канал.

Результати аналізу структурної організації K^+ -каналів дозволили також зрозуміти те, як канали відкриваються та закриваються. Вважається, що такі *воротні механізми* є фактично "ру-

хами" спіралей у мембрані, які приводять до блокування (у закритому стані) і вивільнення (у відкритому стані) шляху пересування іонів. Залежно від типу каналів, спіралі "воріт" можуть нахилитися, обертатися або вигинатися.

K^+ -канали виявлені в плазматичних мембранах майже всіх тваринних клітин. Важливий "підвид" таких каналів відкривається навіть у не стимульованій клітині (клітині, що перебуває у "стані спокою"), тому їх називають *каналами витоку K^+* (або *калієвими проточними каналами*). Однак, незважаючи на особливості будови й локалізації, усі K^+ -канали виконують однакову функцію: роблячи плазмолему більш проникною для K^+ , ніж для інших іонів, вони відіграють ключову роль у підтриманні мембранного потенціалу.

Нагадаємо, що мембранний потенціал виникає тоді, коли заряди по два боки мембрани є різними за рахунок невеликого надлишку позитивно заряджених іонів (*катіонів*) відносно негативних (*аніонів*) по один бік, і їхнього невеликого дефіциту – з іншого. Така різниця зарядів може виникати або в результаті роботи електрогенних насосів (про що йтиметься нижче), або за рахунок пасивної дифузії іонів (у типових тваринних клітинах саме дифузія іонів дає основний внесок у "створення" електричного потенціалу плазмолемі).

K^+ -канали, функціонуючи за будь-якого функціонального стану клітини, повертають у позаклітинне середовище певну кількість іонів K^+ , напрямок руху яких зумовлюється сильним концентраційним градієнтом, створеним Na^+/K^+ -насосом (див. нижче). Вихід навіть відносно невеликої кількості іонів K^+ створює таку різницю потенціалів між боками мембрани, яка енергетично врівноважує калієвий концентраційний градієнт, як наслідок, настає динамічна рівновага, і подальша дифузія іонів K^+ через канали зупиняється. У результаті зовнішньо- та внутрішньоклітинні концентрації цих іонів практично не змінюються, проте клітина набуває трансмембранного потенціалу.

Для встановлення мембранного потенціалу через плазматичну мембрану повинна рухатися невелика кількість іонів: можна вважати, що він виникає завдяки руху зарядів, які

практично не впливають на концентрації іонів. У результаті по два боки мембрани різниця в кількості позитивних і негативних зарядів є невеликою. А значить, навіть незначні зміни проникності мембрани відносно іонів можуть викликати значні зміни мембранного потенціалу. Це один із ключових принципів, що пов'язує електричну збудливість клітин з активністю іонних каналів.

Здатність регулювати іонні потоки за участю селективних каналів лежить в основі багатьох клітинних функцій. Найбільш показовим прикладом значення іонних каналів, є їхнє "використання" нервовими клітинами для отримання, проведення й передачі сигналів.

На сьогодні описано понад 100 типів іонних каналів (та їхня кількість продовжує зростати), які відрізняються за типом іонів, що вони пропускають, механізмом регуляції, кількістю і локалізацією у клітині. Їх виявлено не лише в електрично збудливих клітинах: вони наявні в усіх тваринних клітинах, виявляються в деяких рослинних, а також у клітинах мікроорганізмів.

Іонні канали, так чи інакше, долучаються до більшості клітинних процесів: відповідають за електричну збудливість м'язових клітин, опосередковують більшість видів електричних сигналів у нервовій системі, беруть участь у закритті листя мімози тощо. Маючи вибіркову селективність, вони, з одного боку, забезпечують підтримання внутрішньоклітинного гомеостазу, а з іншого, здійснюючи транспорт певних іонів лише у відповідь на дію певних сигнальних чинників, залучаються до процесів міжклітинної сигналізації. Так, згадані нами вище K^+ -селективні канали витоку грають важливу роль у встановленні потенціалу спокою плазматичної мембрани більшості тваринних клітин, тоді як потенціалозалежні катіонні канали відповідають за генерацію самопосилювальних потенціалів дії в таких електрично збудливих клітинах, як нейрони і клітини скелетних м'язів. Медіаторозалежні канали переводять хімічний сигнал в електричний у хімічних синапсах (про це детально йтиметься у розділі "Загальні принципи

міжклітинних взаємодій"). Збуджувальні нейромедіатори, такі як ацетилхолін і серотонін, відкривають медіаторозалежні катіонні канали і деполаризують постсинаптичну мембрану до порогового рівня генерації потенціалу дії. Гальмівні нейромедіатори – ГАМК (γ -аміномасляна кислота), гліцин тощо – відкривають медіаторозалежні Cl⁻ або K⁺-канали і пригнічують генерацію імпульсів, підтримуючи поляризацію постсинаптичної мембрани. Підклас глутаматзалежних іонних каналів, який називають NMDA-рецепторами, є високопроникним для іонів Ca²⁺, здатних викликати довготривалі зміни синапсів і впливати в такий спосіб на деякі процеси навчання й пам'яті.

Аквапорини

Як про-, так і еукаріотичні клітини містять у плазмолемі водні канали, або аквапорини, котрі дозволяють воді перетинати мембрану. Їх особливо багато у клітинах, яким потрібно транспортувати воду швидко, скажімо, в епітеліоцитах нирок або в нейронах. Аквапорини вирішують задачу, протилежну тій, що стоїть перед іонними каналами: щоб не "зруйнувати" іонні градієнти через мембрану, вони мають швидко пропускати молекули води, повністю блокуючи при цьому проходження іонів.

Кристалічна структура аквапоринів дозволила зрозуміти, як вони досягають такої дивовижної селективності. Один бік пори складається переважно з гідрофільних амінокислот, які утворюють нетривалі водневі зв'язки з молекулами води. Ці зв'язки сприяють орієнтації та "вишиковуванню" в один ряд останніх при їхньому "переході" через мембрану. Інший бік пори, не маючи таких амінокислот, створює гідрофобний жолоб, який не допускає утворення водневих зв'язків. При цьому поря є надто вузькою для входу гідратованих іонів, а на дегідратацію потрібно надто багато енергії: гідрофільна стінка пори не може взаємодіяти з дегідратованими іонами й компенсувати їм втрату води. А отже, іони не можуть пройти через такий канал.

Іонофори

Існує група невеликих гідрофобних молекул, розчинних у ліпідних бішарах мембран, здатних підвищувати їхню проникність для іонів. Більшість таких молекул, названих **іонофорами**, синтезується мікроорганізмами. Вони "екранують" заряд іона, який транспортують, що й забезпечує його проходження через гідрофобну внутрішню зону ліпідного бішару мембрани. Оскільки іонофори не пов'язані з джерелами енергії, сприяючи транспорту іонів за їхнім електрохімічним градієнтом, вони можуть розглядатися як "система сприяння" процесу полегшеної дифузії.

Існують декілька типів іонофорів. До першого з них належать **рухливі переносники іонів**, прикладом яких є антибіотик *валіноміцин*. Він переміщує один іон K^+ (за електрохімічним градієнтом), захоплюючи його з одного боку мембрани, дифундуючи з ним через бішар, і вивільнюючи його з іншого. Інший іонофор – A23187 – транспортує двовалентні катіони, такі як іони Ca^{2+} або Mg^{2+} . Але на відміну від попереднього іонофору він, як правило, відіграє роль іонобмінника – на кожний двовалентний катіон, що вноситься ним у клітину, він переміщує назовні два іони H^+ .

Другий тип іонофорів – **каналоутворювальні**. Таким, зокрема, є *граміцидин А*, дві молекули якого з'єднуються в ліпідному бішарі мембрани, формуючи трансмембранний канал, що дозволяє моновалентним катіонам (іонам H^+ найлегше, іонам K^+ не дуже легко, а Na^+ важко) проходити мембраною за їхніми електрохімічними градієнтами. Утворені димери непостійні, вони весь час утворюються і дисоціюють, тому сформований канал залишається відкритим лише протягом 1 с. Однак за наявності великого електрохімічного градієнта граміцидин А допомагає пропустити близько 20 000 катіонів на один відкритий канал за 1 мс, що в 1000 разів більше, ніж може перенести за цей час одна молекула рухливого переносника.

АКТИВНИЙ ТРАНСПОРТ

Активний мембранний транспорт здійснюється за участю спеціальних транспортних білків-переносників, які інколи називають *транслоказами*. На відміну від полегшеної дифузії (яка, нагадаємо, також відбувається за участю білків-транспортерів), активне перенесення розчинених молекул через мембрану відбувається *проти градієнта їхньої концентрації*. Таке перенесення потребує затрати енергії, а це означає, що транспортна система має "вирішувати питання енергозабезпечення" (фактично має зв'язати транспортер із джерелом енергії).

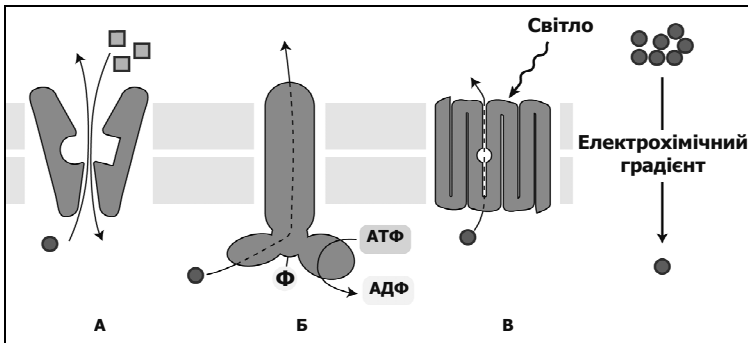


Рис. 3.17. Три типи забезпечення активного транспорту енергією:

- А – спряжений переносник,
- Б – АТФ-залежний насос,
- В – світлозалежний насос

Порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей білків-транспортерів, які опосередковують пасивний і активний транспорт, показав наявність у багатьох випадках значної подібності їхнього молекулярного "устрою" (що, певною мірою, є свідченням еволюційної спорідненості). А отже, принциповим "новаторством" активних систем транспорту є використання ними специфічних джерел енергії для реалізації своєї функції.

Проблема енергозабезпечення активного транспорту може розв'язуватися декількома шляхами (рис. 3.17). По-перше, спряженням перенесення речовини з реакцією, що забезпечує виділення енергії, скажімо, із гідролізом АТФ. У тому разі, якщо гідроліз АТФ до АДФ з наступним вивільненням енергії та перекачуванням іонів (або інших розчинених речовин) через мембрану здійснює сам білок-транспортер, його називають **АТФ-залежним насосом**, або **транспортною АТФазою** (рис. 3.17).

Існують три класи АТФ-залежних насосів, представники кожного з яких наявні в усіх про- та еукаріотичних клітинах: насоси Р-типу, насоси F (і V) типу та АВС-переносники (рис. 3.18).

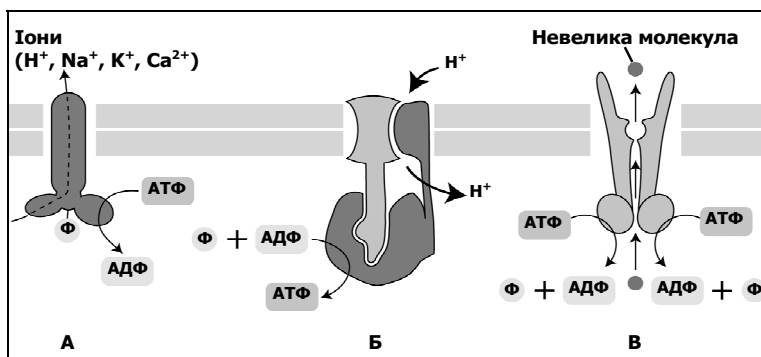


Рис. 3.18. Типи АТФ-залежних насосів:

А – насос Р-типу, Б – протонний насос F-типу(і V-типу), В – переносник АВС.

Як і ферменти, насоси можуть працювати й у зворотному напрямку: коли електрохімічні градієнти розчинених речовин змінюють напрямок і відношення АТФ/АДФ є малим, то вони можуть синтезувати АТФ з АДФ, як показано для АТФази F-типу

Насоси Р-типу (структурно й функціонально споріднені багатопрхідні білки) під час транспортного циклу фосфорилують самі себе (звідсіля і їхня назва). Цей клас включає у себе велику кількість іонних насосів, відповідальних за створення й підтримання трансмембранних градієнтів Na⁺, K⁺, H⁺ і Ca²⁺.

Найбільш вивченою АТФазою Р-типу є Ca^{2+} -насос. Еукаріотичні клітини підтримують дуже низьку концентрацію вільного кальцію в цитозолі ($\sim 10^{-7}\text{M}$) (у позаклітинному середовищі вона становить $\sim 10^{-3}\text{M}$). А отже, надходження іонів Ca^{2+} навіть у незначній кількості у клітину суттєво змінює картину їхнього "розподілу". Тому не дивно, що потік Ca^{2+} за градієнтом концентрації у відповідь на позаклітинні сигнали є одним із засобів швидкої передачі цих сигналів через плазмолему. Транспортери Ca^{2+} , які активно відкачують ці іони із цитозолу, допомагають підтримувати такий градієнт. Одним із них є Ca^{2+} -АТФаза Р-типу (Ca^{2+} -насос, або Ca^{2+} -АТФаза), найкраще вивчена в мембрані саркоплазматичного ретикулула скелетних м'язових волокон.

Іншим представником Р-насосів є Na^+/K^+ -насос, наявний у плазматичній мембрані практично всіх клітин тварин. Він підтримує різницю концентрації Na^+ і K^+ усередині клітини і ззовні (зазвичай концентрація K^+ усередині клітини в 10–30 разів більша, ніж ззовні, зворотнє справедливе для Na^+ (табл. 3.3)). Насос працює як АТФ-залежний антипорт, активно відкачуючи Na^+ із клітини й закачуючи K^+ у клітину проти їхніх електрохімічних градієнтів. Оскільки насос гідролізує АТФ для транспорту іонів, його називають Na^+/K^+ -АТФазою (Na^+ -залежне фосфорилування і K^+ -залежне дефосфорилування білка викликають упорядковані зміни конформації, що дозволяє йому виконувати "корисну роботу") (рис. 3.19).

Градієнт Na^+ , створений Na^+/K^+ -насосом, слугує рушійною силою транспорту більшості поживних речовин у тваринних клітинах, а також відіграє ключову роль у регуляції цитоплазматичного рН. Це робить зрозумілим той факт, що типова тваринна клітина витрачає майже третину своєї енергії на підтримку роботи цього насоса.

Na^+/K^+ -насос на два закачаних усередину позитивно заряджених іони (K^+) відкачує назовні три (Na^+), тому його називають *електрогенним*. Він створює сумарний електричний ток через мембрану і, відповідно, електричний потенціал: клітина всередині заряджена негативно відносно зовнішнього середо-

вища (цей насос дає ~10 %-й внесок у мембранний потенціал, інші 90 % хоча й залежать від його роботи, проте не прямо).

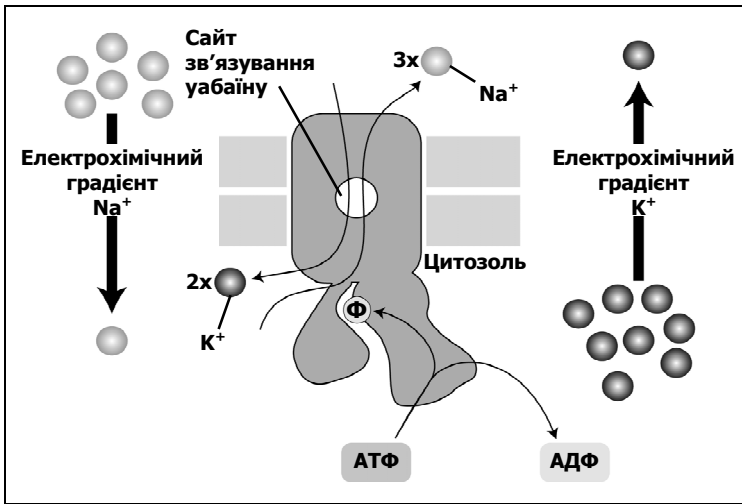


Рис. 3.19. Принцип роботи Na^+/K^+ -насоса. На кожен гідролізовану всередині клітини молекулу АТФ із цитозолу викачується три іони Na^+ і закачується два K^+ . Специфічний інгібітор уабаїн і K^+ конкурують за один сайт зв'язування на позаклітинному боці насоса

Крім того, Na^+/K^+ -насос прямо залучений до регуляції концентрації розчинених речовин усередині клітини, він відіграє певну роль у контролі *осмолярності* (або *тонічності*) цитозолу. Уже згадувалося, що всі клітини в плазмолемі містять аквапорини, які слугують для прискорення току води через неї. Крім того, має місце проста дифузія води через плазматичну мембрану. Вода рухається у клітину чи з неї за градієнтом концентрації (процес називається *осмосом*). Клітина містить високі концентрації розчинених речовин, включаючи численні негативно заряджені органічні молекули (так звані *фіксовані аніони*) і супутні їм катіони (для врівноваження зарядів). За рахунок цього створюється великий осмотичний градієнт, який намагається "притягнути" в клітину воду. Тваринні клітини протидіють цьому, створюючи протилежний осмотичний градієнт за рахунок висо-

кої концентрації неорганічних іонів, в основному Na^+ і Cl^- , у позаклітинній рідині. Na^+/K^+ -насос допомагає підтримувати осмотичну рівновагу, відкачуючи Na^+ , який надходить у клітину за електрохімічним градієнтом (Cl^- не проходить у неї через наявність мембранного потенціалу).

Клітини інших організмів вирішують "осмотичні проблеми" по-своєму. Так, клітини рослин і багатьох бактерій не розриваються під тиском надлишкової води, формуючи над мембраною напівжорстку клітинну стіну, амеба "збирає" надлишок води у скоротливі вакуолі, періодично "відкриваючи" їх у зовнішнє середовище.

Зауважимо, що Na^+/K^+ -насос, як і будь який фермент, може працювати у зворотному напрямку, у даному випадку синтезуючи АТФ. При штучному підвищенні градієнтів Na^+ і K^+ до рівня, за якого "запасена" в них енергія стає більшою за енергію гідролізу АТФ, іони починають переміщуватися за своїм електрохімічним градієнтом, і насос починає синтезувати АТФ з АДФ і фосфату.

Насоси F-типу є роторними білками, які складаються із декількох субодиниць. Вони структурно відрізняються від АТФаз Р-типу, розташовуються в плазматичній мембрані бактерій, внутрішній мітохондріальній мембрані й тилакоїдній мембрані хлоропластів. Їх часто називають *АТФсинтазами*, оскільки в нормі вони працюють у "протилежаному" напрямку: замість того, щоб використувати гідроліз АТФ для транспорту H^+ , вони використовують градієнт H^+ для синтезу АТФ з АДФ і фосфату. Градієнт H^+ при цьому створюється одним механізмом із трьох можливих:

- у процесі транспорту електронів при окисному фосфорилуванні (в аеробних бактеріях і мітохондріях),
- у процесі фотосинтезу (хлоропласти),
- за рахунок роботи світлозалежного H^+ -насоса (*бактеріородопсину*) у *Holobacterium*.

Фотоактивуючий протонний насос у *Holobacterium* є прикладом використання сонячного світла як джерела енергії у процесі активного транспорту (рис. 3.17). Певна ділянка плазмолемі ("пурпурна мембрана") бактерій *Holobacterium halobium* містить

білок *бактеріородопсин*, кожна молекула якого має поглинаючу світло простетичну (небілкову) групу, або хромофор (який називають *ретиналем*) (рис. 3.20).

Ця простетична група (подібна до вітаміну А та ідентична хромофору, виявленому в родопсині паличок сітківки ока у хребетних) ковалентно зв'язана з бічним ланцюгом лізину у специфічному білку. При активації світлом збуджений хромофор викликає конформаційні зміни в білку, у результаті чого два протони переносяться із внутрішньої поверхні клітини на зовнішню. Унаслідок такого перенесення у клітині виникає електрохімічний (протонний) градієнт, який забезпечує синтез АТФ за допомогою АТФсинтази плазматичної мембрани.

Родина АТФаз V-типу є структурно подібною до АТФаз Р-типу. Ці білки в нормі перекачують H^+ , не синтезуючи при цьому АТФ. Вони переносять протони у лізосоми, синаптичні пухирці та рослинні вакуолі для закиснення внутрішнього середовища їхніх компартментів.

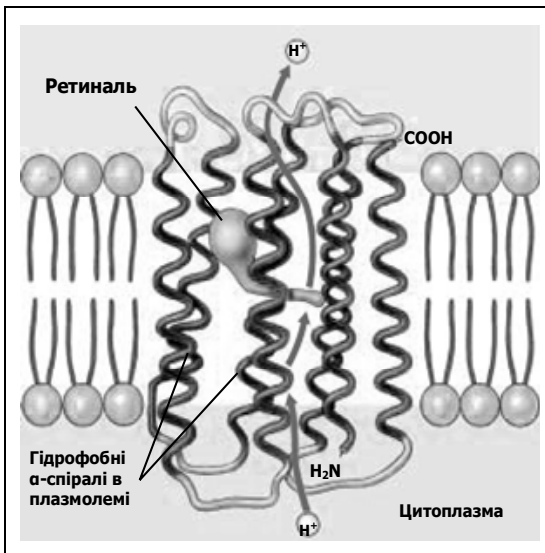


Рис. 3.20. Схема локалізації фотоактивуючого протонного насоса в мембрані *Holobacterium halobium* (за Равеном П., Джонсоном Г., Сінгером С. та ін., 2005)

АВС-переносники, використовуючи зв'язування й гідроліз АТФ, транспортують через мембрани в основному малі молекули (рис. 3.18). Цим вони й відрізняються від АТФаз Р-, F- і V-типів, які спеціалізуються на перенесенні іонів.

Кожний АВС білок зазвичай несе з цитоплазматичного боку мембрани два висококонсервативні АТФазні домени або "касети" (АТР-Binding "Cassette"), асоціацію (*димеризацію*) яких викликає зв'язування АТФ, а дисоціацію – гідроліз (рис. 3.21). Вважають, що такі структурні зміни цитоплазматичних доменів передаються на трансмембранні сегменти, унаслідок чого відбуваються подальші конформаційні зміни, за рахунок яких сайти зв'язування субстрату стають доступними спочатку по один бік мембрани, а потім по інший.

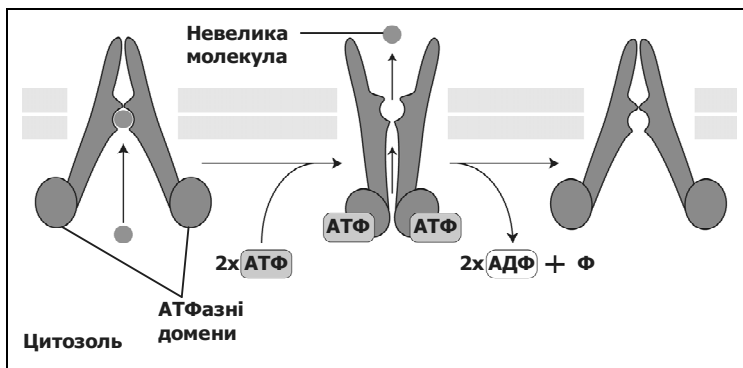


Рис. 3.21. Типовий АВС-транспортёр еукаріотів. Складається зазвичай із двох гідрофобних доменів (кожний із яких має шість трансмембранних сегментів, що формують шлях перенесення і визначають субстратну специфічність) і двох АТФазних доменів (АТФ-зв'язувальні "касети", які виступають у цитозоль)

АВС-переносники є найчисленнішою родиною мембранних транспортних білків, більшість яких працює в обох напрямках (як імпортери, так і експортери). Однак в еукаріотів майже всі вони експортують речовини зі цитозолу в позаклітинне середовище або в замкнені мембранні компартменти (скажімо, ендоплазматичну сітку або мітохондрії).

Принципово іншим підходом у розв'язанні проблеми енергозабезпечення активного транспорту є спряження перенесення двох розчинених речовин, що дозволяє спряженим переносникам використовувати енергію електрохімічного градієнта однієї речовини (зазвичай іона) для перенесення іншої (рис. 3.17). У цьому разі вільна енергія, що вивільнюється при русі неорганічного іона за його електрохімічним градієнтом, слугує рушійною силою для переміщення другої речовини вже проти її градієнта. Цей принцип працює в обох напрямках: деякі спряжені транспортери працюють як симпорти, деякі як антипорти.

У випадку симпорту перша речовина дифундує (полегшена дифузія) за градієнтом своєї концентрації й "тягне" за собою другу сполуку. Прикладом такої транспортної "співдружності" може бути реабсорбція в каналцях нирок глюкози, яка проникає в епітеліальну клітину шляхом симпорту з іонами Na^+ (рис. 3.22). Зв'язування Na^+ і глюкози відбувається у різних сайтах, однак є кооперативним: зв'язування будь якого з лігандів викликає конформаційні перебудови білка-транспортера, які збільшують його спорідненість до другого ліганду. Крім того, якщо одна з речовин відсутня, то друга не може зв'язатися з транспортером (зв'язується або дві речовини, або жодної).

Оскільки концентрація Na^+ у позаклітинному середовищі значно більша за таку в цитозолі, то глюкоза з більшою ймовірністю буде зв'язуватися з транспортером саме там. А отже, Na^+ і глюкоза входять у клітину значно частіше, ніж виходять із неї.

Кожний Na^+ -залежний симпорт специфічний стосовно "хімічного попутника" Na^+ . При цьому розчинена речовина (наприклад, цукор або амінокислота) та іон завжди зв'язуються з різними сайтами на транспортері.

Оскільки Na^+ надходить у клітину за електрохімічним градієнтом, "попутник", до певної міри, "затягуються" разом із ним. Чим більшим є електрохімічний градієнт Na^+ , тим вищою є швидкість надходження другої речовини, і навпаки, якщо концентрація Na^+ у позаклітинному середовищі падає, то транспорт розчиненої речовини знижується.

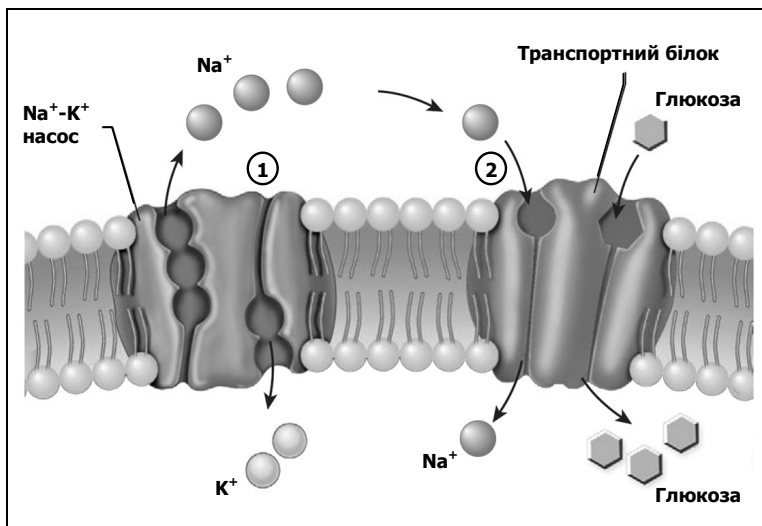


Рис. 3.22. Активний транспорт шляхом: 1 – антипорту (Na^+/K^+ -насос, первинно-активний транспорт), 2 – симпорту (котранспорт Na^+ і глюкози, вторинно-активний транспорт)
(за Сілі Р., Ван Путте Ц., Реганом Дж. та ін., 2014)

У плазматичній мембрані тваринних клітин Na^+ зазвичай слугує котранспортним іоном, електрохімічний градієнт якого створює значну рушійну силу для активного транспорту певної (другої) молекули. Na^+ , який надійшов у клітину шляхом полегшеної дифузії, потім відкачується назовні АТФ-залежним Na^+/K^+ -насосом (його роботу розглянуто вище), який непрямо сприяє спряженому транспорту, підтримуючи градієнт Na^+ (рис. 3.22). Тому вважають, що іон-залежні переносники здійснюють **вторинно активний транспорт**, тоді як АТФ-залежні – **первинно активний** (рис. 3.22).

У випадку антипорту речовини переносяться транслоказою у протилежних напрямках. Так, майже всі клітини хребтних мають у складі своєї плазмолемі **Na^+/H^+ -обмінник**, який відіграє ключову роль у підтриманні внутрішньоклітинного рівня рН (як правило, на рівні 7,1–7,2). Він забезпечує спряження вивільнення в позаклітинне середовище шляхом поле-

гшеної дифузії іонів H^+ (видаляється надлишок H^+ , утворених у результаті клітинних реакцій окиснення) з енергетично емним (активним) транспортом іонів Na^+ до внутрішньоклітинного середовища.

Робота Na^+/H^+ -обмінника регулюється рівнем рН: при його зростанні він інактивується, при зниженні – активність обмінника збільшується.

ВЕЗИКУЛЯРНИЙ ТРАНСПОРТ

Усі клітини мають живитися, взаємодіяти з довкіллям і швидко реагувати на його зміни. З цією метою клітини безперервно модифікують склад своєї плазматичної мембрани у відповідь на сигнали ззовні. Вони використовують складну систему внутрішніх мембран для "додавання" або "видалення" розташованих на поверхні клітин мембранних білків – рецепторів, іонних каналів і переносників.

У процесі **екзоцитозу** новосинтезовані білки, вуглеводи й ліпіди по так званому *біосинтетичному секреторному шляху* направляються у плазматичну мембрану або (залежно від свого "призначення") у позаклітинне середовище. У зворотному процесі **ендоцитозу** клітини видаляють компоненти плазматичної мембрани і транспортують їх у внутрішньоклітинні компартменти (формуючи так звані *ендосоми*), звідки вони або повертаються назад у плазмолему або направляються в лізосоми для деградації. Клітини також використовують ендоцитоз для захоплення різних поживних речовин (вітамінів, ліпідів, холестеролу, заліза тощо), які переносяться у клітину разом із макромолекулами, із якими вони пов'язані, а потім вивільнюються в ендосомах або лізосомах і транспортуються у цитозоль, де беруть участь у різних біосинтетичних процесах.

Внутрішній простір (*люмен*) кожного замкнутого мембранного компартменту, який бере участь у біосинтетичному секреторному (екзоцитозному) та ендоцитозному шляхах, є топологічно еквівалентним позаклітинному середовищу. Білки здатні "подорожувати" цим шляхом, переходячи з компартменту в компарт-

мент у складі численних замкнених мембранних *пухирців* (*транспортних везикул*). Такий мембранний рух відбувається за впорядкованими, "направленими маршрутами", що дозволяє клітині ефективно секретувати, житися й перебудовувати плазматичну мембрану.

У процесі ендоцитозу клітини здатні поглинати макромолекули і, у деяких випадках, навіть цілі клітини. У ході такого процесу речовина, що поглинається, поступово оточується невеликою ділянкою плазматичної мембрани, яка спочатку вигинається, а потім відшнуровується з утворенням *ендоцитозного пухирця*, який містить поглинуту речовину або частку. Розрізняють два основні види ендоцитозу залежно від розміру утворених ендоцитозних пухирців. При *фагоцитозі* (від грец. *фагос* – пожирати, і *цитос* – клітина) захоплюються великі частки у складі великих пухирців, які називають *фагосомами* (зазвичай розміром понад 250 нм у діаметрі). При *піноцитозі* (від грец. *пінос* – пити, і *цитос* – клітина) поглинаються рідини й розчинені речовини у складі маленьких *піноцитозних пухирців* (~100 нм у діаметрі).

Більшість еукаріотичних клітин безперервно поглинають рідини й розчинені в них речовини шляхом піноцитозу. Інша картина при фагоцитозі. У найпростіших він є одним із способів живлення: великі частки, захоплені при фагоцитозі, врешті-решт опиняються в лізосомах, а продукти наступного процесу "травлення" виводяться в цитозоль і використовуються як "їжа". Однак у багатоклітинних організмах лише деякі клітини здатні ефективно поглинати такі великі частки (у кишечнику тварин такі частки їжі розщеплюються за рахунок позаклітинних процесів, і клітини імпортують уже невеликі за розміром продукти гідролізу). А отже, призначення фагоцитозу в більшості клітин тварин полягає не в живленні, і відбувається він переважно у спеціалізованих клітинах – *професійних фагоцитах* (*макрофагах* і *нейтрофілах*), які походять із гемопоетичних стовбурових клітин і поглинають мікроорганізми, що потрапили в організм (захищаючи його від інфекції). Макрофаги також відіграють важливу роль у видаленні старих клітин і клітин, які загинули в результаті апоптозу (детальніше див. у розд. 13).

Якщо піноцитозні пухирці невеликі й однорідні за розміром і формою, то діаметр фагосом визначається розміром поглинутої частки (вони можуть бути практично одного розміру з фагоцитом).

Перед фагоцитозом частки мають зв'язатися із зовнішньою мембраною фагоцита. Беручи до уваги той факт, що фагоцитоз є поглинанням вибіркоким (не всі частки фагоцитуються), легко зрозуміти, що плазмолема фагоцита повинна мати численні рецептори, функціонально пов'язані з "фагоцитувальним апаратом" клітини. А отже, для здійснення фагоцитозу необхідна активація рецепторів, які передають сигнали всередину клітини й запускають відповідь (рис. 3.23). Зауважимо, що макрофаги здатні фагоцитувати також різноманітні частки нетваринного походження, скажімо, скло або латексні кульки, однак при цьому вони не фагоцитують живі (нормальні) тваринні клітини. Вважається, що останні несуть на своїй поверхні сигнал "не їж мене" у формі поверхневих білків, які зв'язуються з гальмівними рецепторами на плазмолемі макрофагів, локально інгібуючи процес фагоцитозу.

Піноцитоз, на відміну від фагоцитозу, є конститутивним процесом, він відбувається постійно, незалежно від клітинних потреб. Практично всі еукаріотичні клітини безперервно поглинають ділянки своєї плазматичної мембрани у формі маленьких піноцитозних (ендоцитозних) пухирців, які потім повертаються на поверхню клітини. Швидкість інтерналізації плазмолемі при цьому є надзвичайно високою. Оскільки площа поверхні клітини та її об'єм залишаються незмінними, очевидно, що мембрана, яка видаляється при ендоцитозі, у тому самому об'ємі "добавляється" до поверхні клітини в результаті протилежно направлено-го процесу *екзоцитозу*. У цьому сенсі ендо- і екзоцитоз є взаємопов'язаними процесами, які разом становлять *ендоцитозно-екзоцитозний цикл*. Особливо великий ступінь спряження між цими двома процесами властивий спеціалізованим структурам з високим "оборотом" мембрани, наприклад, нейронним синапсам (детальніше це питання розглянуто у розділі "Загальні принципи міжклітинних взаємодій").

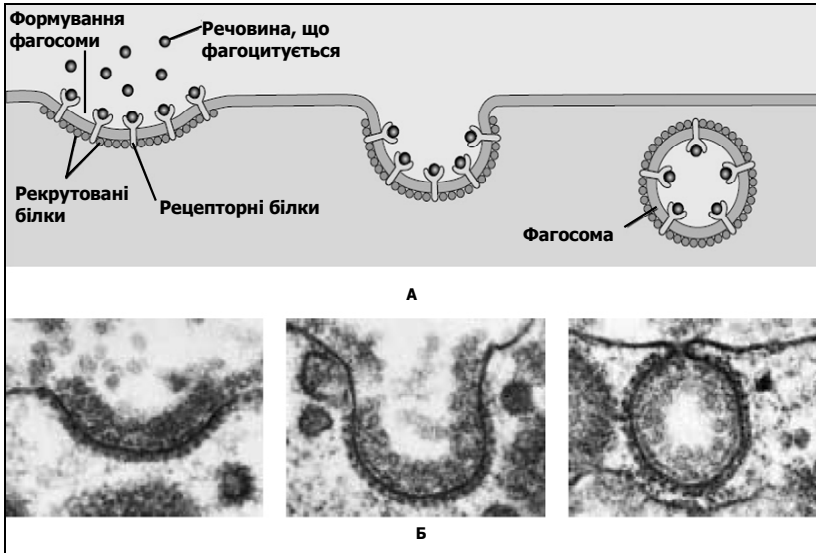


Рис. 3.23. Фагоцитоз: А – схема;
 Б – електроннограма (×80000)
 (за Равеном П., Джонсоном Г., Сінгером С. та ін., 2005)

Отже, у процесі екзоцитозу здійснюється відновлення та/або "оновлення" плазматичної мембрани, але це далеко не все, чим екзоцитоз може "послугуватися" клітині. У ході цього процесу клітини синтезують і секретують більшість протеогліканів і глікопротеїнів міжклітинної речовини (фактично створюючи "середовище свого існування"). Цей *конститутивний секреторний шлях*, необхідний усім клітинам, працює безперервно. Однак у спеціалізованих секреторних клітин існує і другий секреторний шлях, при якому розчинені білки та інші сполуки спочатку зберігаються в *секреторних пухирцях*, вивільнюючись через певний проміжок часу, і лише після специфічної стимуляції (рис. 3.24). Такий *регульований секреторний шлях* зустрічається, як правило, у клітинах, які спеціалізуються на швидкій секреції необхідних у даний момент продуктів – гормонів, нейромедіаторів або травних ферментів тощо.

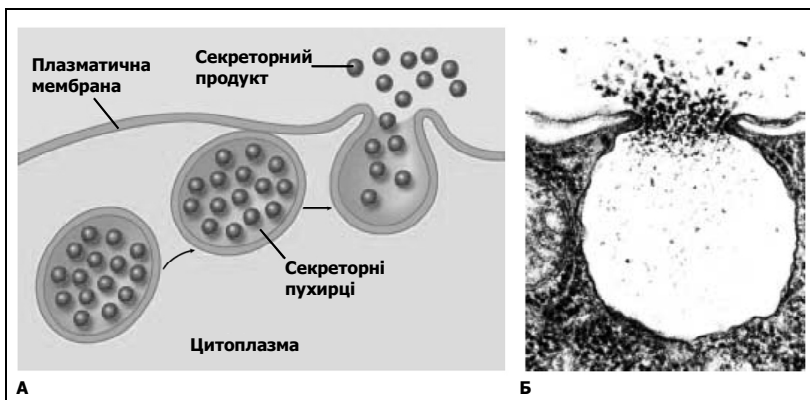


Рис. 3.24. Екзоцитоз. А – загальна схема екзоцитозу;
 Б – електронна фотографія, що ілюструє процес екзоцитозу
 (за Равеном П., Джонсоном Г., Сінгером С. та ін., 2005)

Коли секреторний пухирець зливається з плазматичною мембраною (вивільнюючи назовні свій вміст), то його мембрана стає частиною останньої. Описаний процес мав би значно збільшувати площу плазмолемі, однак це відбувається лише тимчасово, оскільки мембранні компоненти видаляються з поверхні шляхом ендоцитозу майже так само швидко, як і "додаються" екзоцитозом. Цей процес схожий на згаданий вище ендоекзоцитозний цикл.

Отже, регуляція везикулярного мембранного транспорту грає важливу роль у підтриманні постійності складу плазмолемі, як і інших мембран клітини.

ПАТОЛОГІЯ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ

Нині вже не викликає сумніву той факт, що будь-який патологічний процес починається на рівні ультраструктури клітин (на субклітинному рівні). Оскільки в більшості випадків вплив будь-якого хвороботворного чинника супроводжується

"рецепцією патогенної інформації" на клітинній мембрані, то структурні зміни в плазмолемі виникають раніше за інші пошкодження клітини.

Причинами пошкодження плазматичної мембрани клітин (рівно як і їхніх внутрішніх мембран) можуть бути:

- Дія фізичних та хімічних факторів (висока і низька температура, хімічні речовини тощо);
- Утворення вільних радикалів – нестабільних часток з непарним числом e^- на зовнішній електронній оболонці, які містять активований кисень (наявність неспареного e^- значно збільшує їхню реакційну здатність). До них належать супероксид (O_2^*), гідроксил (OH^*), пергідроксил (OH_2^*), пероксид водню (H_2O_2) та CCl_3^* -радикал;
- Активація системи комплементу (системи плазматичних білків (C1–C9), що становлять приблизно 10 % глобулінів крові), яка відбувається у разі потрапляння в організм бактерій, вірусів, деяких токсинів або при утворенні модифікованих клітин. Активація комплементу (важливий компонент імунної відповіді, який включає етапи ініціації, ампліфікації (посилення) і клітинної атаки) може спричинювати формування трансмембранного каналу (діаметром до 10 нм) і загибель клітин, розпізнаних як "чужі";
- Лізис ферментами. Наприклад, панкреатичні ліпази (з надлишком виділяються при гострому панкреатиті) і ферменти, які синтезуються *Clostridium perfringens* (один із збудників газової гангрені), викликають руйнування клітинних мембран, що спричинює некробіоз та ферментну аутоагресію з подальшим розвитком некрозу;
- Вірусна інтервенція, яка здатна викликати лізис мембрани клітини. Віруси можуть діяти й опосередковано – через імунну відповідь на вірусні антигени, розташовані на поверхні інфікованих клітин.

Сьогодні до патологій клітинних мембран відносять цілу низку пошкоджень, пов'язаних зі структурними змінами поверхнього апарату клітини і безпосередньо плазмолемі, які можна виявити підчас морфологічних досліджень. Крім того, окремо

виділяють функціональні патології клітинної мембрани, які проявляються у зміні певної функції плазмолемми, зокрема в порушенні мембранного транспорту, біогенезу мембран, зміні мембранної проникності, "пошкодженнях" у системах міжклітинних контактів, клітинної комунікації та "впізнання".

СТРУКТУРНІ ПАТОЛОГІЇ ПЛАЗМОЛЕМИ

Порушення, які відносять до цього типу мембранних патологій, пов'язані зі змінами нормальної будови плазмолемми, зокрема її конфігурації та товщини. За норми в електронному мікроскопі плазмолема клітин має вигляд тонкої тришарової структури, яка складається із двох темних щільних шарів, розділених внутрішнім, менш щільним, світлим шаром.

За патологічних умов розрізняють наступні зміни плазматичних мембран.

- *Надмірне везикулоутворення (посилений ендоцитоз, або "мінус-мембрана")*. Ця патологія викликана суттєвим збільшенням проникності плазматичної мембрани, у першу чергу для води та різних електролітів, що приводить до дефіциту її поверхні (тому й "мінус-мембрана") і набряку клітини. У таких випадках під плазмолемою виявляються скупчення мікроевезикул. При подальшому зростанні набряку повністю вичерпується "резерв" плазматичної мембрани, порушується її цілісність, провокується масова загибель органел клітини, що закінчується врешті-решт некрозом клітини.
- *Збільшення поверхні плазмолемми ("плюс-мембрана")*. За цієї патології загальна площа плазмолемми зростає в результаті її розтягнення та збільшення за рахунок мембран мікроевезикулоцитозних везикул, що і є ознакою різкого набухання клітини.
- *Мікроклазмацитоз і клазмацитоз* є відокремленням оточеної по периметру плазматичною мембраною частини цитоплазми з подальшим її розпадом і наступною реутилізацією в позаклітинному середовищі. При клазмацитозі (уперше описаний Л.-А. Ранв'є в 1890 р.), утворюються вирости клі-

тинної поверхні, що відриваються від клітини разом із пошкодженими фрагментами внутрішньоклітинних структур. До посилення мікро- і клазмацитозу приводять різні за характером впливи на клітину: гіпоксія, дія антигенів, імунних комплексів тощо. Денатуровані ділянки цитоплазми, відокремлені від клітини в результаті мікроклазмацитозу, можуть індукувати утворення антитіл, тобто ставати аутоантигенами.

- *Формування клітинними мембранами складок, цитоплазматичних відростків, інвагінацій та пухирців*, які за нормальних умов не є характерними для цих клітин.
- *Потовщення компонентів плазмолемі*. Даний процес є результатом зменшення концентрації іонів Ca^{2+} у міжклітинній речовині та порушення Na^+ - K^+ обміну, унаслідок чого в клітині порушується водно-електролітна рівновага й відбувається накопичення рідини. Іншою причиною може бути надмірне зменшення фосфоліпідів у складі мембрани в результаті активної дії фосфоліпаз, що активуються під впливом різних патологічних чинників.
- *Утворення у плазмолемі широких мікропор*. За норми ширина мікропор не перевищує 0,4–0,6 нм, тоді як при пошкодженні у клітині вони можуть досягати 9 нм, що приводить до набухання клітини та її перерозтягання, а в подальшому – до розриву плазматичної мембрани.
- *Локальні пошкодження плазматичної мембрани*. Розмір таких розривів у плазмолемі може досягати 1 мкм. Їхнє утворення пов'язане як із лізисом мембран, так і з пошкодженням фосфоліпідів у результаті дії фосфоліпаз або продуктів перекисного окиснення ліпідів.
- *Формування мієліноподібних структур*. Таке формування є відповіддю клітини на аноксію, реакцію антиген-антитіло чи на дію певних інгібіторів метаболізму. Утворення мієліноподібних структур може відбуватися в результаті стимуляції перекисного окиснення ліпідів мембран і здійснюватися за участю "звільнених" фосфоліпідів (шляхом скручування подовжених цитоплазматичних відростків або мікротрубочок).

- *Зміни рухливості мембран і форми клітин.* Розрізняють два типи змін, пов'язаних із порушенням рухливості мембран: утворення випинання мембрани назовні – *екзотропія* і випинання всередину цитоплазми – *езотропія*. У першому випадку утворюється оточене мембраною структурне випинання в позаклітинний простір, у другому – з'являється оточена мембраною порожнина.
- *Зміни форми клітин пов'язані зі спрощенням клітинної поверхні.* Це може бути, наприклад, втрата малих відростків подоцитами внутрішнього листка капсули клубочка нирок при нефротичному синдромі, деформація чи атрофія спеціалізованих структур на апікальній поверхні клітин (останнє, зокрема, стосується мікроворсинок ентероцитів одношарового епітелію при хворобах тонкої кишки).

ФУНКЦІОНАЛЬНІ ПАТОЛОГІЇ ПЛАЗМОЛЕМИ

Клітинні дистрофії. Доведено, що пошкодження поверхневого апарату клітини викликає зміну проникності й розлад мембранного транспорту: концентрації інтра- та екстрацелюлярних іонів Na^+ і K^+ вирівнюються, у клітину проникають різні низькомолекулярні аніони, а потім і катіони, підвищується вміст води й різко зростає внутрішньоклітинний осмотичний тиск. Структурним проявом порушення водно-електролітного обміну є значний набряк усієї клітини.

Порушення мембранного транспорту може привести також до вибіркового проникнення у клітини деяких продуктів обміну (білків, ліпідів, вуглеводів тощо) з їхнім подальшим накопиченням у цитозолі. Унаслідок такого процесу, що має назву *інфільтрація*, розвиваються *клітинні дистрофії інфільтраційного генезу* (жирова дистрофія гепатоцитів при гіперліпідеміях; гіаліново-крапельна дистрофія нефроцитів при нефротичному синдромі тощо). При значному пошкодженні плазмолемі і проникненні в клітину патогенних речовин, зокрема токсичних або біологічно активних, стає можливою деструкція структурних

компонентів клітини з вивільненням наявних у їхніх люменах речовин. Останні також можуть накопичуватись у клітині, обумовлюючи розвиток *клітинної дистрофії декомпозиційного генезу* (жирова дистрофія міокарда при дифтерії, гідропічна дистрофія гепатоцитів при вірусному гепатиті тощо). Отже, інфільтраційний механізм при розвитку клітинних дистрофій може змінюватися декомпозиційним.

В окремих випадках при пошкодженні плазмолемі до цитозолу потрапляють речовини, які порушують синтез тих чи інших речовин, унаслідок чого також виникають різні види клітинних дистрофій. Слід відзначити, що при масивних пошкодженнях зовнішньої мембрани може настати *некроз клітини* (змертвіння, загибель клітин та тканин у живому організмі; детальніший розгляд див. у розд. 13).

Як правило, більшість клітинних пошкоджень на ультраструктурному рівні є оборотними: цілісність пошкоджених структур може бути повністю відновлена (це стосується і будови поверхневого апарату клітини, і її органел).

Зміна проникності мембран. Проникність мембран залежить насамперед від цілісності поверхневого апарату клітини. Її зміни можуть бути важкими (необоротними) або незначними (оборотними). Найбільш вивченими змінами мембранної проникності є виниклі при пошкодженні важкими металами (ртуть, уран тощо) та їхніми солями. При взаємодії із сульфгідрильними групами мембранних білків важкі метали змінюють конформацію останніх і різко збільшують проникність мембран для іонів Na^+ , K^+ , H^+ , Ca^{2+} і Mg^{2+} , що приводить до швидкого набряку клітин, розпаду їхнього цитоскелета та альтерації (пошкодження) клітинних органел. Подібні процеси спостерігаються, наприклад, при пошкодженні мембран білками системи комплементу при "хворобах гіперчутливості". У мембранах виникають "проломи", що знижує їхній опір і різко збільшує проникність для води та різних іонів. Останнє, у свою чергу, приводить до порушень транспортних функцій плазмолемі.

Порушення транспортних функцій. У людини порушення транспортних функцій клітин спричиняє розвиток більш ніж два-

дцяти так званих "транспортних" хвороб. Це ниркова глюкозурія при цукровому діабеті (підвищене виведення із сечею глюкози (у здоровій людини глюкоза майже відсутня в сечі, норма становить приблизно 1 г)), порушення всмоктування глюкози, вітаміну В₁₂, цистинурія (порушення транспорту певних амінокислот у нирках і ШКТ при спадкових захворюваннях) тощо.

Порушення мембранного транспорту, що приводять до патології клітини, добре вивчені при ішемії (цю патологію ще називають недокрів'ям, або місцевою анемією), за якої зменшується кровопостачання через недостатній приплив крові, що може закінчитись інфарктом і гангrenoю. При ішемії створюється порочне коло, тобто ситуація, коли одне порушення спричинює інше, яке, у свою чергу, посилює перше, і так далі. За браком кисню клітина починає відчувати нестачу АТФ і може потрапити в таке порочне коло. Перший наслідок енергетичного голоду – вимикання насосів, що викачують із клітини іони Ca²⁺ (а також Na⁺), і, як результат, зростання їхньої концентрації в клітині. Це приводить до активації мембранних фосфоліпаз, що супроводжується збільшенням іонної проникності мембран мітохондрій і може привести до їхнього набряку з повною втратою синтезу АТФ.

У подальшому ішемічне пошкодження мітохондрій стає тотальним і необоротним (зауважимо, що при цьому також виникають порушення лізосомальних мембран зі звільненням гідролаз). Воно викликає порушення роботи Na⁺/K⁺-насоса, поступове накопичення у клітині іонів Na⁺ і втрату нею іонів K⁺, а також надходження води. Далі відбуваються необоротні зміни у клітині тотального характеру: розходження клітинних стиків, поглинання Ca²⁺ мітохондріями, зміни в організації мікротрубочок і мікрофіламентів цитоскелета, подальша активація фосфоліпаз. Унаслідок накопичення води та іонів ендоплазматичною сіткою розширюються її каналці та цистерни, виникає гідропічна дистрофія. Водночас посилюється гліколіз, що супроводжується виснаженням глікогену, накопиченням лактату і зниженням клітинного рН. Із цими змінами пов'язане порушення структури хроматину і зменшення синтезу РНК.

Запитання для самоперевірки

1. Який хімічний склад біологічних мембран?
2. Опишіть загальний принцип організації біологічних мембран.
3. У чому полягає суть визначення мембрани як рідинно-мозаїчної системи?
4. Назвіть функції біологічних мембран.
5. Які особливості хімічного складу плазмолем?
6. Чим відрізняється плазмолема від ендоплазматичних мембран?
7. Назвіть основні функції плазмолем.
8. Дайте загальну характеристику мембранних ліпідів.
9. Охарактеризуйте найпоширеніші групи ліпідів мембран тваринних клітин.
10. Поясніть, чому фосfolіпіди є найпоширенішим класом мембранних ліпідів.
11. Охарактеризуйте роль холестеролу в підтриманні структурно-функціональної організації плазматичної мембрани.
12. На чому ґрунтується здатність ліпідів утворювати бішар?
13. Як залежить жорсткість мембрани від її хімічного складу?
14. Чим зумовлюється плинність мембрани? Дайте обґрунтоване пояснення.
15. Як зміняться властивості плазмолем при зміні в ній кількості фосfolіпідів, до складу яких входять ненасичені жирні кислоти? Чому?
16. Як зміняться властивості плазмолем в разі зміни в ній кількості холестеролу? Чому?
17. Чим зумовлена і яке біологічне значення має асиметрія ліпідного бішару?
18. Перерахуйте способи з'єднання білків з мембраною.
19. Чим відрізняються інтегральні й периферійні білки клітинних мембран?
20. Особливості розташування трансмембранних білків у мембрані та природа їхньої асиметрії.
21. Як виглядає плазматична мембрана на електроннограмі (збільшення $\times 20000$ і більше) при контрастуванні осміевою кислотою? Чим це зумовлено?
22. Що таке глікокалікс, де він розташований, чи є він обов'язковим компонентом усіх мембран, яка його хімічна природа?
23. Чому плазматичну мембрану клітини називають напівпроникною? Дайте обґрунтовану відповідь.
24. Перерахуйте іони, вміст яких у цитоплазмі в нормі більший, ніж у навколишньому середовищі й навпаки.
25. Чим відрізняється пасивний і активний транспорт через біологічні мембрани?

26. Дайте визначення поняттю електрохімічний градієнт. Охарактеризуйте його значення у процесах мембранного транспорту.
27. За допомогою чого здійснюється полегшена дифузія через клітинну мембрану?
28. Ззовні клітини містяться іони, концентрація яких більша у внутрішньому середовищі клітини. Чи можуть вони проникнути в клітину? Якщо можуть, то яким чином?
29. Дайте загальну характеристику структурно-функціональної організації білків-транспортерів.
30. Що таке уні-, сим- та антипорт?
31. Опишіть каналотворювальні білки та охарактеризуйте їхню участь у мембранному транспорті.
32. Що таке іонні канали?
33. Охарактеризуйте основні типи стимулів, які відкривають іонні канали.
34. Чи потрібна енергія для виконання функції іонними каналами? Відповідь обґрунтуйте.
35. Опишіть особливості структурно-функціональної організації іонних каналів на прикладі K^+ -каналу.
36. Чим забезпечується активний мембранний транспорт?
37. Яка відмінність між іонними каналами та іонними насосами?
38. Чи потрібна енергія для виконання функції іонними насосами? Відповідь обґрунтуйте.
39. Охарактеризуйте АТФ-залежні насоси та їхню участь у мембранному транспорті.
40. Які типи АТФ-залежних насосів ви знаєте? Чим вони відрізняються?
41. Опишіть особливості структурно-функціональної організації АТФ-залежних насосів Р-типу, F (та V) типу та АВС-переносників.
42. Наведіть приклади використання як джерела енергії у процесі активного транспорту сонячного світла.
43. Опишіть принципи використання спряженими переносниками енергії електрохімічного градієнта для трансмембранного транспорту речовин.
44. Що таке первинно-активний і вторинно-активний мембранний транспорт?
45. Охарактеризуйте типи ендоцитозу та їхнє фізіологічне значення.
46. Яким чином до клітини можуть надходити макромолекули? Опишіть ці процеси.
47. Опишіть типи екзоцитозу та охарактеризуйте їхнє фізіологічне значення.
48. Охарактеризуйте можливі причини патологічних змін плазматичної мембрани.
49. Які типи патології мембран ви знаєте?

Рекомендована література

Загальна цитологія і гістологія : підручник / М. Е. Дзержинський, Н. В. Скрипник, Г. В. Островська та ін. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2010.

Клетки / под ред. Б. Льюина и др. ; пер. с англ. – М. : БИНОМ, Лаборатория знаний, 2011.

Cooper G. M. The cell: a molecular approach / G. M. Cooper. – N. Y., 2000.

Molecular Biology of the Cell / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis et al. – N. Y., 2013.

Molecular cell biology / H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky et al. – N. Y., 2002.

Molecular cell biology. / H. Lodish, A. Berk, A. Kaiser et al. – N. Y., 2013.

Biology / P. Raven, B. Johnson, K. Mason et al. – N. Y., 2014.

Розділ 4

ЗАГАЛЬНІ ПРИНЦИПИ МІЖКЛІТИННИХ ВЗАЄМОДІЙ

Термін "міжклітинні взаємодії" відносять до тих ситуацій, коли окрема клітина або група клітин тим чи іншим шляхом отримує вплив з боку інших клітин. За характером такі "впливи" можуть бути найрізноманітнішими, як і відповідь клітини на них. Так, клітини пилкової трубки рослин чітко розпізнають "свій" пилок, так само, як і тваринні клітини при трансплантації тканин чітко відрізняють "своє" та "прийшло". Подібний феномен розпізнавання лежить в основі процесів ембріонального диференціювання та органогенезу. Клітини ранніх зародків амфібій на своїй поверхні утворюють псевдоподії, намагаючись приєднатися до інших клітин. Фібробласти – витягнуті веретеноподібні клітини, що зустрічаються у сполучній тканині й мезенхімі, – формують тонкий шар цитоплазми, відомий під назвою ундулюючої мембрани. Саме за рахунок її формування фібробласти здатні "злипатися" один з одним, втрачаючи свою рухливість (так зване "*контактне гальмування*"). Навпаки, клітини нервового гребеня, із яких утворюються нервові ганглії та меланофори, "взаємовідшовхуються" завдяки продукованим ними хімічним речовинам, що спричинюють негативний хемотаксис.

Необхідно підкреслити, що тканина, орган, система органів будь-якого організму, як і сам він у цілому, є не просто сумою гістологічних елементів. Системи гістологічних елементів формуються, функціонують та оновлюються, і відбувається це лише за умови їхнього взаємовпізнання, контактування та інформаційних взаємодій, тобто численних процесів, які об'єднуються терміном *міжклітинні взаємодії*.

Клітина, сприймаючи різні сигнали, "трансформує" їх певним чином, відповідаючи тим самим на зміни середовища, що її оточує. Плазматична мембрана при цьому є місцем сприйняття подразників зовнішнього (стосовно клітини) середовища. Останні можуть бути різні за природою: *фізичні* (скажімо, кванти світла у фоторецепторах), *хімічні* (смакові молекули, рН тощо), *механічні* (наприклад, тиск, розтягнення у механорецепторах) або *сигнали інформативного характеру* (гормони та нейромедіатори) *із внутрішнього середовища організму*. За участю плазмолемі відбувається формування клітинної відповіді на отриманий сигнал. Як характер самої відповіді, так і процес її формування залежить від багатьох чинників: природи зовнішнього подразника, хімічної природи сигнальної молекули (у випадку сигналу інформативного характеру), типу сприймаючої клітини, її віку, фізіологічного стану тощо.

ЗАГАЛЬНА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЗАКЛІТИННОГО МАТРИКСУ

Будь-яка клітина багатоклітинного організму перебуває у специфічному "оточенні", структурно-морфологічні та хімічні особливості якого визначаються багатьма факторами. Але беручи до уваги той факт, що клітини всіх організмів подібні за своєю будовою, слушно припустити, що їхнє мікрооточення повинно мати спільні риси.

Практика біологічних досліджень підтвердила подібне припущення. Так, було з'ясовано, що *позаклітинний матрикс* (*тканинний матрикс, міжклітинна речовина*) складається з основної речовини й волокон (наприклад, *колагенових* або *еластичних*), що містяться в ній. Структури тканинного матриксу побудовані з молекул, які синтезуються самими клітинами й секретуються в позаклітинне середовище. Крім того, клітини сприяють їхньому упорядкуванню: орієнтація цитоскелета всередині клітин певним чином може контролювати "орієнтацію"

виробленого нею матриксу. У свою чергу, компоненти позаклітинного матриксу впливають на клітини (скажімо, контролюють їхню проліферацію та диференціацію).

Позаклітинний матрикс у тваринних тканинах, незалежно від їхнього типу, формують, за великим рахунком, макромолекули одних і тих самих класів. Проте варіації їхніх пропорцій, а також способи їхньої організації спричинюють різноманіття "кінцевого продукту" – специфічні фізичні властивості матриксу і, як наслідок, особливості його функціонування. Так, матриксом є тверда речовина кісток і зубів, прозора речовина рогівки ока, драглиста речовина медуз та твердий панцир жуків. Більш того, роль позаклітинного матриксу не зводиться до функції пасивного остова, що забезпечує фізичну підтримку. Він відіграє активну й складну роль у регуляції поведінки клітин, які з ним контактують, впливаючи на їхнє виживання, розвиток, міграцію, поділ, форму й функції.

Беручи до уваги зрозумілі обмеження (розмір даного підручника), розглянемо як модельну систему міжклітинну речовину сполучних тканин хребетних, у яких її об'єм зазвичай суттєво перевищує об'єм клітин, які вона оточує (що й визначає фізичні властивості тканин).

У більшості сполучних тканин макромолекули матриксу синтезуються переважно **фібробластами**. Проте в інших спеціалізованих тканинах, таких, наприклад, як кісткова і хрящова, цю функцію виконують інші, подібні до фібробластів, клітини – **остеобласти** і **хондробласти** відповідно.

Матрикс у сполучній тканині формують два головні класи макромолекул: полісахариди **глікозаміноглікани**, які зазвичай ковалентно з'єднуються з білком з утворенням **протеогліканів**, і **фібрилярні білки** різних класів, які суттєво відрізняються за формою й розміром (рис. 4.1). Молекули протеогліканів у сполучній тканині, як правило, утворюють сильно гідратовану гелеподібну "**основу речовину**", у яку занурені фібрилярні білки ("**волокнистий компонент**").

Полісахаридний гель забезпечує механічний опір тканини, одночасно дозволяючи поживним речовинам, метаболітам і гормонам швидко переходити із кров'яного русла у клітини тканини

і назад. Волокнистий компонент, у певному розумінні слова, "організовує" матрикс: так, колагенові волокна посилюють і упорядковують його, тоді як еластичні надають пружності. Крім того, численні білки матриксу допомагають клітинам досягти свого місця призначення, осісти в ньому і диференціюватися.

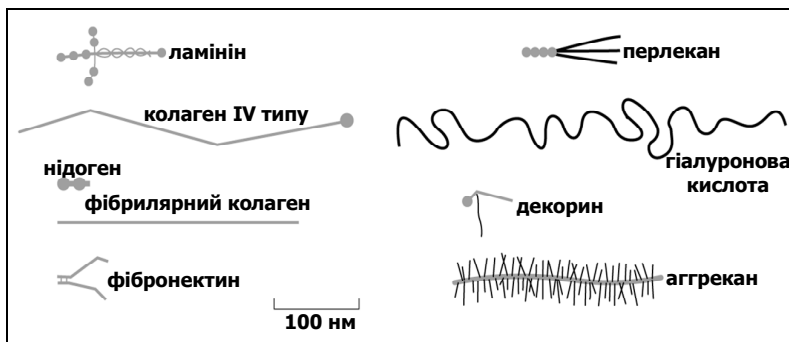


Рис. 4.1. Розміри й форма основних макромолекул позаклітинного матриксу
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2014)

ОСНОВНА РЕЧОВИНА

Глікозаміноглікани (ГАГ) є нерозгалуженими полісахаридними ланцюжками повторювальних дисахаридних залишків. Свою назву вони отримали тому, що одним із двох залишків у повторювальному дисахариді завжди є аміноцукор (*N*-ацетилглюкозамін або *N*-ацетилгалактозамін). У більшості випадків один із них сульфатований, а другий є уроновою кислотою (*г*люкуроновою або *і*дуроновою). Наявність у багатьох із вуглеводних залишків сульфатних або карбоксильних груп надає ГАГ великого від'ємного заряду (ГАГ є найбільш від'ємно зарядженими молекулами, які виробляються клітинами тварин) (рис. 4.2).

За типом вуглеводних залишків і зв'язків між ними, а також за кількістю і положенням сульфатних груп розрізняють 4 осно-

вні групи ГАГ: *гіалуронова кислота, хондроїтинсульфат і дерматансульфат, гепарансульфат, кератансульфат*.

Будучи достатньо жорсткими, на відміну, скажімо, від білків, полісахаридні ланцюги ГАГ не можуть згорнутися у компактну глобулу. Вони намагаються набути витягнутої конфомації, займаючи величезний для своєї маси об'єм, формуючи *гелі* навіть за дуже низької концентрації. Завдяки своїй здатності до гелеутворення, і незважаючи на те, що їхня кількість у сполучних тканинах не перевищує 10 % від вмісту фібрилярних білків, ланцюги ГАГ займають більшу частину позаклітинного простору. А за рахунок високої щільності від'ємних зарядів їхні молекули притягують велику кількість таких осмотично активних іонів, як Na^+ , що приводить до суттєвого насичення матриксу водою. Це створює тиск (*тургорний тиск*), що дозволяє матриксу протистояти стискувальним силам (на противагу колагеновим волокнам, які протидіють розтягненню). Тому ГАГ входять, наприклад, до складу хрящів більшості суглобів.

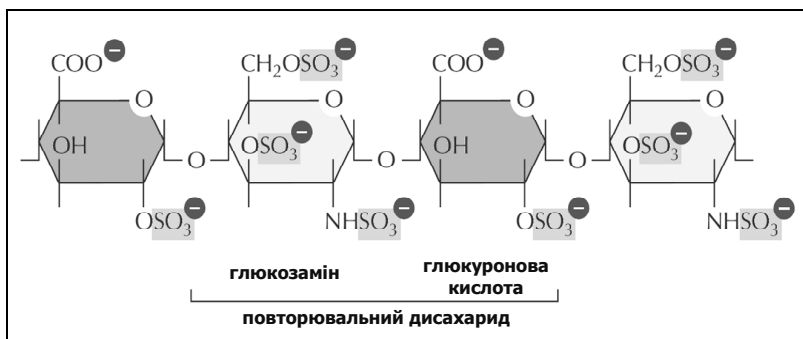


Рис. 4.2. Повторювана дисахаридна послідовність гепарансульфату
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2014)

Гіалуронова кислота (*гіалуронан, або гіалуронат*) є найпростішим ГАГ, виявленим у різній кількості в усіх тканинах і рідинах дорослих тварин. Однак найбільш широко вона представлена в ембріонах на ранніх стадіях розвитку.

На відміну від інших ГАГ, гіалуронат не містить сульфатованих моносахаридів, усі його дисахаридні залишки ідентичні й зазвичай не зв'язані ковалентно з білками. Крім того, якщо всі інші ГАГ синтезуються всередині клітини і вивільнюються назовні шляхом екзоцитозу, гіалуронан синтезується безпосередньо на поверхні клітини ферментним комплексом, локалізованим у плазмолемі.

Вважається, що гіалуронан забезпечує додатковий опір силам стискування у тканинах і суглобах, а під час ембріогенезу стимулює морфогенез (оскільки мала його кількість, "усмоктуючи" воду, здатна розширюватися й займати великий об'єм, він, як припускають, "заповнює простір").

За винятком гіалуронової кислоти, усі інші ГАГ ковалентно зв'язані з білками (такі білки називають *коровими*) у формі *протеогліканів*, які утворюються у більшості тваринних клітин.

Корові білки протеогліканів синтезуються на мембранах грЕПС, глікозилюються (глікозилювання є процесом додавання вуглеводних залишків) головним чином в апараті Гольджі, після чого вивільнюються шляхом екзоцитозу.

Протеоглікани зазвичай відрізняються від глікопротеїнів (про які згадувалося у попередньому розділі) природою, кількістю та розташуванням вуглеводних бічних ланцюгів. Глікопротеїни містять від 1 % до 60 % (зазвичай декілька відсотків) вуглеводів за масою у формі численних коротких розгалужених олігосахаридних ланцюгів, тоді як у протеогліканах масова частка вуглеводів (в основному у вигляді довгих нерозгалужених глікозаміногліканових ланцюгів) може становити 95 %. За визначенням, як мінімум один бічний ланцюг протеоглікану має бути обов'язково ГАГ.

Будова протеогліканів допускає майже необмежене різноманіття: як кількість, так і будова глікозаміногліканових ланцюгів, зв'язаних з одним і тим самим білком, може варіюватися у дуже широких межах. Більш того, повторювальна послідовність дисахаридів у кожному ланцюзі може складним чином модифікуватися при сульфатуванні. Не меншим є різноманіття й корових білків, хоча більшість із них і мають по-

дібні характерні домени, наприклад, LINK-домени, за участю яких вони приєднують глікозаміногліканові ланцюги.

За розміром протеоглікани також суттєво варіюють. Так, протеоглікан *агрекан* (основний компонент хряща) досягає маси 3×10^6 Да (містить понад 100 глікозаміногліканових ланцюгів), тоді як *декорин* (секретується фібробластами й у позаклітинному просторі зв'язується з колагеновими фібрилами, регулюючи їхнє збирання) має лише один глікозаміноглікановий ланцюг.

Різні ГАГ і протеоглікани в позаклітинному матриксі можуть збиратися у великі полімерні композити. Прикладом є молекули агрекану й гіалуронової кислоти, які формують у матриксі хряща комплекси розміром із бактерію (2×10^{-12} см³) (рис. 4.3).

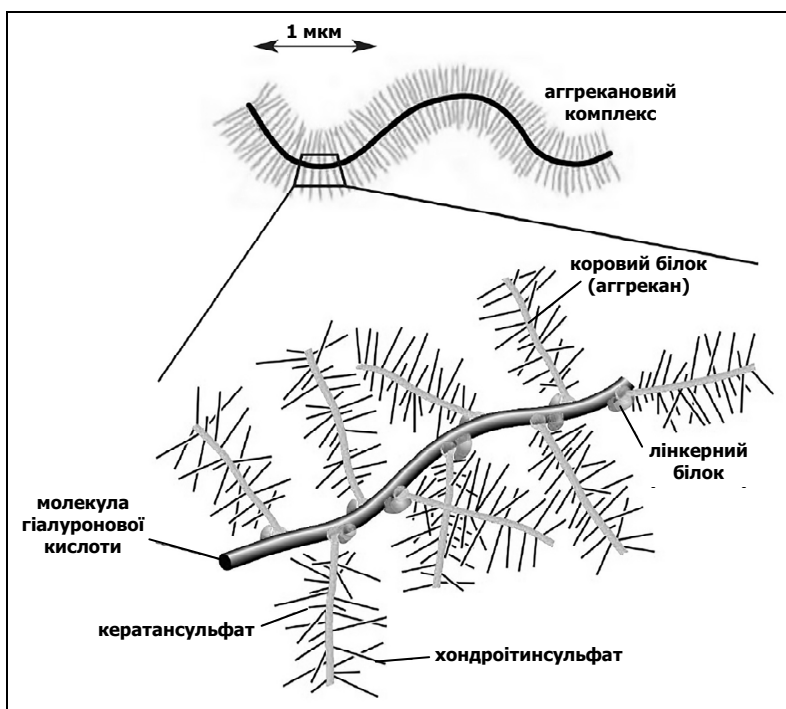


Рис. 4.3. Агрекановий комплекс з ембріонального хряща корови (за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2014, зі змінами)

Крім формування комплексів один з одним, ГАГ і протеоглікани можуть зв'язуватися з фібрилярними білками матриксу, скажімо, із колагеном, а також із білковими мережами, такими як базальна мембрана, з утворенням надзвичайно складних композитів.

Функції протеогліканів настільки ж різноманітні, як і їхня хімічна будова. Ланцюжки ГАГ, що входять до їхнього складу, можуть формувати гелі з різним розміром комірок і щільністю зарядів. Відповідно, вони можуть слугувати селективними фільтрами, які регулюють рух молекул (а також клітин) відповідно до їхнього розміру й заряду. Протеоглікани грають важливу роль у передачі хімічних сигналів від клітини до клітини. Зв'язуючи різні сигнальні молекули, наприклад деякі фактори росту, вони контролюють їхнє просування по матриксу, активність і час життя, сприяють або перешкоджають виконанню ними сигнальної функції. Так, при запальній реакції гепаранвмісні протеоглікани іммобілізують секретовані хемоатрактанти, так звані *хемокіни*, на ендотеліальній поверхні кровоносних судин, затримуючи їх у точці запалення. Це дозволяє хемокінам залишатися на місці тривалий час, стимулюючи перехід лейкоцитів із кров'яного руслу в запалену тканину.

Крім того, протеоглікани здатні зв'язуватися й з іншими секретованими білками, зокрема із протеолітичними ферментами (*протеазами*) та інгібіторами протеаз, і регулювати їхню активність (про що детальніше йтиметься нижче). У такий спосіб вони долучаються до процесів збирання і розбирання інших компонентів позаклітинного матриксу, включаючи колаген.

Слід підкреслити, що не всі протеоглікани вивільнюються у позаклітинний матрикс, деякі з них є інтегральними компонентами плазматичної мембрани, при цьому їхній білок може бути або "вмонтованим" у мембранний бішар, або прикріпленим до нього за допомогою *глікозилфосфатидилінозитольного (GPI) якоря*. Деякі з таких мембранних протеогліканів працюють як *корецептори*, діючи спільно зі звичайними рецепторними білками на поверхні клітин. Крім того, деякі звичайні рецептори мають один або декілька глікозаміногліканових ланцюгів і, відповідно, є протеогліканами.

ВОЛОКНИСТИЙ КОМПОНЕНТ

Колагени

Фібрилярні білки є не менш важливим компонентом позаклітинного матриксу, ніж протеоглікани. Серед них у першу чергу виділяють *колагени* – родину фібрилярних білків, представники якої виявлені в тканинах усіх багатоклітинних тварин. Колагени синтезуються у великій кількості клітинами сполучних тканин, а також іншими клітинами, хоча й не так інтенсивно. Вони є основним компонентом шкіри й кісток, тому у ссавців їх більше за інші білки (вони становлять 25 % маси всіх білків).

Молекули колагену характеризуються витягнутою, жорсткою структурою, утвореною трьома колагеновими поліпептидними ланцюгами (так званими *α -ланцюгами*), закрученими один навколо одного в потрійну спіраль (типу канату). Колагени дуже багаті *проліном* і *гліцином*: обидва ці амінокислотні залишки принципово важливі для утворення потрійної спіралі.

Геном людини містить 42 різні гени, які кодують різні колагенові *α -ланцюги* і які, залежно від тканини, експресуються у різних комбінаціях. При цьому, хоча з 42-ох *α -ланцюгів* теоретично можна побудувати тисячі варіантів різних триланцюгових колагенів, насправді реалізується обмежена кількість комбінацій. На сьогодні відомо менше 40 типів колагену, найпоширенішими (і найкраще вивченими) серед яких є:

- *колаген I типу* – найбільш поширений, є основним колагеном шкіри й кісток, належить до класу *фібрилярних*, або *фібрилоутворювальних колагенів*, має довгу безперервну (або перервну в декількох місцях) структуру, яка нагадує канат. У позаклітинному просторі його молекули формують полімери вищого порядку – *колагенові фібрили* (тонкі структури 10–300 нм у діаметрі, довжиною сотні мкм). Останні часто агрегують з утворенням ще більших, помітних у світловий мікроскоп пучків, схожих на трос (діаметром у декілька мм) – *колагенових волокон*;

- **колаген IV типу** – здатний до утворення мереж, формує основну частину базальних мембран;
- **колаген VII типу** – його молекули утворюють димери, які, збираючись разом, складаються у спеціалізовані структури – **якірні фібрили**, які прикріплюють базальну мембрану багат шарового епітелію до розташованої під ним сполучної тканини (тому часто зустрічається у шкірі);
- **колагени IX і XII типів** – називаються **колагенами**, **асоційованими з фібрилами**. Локалізовані на поверхні колагенових фібрил, зв'язуючи їх між собою та з іншими компонентами позаклітинного матриксу;
- **колаген XVII типу** – колагеноподібний білок, має трансмембранний домен. Виявлений у напівдесмосомах;
- **колаген XVIII типу** – є коровим білком протеогліканів у базальних мембранах.

Колаген синтезується у вигляді попередників (*проколагенів*, або *про- α -ланцюгів*, які підлягають значним післятрансляційним змінам) із коротким *N*-кінцевим *сигнальним пептидом*, що "направляє" їх до грЕПС і сприяє їхньому проникненню в її люмен (детальніше див. розд. 9). Крім того, на *N*- та *C*-кінцях проколагенів наявні **пропептиди** (20 і 30 кДа відповідно), які відщеплюються лише на останніх стадіях збирання колагену, уже після того, як його потрійні спіралі секретуються в позаклітинний простір. Після перенесення колагену в люмен грЕПС специфічні **гідроксилази** у присутності кофактора – аскорбінової кислоти (вітаміну С) гідроксильнують залишки проліну й лізіну з утворенням *гідроксипроліну* та *гідроксилізіну* (деякі з гідроксилізинів глікозилуються). Після цього між трьома про- α -ланцюгами утворюються водневі зв'язки й формується триланцюгова молекула **проколагену** (рис. 4.4, А).

Гідроксипроліни й гідроксилізини в інших тваринних білках зустрічаються рідко. Вважається, що в колагені гідроксильні групи цих амінокислотних залишків формують міжланцюгові водневі зв'язки, стабілізуючи в такий спосіб потрійну спіраль. Важливість гідроксилювання яскраво ілюструє наступний факт. При порушенні гідроксилювання проліну (що відбувається, наприклад, при нестачі вітаміну С) синтезуються дефектні про-

α -ланцюги, які нездатні формувати стійку потрійну спіраль (вона швидко деградує ще всередині клітини). А отже, синтез нових молекул колагену пригнічується.

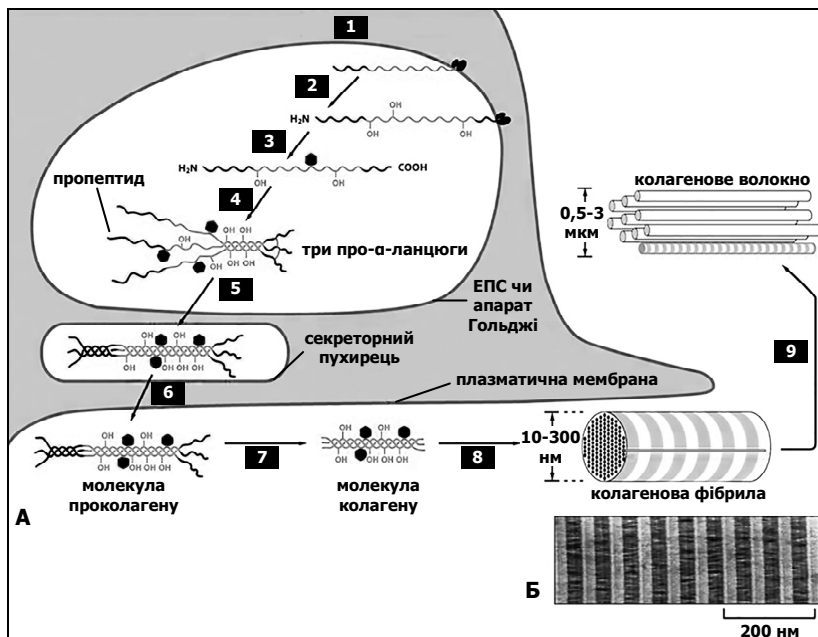


Рис. 4.4. Внутрішньо- та позаклітинні етапи формування колагенової фібрили: А – схема формування: 1 – синтез про- α -ланцюга, 2 – гідроксилування деяких пролінів і лізінів, 3 – глікозилювання деяких гідроксилізінів, 4 – самозбирання трьох про- α -ланцюгів, 5 – формування потрійної спіралі проколагену, 6 – секреція, 7 – відщеплення пропептидів, 8 – самозбирання фібрили, 9 – утворення колагенового волокна; Б – електронна мікрофотографія сформованої колагенової фібрили

(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2014)

У здорових тканинах розпад старого колагену й синтез нового відбувається постійно (частота такої "заміни", залежно від тканини, становить від декількох місяців до року). При неможливості заміни старого колагену (він поступово розпадається, а новий не синтезується) тканини починають його втрачати і, як наслідок, через декілька місяців стінки кровоносних судини стають крихки-

ми, розхитуються зуби, перестають заживати рани, що є ознаками *цинги* (хвороба, викликана нестачею вітаміну С в їжі).

Молекули проколагену накопичуються в секреторних гранулах і вивільняються у позаклітинний простір, після чого специфічні позаклітинні протеолітичні ферменти (*аміно- та карбоксипептидази*) відщеплюють N- і C-кінцеві пропептиди, і проколаген перетворюється на **зрілий колаген** (він розчиняється у тисячу разів гірше, ніж проколаген), триспіральні молекули якого збираються у **колагенові фібрили**.

Процес утворення колагенових фібрил обумовлений здатністю зрілого колагену до спонтанного об'єднання. Їхнє формування починається поблизу поверхні клітин, часто у глибоких складках плазмолем, утворених при злитті з нею секреторних пухирців. Цитоскелет периферійного шару клітини при цьому може впливати як на орієнтацію фібрил, що утворюються, так і на місце та швидкість їхнього формування.

В електронний мікроскоп колагенові фібрили мають посмугованість (рис. 4.4, Б) із періодом 67 нм, що відображає особливості упакування в них окремих молекул. По закінченні формування у позаклітинному просторі фібрили набувають значної міцності за рахунок утворення ковалентних поперечних зшивок (за їхньої відсутності міцність на розрив колагенових фібрил різко знижується, колагенвмісні тканини стають крихкими, шкіра, сухожилля, кровоносні судини легко пошкоджуються).

На відміну від ГАГ, які протистоять силам стискування, фібрили колагену формують структури, які здійснюють механічний супротив силам розтягування. У різних тканинах вони утворюються по-різному й мають неоднаковий діаметр. У шкірі ссавців вони розташовані у вигляді переплетень, тому чинять опір навантаженням в усіх напрямках, тоді як у сухожиллі вони зібрані в паралельні пучки, укладені вздовж головної осі напруги, а в кістковій тканині – шарами, причому фібрили кожного шару укладені паралельно одна до одної й майже під прямим кутом до фібрил сусідніх шарів.

Слід підкреслити, що самі клітини сполучної тканини визначають як розмір, так і розташування колагенових фібрил, регулюючи взаємне розташування молекул при збиранні фіб-

рил у позаклітинному матриксі поблизу плазмолемі. Крім того, вони можуть впливати на цей процес, продукуючи поряд із фібрилярними колагенами, макромолекули матриксу, зокрема фібрилярного білка *фібронектину*, секреція якого передуює утворенню колагенових фібрил і впливає на їхнє збирання (про що йтиметься нижче).

Вважається, що *колагени, асоційовані з фібрилами*, зокрема *колагени IX і XII типів*, особливо важливі в цьому плані. Беручи участь у взаємодії колагенових фібрил між собою (а також з іншими макромолекулами міжклітинної речовини) вони "допомагають їм обрати" спосіб їхньої організації в матриксі (рис. 4.5). Функціональна специфіка цих колагенів зумовлена особливістю їхньої структурної організації (яка суттєво відрізняється від такої фібрилярних колагенів).

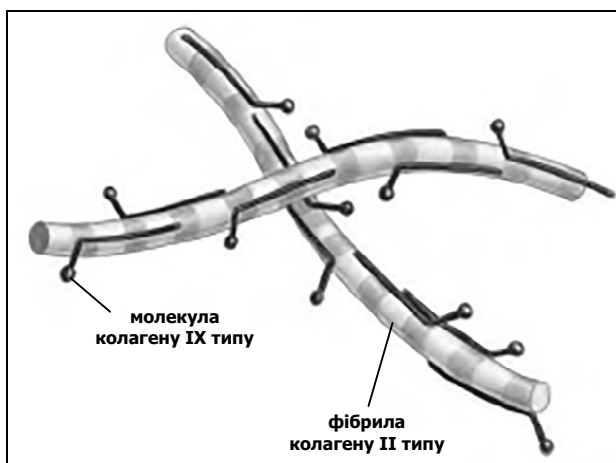


Рис. 4.5. Взаємодія колагенів IX типу з фібрилами, що складаються із колагенів II типу
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2014, зі змінами)

Еластин

Деякі тканинні угруповання хребетних (наприклад, шкіра, легені, кровоносні судини) мають бути не лише міцними, але й еластичними (здатними стискуватися після тимчасового розтягнення). Такої якості вони набувають завдяки мережі *еластич-*

них волокон позаклітинного матриксу (у яку вплетені довгі, нерозтяжні колагенові фібрили, які обмежують розтяжність усієї мережі, запобігаючи тим самим розриву тканин).

Основним компонентом еластичних волокон є **еластин** – достатньо гідрофобний білок, довжиною ~750 амінокислотних залишків, який, подібно до колагену, надзвичайно збагачений проліном і гліцином (однак, на відміну від нього, він не глікозильований, містить невелику кількість гідроксипроліну і в ньому зовсім відсутній гідроксилізін).

Досі не зовсім зрозуміло, якої конфігурації набувають молекули еластину в еластичному волокні та як структура останнього співвідноситься із його пружними властивостями. Вважається, що частина поліпептидного ланцюга еластину набуває вільної конформації "випадкового клубка", і що саме це дозволяє молекулам, зшитим у єдину еластичну мережу, розтягуватися й повертатися у вихідний стан (рис. 4.6).

Еластичні волокна складаються не лише з еластину: їхня серцевина (утворена еластином) оточена чохлом із *мікрофібрил* (кожна з них має діаметр ~10 нм), до складу яких входять декілька різних глікопротеїнів, включаючи *фібрилін* (великий за розміром і дуже важливий для підтримання цілісності еластичного волокна глікопротеїн, який зв'язується з еластином).

Фібронектин

До складу позаклітинного матриксу, крім колагену й еластину, входить цілий ряд важливих для його нормального функціонування білків, які інколи об'єднують в один клас за певними спільними ознаками. Такі білки:

- мають мультидоменну структуру;
- кожний їхній домен має специфічний сайт зв'язування з іншими макромолекулами матриксу і з рецепторами на поверхні клітин;
- сприяють як організації матриксу, так і прикріпленню до його елементів поверхонь клітин;
- як і протеоглікани, направляють рух клітин у тканинах, що розвиваються;
- формують шляхи, уздовж яких можуть мігрувати клітини;

– у деяких випадках слугують перепорою на шляху просування клітин до "заборонених ділянок".

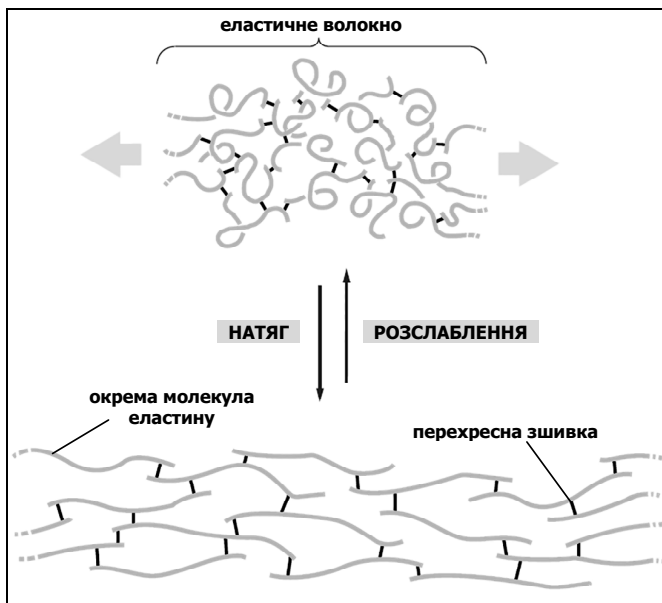


Рис. 4.6. Модель, яка пояснює пружні властивості еластичного волокна. Схема
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2014)

Першим із цього класу білків був охарактеризований *фібронектин*, наявний у всіх хребетних великий глікопротеїн, який відіграє важливу роль у взаємодіях клітин із позаклітинним матриксом. Важливість фібронектину яскраво ілюструє той факт, що мутантні миші, неспроможні його виробляти, гинуть на ранніх стадіях ембріогенезу, бо їхні ендотеліальні клітини нездатні сформувати нормальні кровоносні судини (порушується взаємодія ендотеліоцитів з оточуючим їх позаклітинним матриксом, який у нормі має містити фібронектин).

Фібронектин складається із двох дуже великих (схожих, проте, як правило, не ідентичних) субодиниць, з'єднаних поблизу С-кінця двома дисульфідними містками. Кожна субодиниця

утворена 5–6 функціонально різними згорнутими доменами, з'єднаними гнучкими поліпептидними сегментами (рис. 4.7).

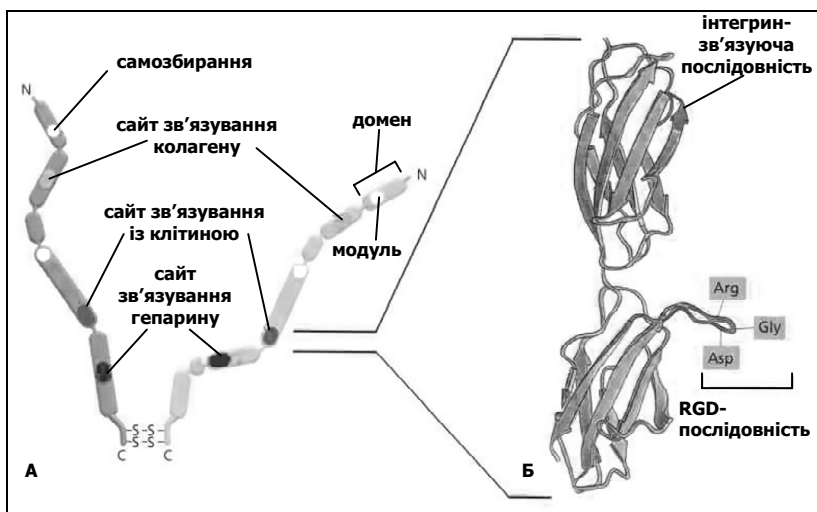


Рис. 4.7. Структура димеру фібронектину:

А – два подібні але не ідентичні ланцюги, з'єднані дисульфідними містками (показані не всі відомі сайти зв'язування), Б – тривимірна структура двох різних фібронектинових повторів III типу, визначена кристалографічним методом - (за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2014, зі змінами)

Домен, у свою чергу, складаються з менших модулів, кожний із яких періодично повторюється і містить сайти зв'язування як з мембранними білками (скажімо, *інтегринами*), так і з макромолекулами позаклітинного матриксу.

Фібронектин може існувати не лише у вигляді нерозчинних фібрил у складі позаклітинного матриксу, але й у розчинній формі, циркулюючи у крові й інших рідинах організму. При цьому його молекули утворюють фібрили виключно на поверхні клітин (на відміну від молекул фібрилярного колагену, які можуть збиратися у фібрили у пробірці) і лише там, де наявні відповідні фібронектин-зв'язувальні білки, такі, як, наприклад, згадані нами *інтегрини*. Останні зв'язують фібронектин, локалізований у позаклітинному матриксі, із внутрішнім актиновим цитоскелетом клітини (про ще детально йтиметься нижче).

Такий зв'язок передає натягнення молекулам фібронектину (вважається, що вони прикріплені до якоїсь структури в матриці), розтягуючи їх, унаслідок чого експонуються назовні їхні замасковані (сховані) сайти зв'язування. Це дозволяє їм зв'язуватися між собою напряму, а також з іншими молекулами фібронектину, формуючи фібрилу.

Така залежність від натягнення і необхідність взаємодії з поверхнею клітин змушує фібрили утворюватися лише там, де вони потрібні (не допускаючи їхнього збирання, скажімо, у кров'яному руслі).

Множинні повтори, подібні до таких у домені, наприклад фібронектину III, зустрічаються у багатьох білках позаклітинного матриксу, і полімеризація таких білків відбувається за подібним алгоритмом. За допомогою синтетичних поліпептидів, які відповідають різним сегментам доменів зв'язування із клітиною, була ідентифікована специфічна послідовність із трьох амінокислот (*Arg-Gly-Asp*, або *RGD*), яка зустрічається в одному з модулів основного фібронектинового домену (так званого домену III типу). Ця послідовність (***RGD-послідовність***) є важливим компонентом сайту зв'язування із клітиною (з її певним мембранним інтегрином). З'ясувалося, що, крім фібронектину, таку послідовність має цілий ряд позаклітинних білків, які беруть участь у зв'язуванні клітин із субстратом. Деякі з них, наприклад *дезінтегрини*, залучені до процесів згортання крові (будучи *RGD*-вмісними, вони вдало конкурують з фібронектином за сайти зв'язування з поверхнями клітин, що запобігає згортанню крові).

БАЗАЛЬНА МЕМБРАНА

Особливою формою матричного композиту є **базальна мембрана** – тонка (від 40 до 120 нм), щільна й гнучка пластинка, утворена макромолекулами матриксу. Вона не лише підстилає майже всі епітелії (будучи фактично їхнім "фундаментом"), але й оточує окремі м'язові клітини, адипоцити (клітини жирової тканини) і клітини Шванна (формують мієлінову обо-

лонку, "намотуючись" на аксон нервової клітини). А отже, базальна мембрана відокремлює ці клітини, як і епітеліальний пласт у цілому, від сполучної тканини (яка оточує їх або, у випадку епітелію, під ними лежить), а також установлює "механічний" зв'язок між ними. У деяких випадках, скажімо, у ниркових клубочках, вона розташовується між двома пластами клітин, працюючи як селективний фільтр (запобігаючи проникненню макромолекул із крові в сечовину). Однак базальна мембрана не обмежується виконанням лише структурних і селективних функцій. Вона може визначати полярність клітин, впливати на клітинний метаболізм, "упорядковувати" білки у прилеглих до неї клітинних мембранах, сприяти виживанню, проліферації й диференціації клітин, а також слугувати "магістраллю" для їхнього переміщення. Молекули, що входять до її складу, беруть участь в утворенні таких складних структур, як нервово-м'язові синапси. А при пошкодженні чи знищенні клітин базальна мембрана, часто лишаючись інтактною, залучається до процесів їхньої регенерації.

Компоненти базальної мембрани синтезуються клітинами, розташованими навколо неї: у випадку епітеліальної тканини епітеліоцитами – з одного боку, і клітинами підстеляючої сполучної тканини – з іншого (рис. 4.8). Утворюється базальна мембрана позаклітинними макромолекулами двох основних класів: *фібрилярними білками* (переважно глікопротеїнами, зв'язаними з короткими олігосахаридними ланцюжками) і ГАГ, зазвичай ковалентно зв'язаними з коровими білками з утворенням протеогліканів.

Склад зрілої базальної мембрани відрізняється у різних тканинах і навіть у різних ділянках однієї й тієї ж мембрани. Проте глікопротеїни *ламінін*, *колаген IV типу* і *нідоген*, а також протеоглікан *перлекан* є її ключовими компонентами (вони представлені в базальних мембранах практично всіх тварин (від медуз до ссавців).

Вважається, що *ламінін* (гетеротример, який складається із α -, β - та γ -ланцюгів (комбінації яких дають різні ізоформи), з'єднаних дисульфідними містками з утворенням структури, що нагадує несиметричний хрест (рис. 4.9)), є первинним ор-

ганізуючим компонентом базальної мембрани, і на ранніх стадіях розвитку вона складається в основному із його молекул. Завдяки своїй здатності зв'язуватися з іншими молекулами, ламінін багато в чому визначає організацію базальних мембран і сприяє їхньому прикріпленню до клітин.

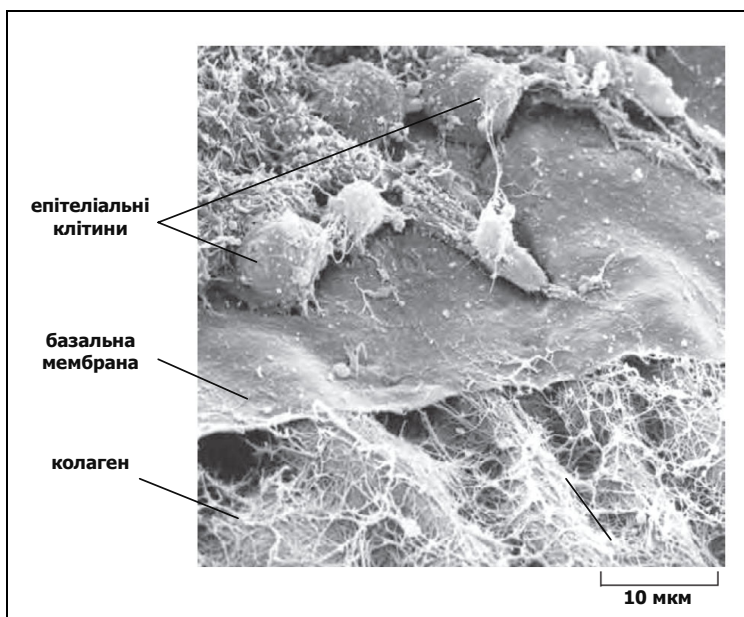


Рис. 4.8. Мікрофотографія базальної мембрани рогівки ока курячого зародка
(за Альбертсом Б., Джонсоном А.,
Льюїсом Д. та ін., 2014)

Іншим важливим компонентом зрілої базальної мембрани є **колаген IV типу** (також існує у декількох ізоформах). Як і інші фібрилярні колагени, він складається із трьох окремо синтезованих довгих поліпептидних ланцюгів, закручених у суперспіраль. Проте, на відміну від інших фібрилярних форм, їхня потрійна спіральна структура на більш ніж двадцяти ділянках переривається, забезпечуючи у такий спосіб гнучкість.

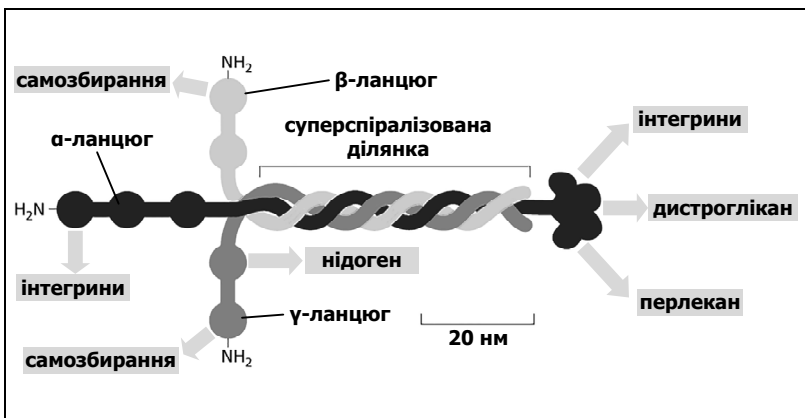


Рис. 4.9. Субодиниці молекули ламініну I. Схема
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д.
та ін., 2014, зі змінами)

Взаємодіючи своїми кінцевими доменами, молекули колагену IV типу утворюють у міжклітинному просторі гнучку повстеподібну мережу, надаючи базальній мембрані міцності на розрив.

Виникає логічне запитання: яким чином утворені ламініном і колагеном IV типу мережі взаємодіють між собою та з поверхнями клітин, котрі прилягають до базальної мембрани. І чому вони формують двовимірний пласт, а не тривимірний гель?

Відповіді на ці запитання були отримані на основі структурно-функціонального аналізу молекулярної організації основних макромолекулярних компонентів мембрани. Так, з'ясувалось, що молекули ламініну мають декілька функціональних доменів, включаючи домен, що зв'язує протеоглікан *перлекан* (який, у свою чергу, зв'язується з білком *нідогеном*), а також два чи більше доменів, які з'єднуються з рецепторами ламініну на плазматичних мембранах клітин (рис. 4.9). Колаген IV типу також має домени, які зв'язуються з *нідогеном* і *перлеканом*. Тому вважається, що ці два типи макромолекул слугують *лінкерами*, які з'єднують мережі, утворені ламініном і колагеном IV типу (рис. 4.10).

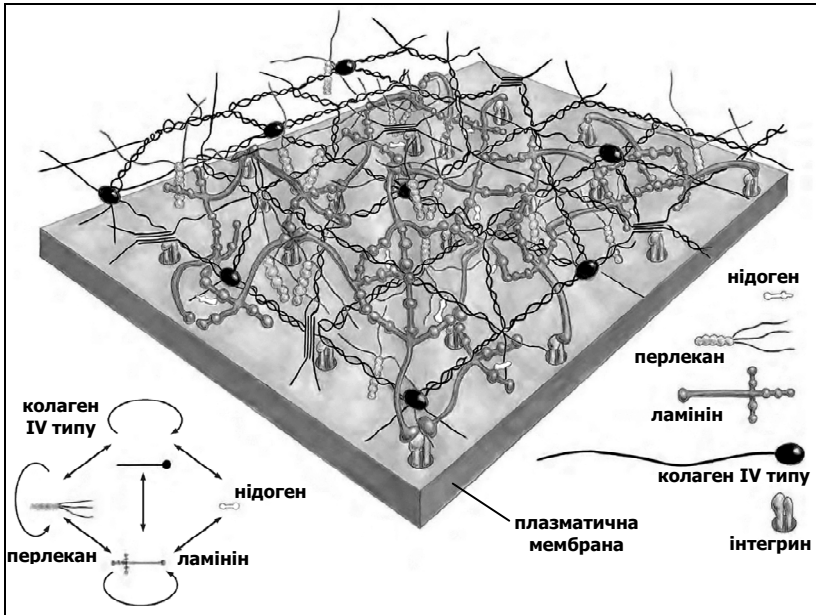


Рис. 4.10. Сучасна модель молекулярної структури базальної мембрани. Схема (за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2014, зі змінами)

Важливо підкреслити, що молекули ламініну, які утворюють початкову пласку структуру (що фактично є першим етапом формування базальної мембрани), спочатку з'єднуються одна з одною, і лише в тому випадку, коли вони зв'язані зі своїми рецепторами на поверхні клітин, які їх вироблюють. Відомо декілька типів таких рецепторів. Найпоширенішими з них є представники родини *інтегринів*. Іншим важливим типом ламінінових рецепторів є *дистроглікан* – протеоглікан, чий коровий білок пронизує мембрану, а глікозаміногліканові полісахаридні ланцюги локалізовані в позаклітинному просторі. Усі ці рецептори фактично виступають як "первинний організатор" базальної мембрани: вони фіксують основу молекул ламініну в мембранах клітин, тоді як ламінінові головки можуть взаємодіяти між собою, формуючи двовимірну мережу. Утворена ламінінова мережа, у свою чергу, координує зв'язування інших компонентів базальної мембрани.

ОСНОВНІ МЕХАНІЗМИ РЕОРГАНІЗАЦІЇ ТА ОНОВЛЕННЯ ПОЗАКЛІТИННОГО МАТРИКСУ СПОЛУЧНИХ ТКАНИН

Для клітин багатоклітинних організмів синтез елементів позаклітинного матриксу означає фактично створення середовища власного існування. А отже, здатність продукувати матрикс і зв'язуватися з його елементами є для клітин життєво необхідним. Однак не менш важливим для них є й здатність його руйнувати: при рості чи регенерації тканин клітинам необхідно швидко "демонтувати" матрикс. Що й дійсно відбувається: макромолекули матриксу в тканинах дорослого організму постійно розщеплюються й синтезуються знову при тканинному рості та фізіологічній регенерації, а також у разі фізичних пошкоджень, коли запускаються механізми репарації. Завдяки цьому кістки можуть перебудовуватися так, щоб ефективніше протистояти навантаженню, що прикладається, або "загоювати" переломи.

Для окремої клітини здатність локально руйнувати оточуючий її матрикс є важливою з двох причин: це дає їй можливість поділитися й переміщуватися. Якщо клітина не продукує ферменти, здатні (підкреслимо, локально) розщеплювати позаклітинний матрикс (або він виявляється стійким до їхнього впливу), то клітина виявляється "замурованою" в ньому (непроникний позаклітинний матрикс не дасть можливості клітині поділитися і практично загальмує її рухливість). Локальне розщеплення елементів позаклітинного матриксу є також необхідним, наприклад, при перетинанні базальної мембрани (що є обов'язковою процедурою, скажімо, при гістогенезі залозистого епітелію, міграції лейкоцитів із кровоносних судин у тканину при запаленні чи травмі), при рості й регенерації хрящової та кісткової тканини тощо. Зауважимо, що до явищ цього ж порядку належить і здатність пухлинних клітин поширюватися по організму й проліферувати у тканинах, у яких вони "укорінюються".

Як правило, елементи тканинного матриксу розщеплюються позаклітинними протеолітичними ферментами (*протеазами*), діючими поблизу клітин, що їх продукували. Більшість із цих протеаз належать до двох великих класів: *металопротеази* і *серинові протеази*. Їхня активність чітко контролюється, що забезпечується участю трьох основних механізмів: локальної активації, захоплення поверхневими рецепторами і секреції інгібіторів.

Локальна активація. Деякі протеази виробляються у вигляді неактивних попередників, які активуються лише в "потрібних місцях". Так, *плазміноген* у великій кількості міститься у крові, будучи неактивною формою (попередником) серинової протеази *плазміну* (бере участь у тромболізі). Спеціальні протеази – *активатори плазміногену* – "розрізають" (у "потрібних" місцях) попередник з утворенням активної форми ферменту. Тканинний активатор плазміногену (*tissue-tape plasminogen activator, tPA*) часто вводять пацієнтам після тромботичного інсульту або серцевого нападу, він сприяє розсмоктуванню артеріального тромбу, що викликає напад, і відновлює надходження крові до тканини.

Захоплення поверхневими рецепторами. У багатьох клітин на поверхні наявні рецептори, які зв'язують протеази там, де вони потрібні. Так, *урокиназний активатор плазміногену* (*urokinase-tape plasminogen activator, uPA*) зв'язується з рецепторами на кінчиках аксона, які ростуть, а також на "провідному краї" деяких мігруючих клітин, допомагаючи їм "розчищати шлях".

Секреція інгібіторів. Зона дії протеаз обмежується вивільненими в позаклітинний простір інгібіторами, у тому числі інгібіторами металопротеаз (*tissue inhibitors of metalloproteases, TIMP*) і серинових протеаз (так званих, *серпінів*). Інгібітори є специфічними до певної протеази, вони міцно зв'язуються з її активним центром, блокуючи в такий спосіб її активність. Цікавим є той факт, що інгібітори продукуються клітинами, котрі містяться на межі зони активного руйнування матриксу, захищаючи від протеолізу ті ділянки, які слід зберегти. Вони також можуть захищати поверхневі білки, необхідні для міграції й установлення міжклітинних контактів.

КЛІТИННІ КОНТАКТИ

З усіх типів взаємодій клітин у багатоклітинному організмі найбільш фундаментальними є взаємодії, які утримують їх разом. Клітини можуть з'єднуватися між собою (утворювати *клітинні контакти*) або за допомогою прямих *міжклітинних контактів* (з'єднання типу "клітина – клітина") або встановлювати "механічний" зв'язок за участю вивільнених ними речовин (контакти типу "клітина – позаклітинний матрикс – клітина"; передача сигналу між клітинами через взаємодію ліганду з рецептором – це також, у певному розумінні, є контактом типу "клітина – позаклітинний матрикс – клітина", проте "немеханічним"). Утворення таких контактів можливе лише за наявності *клітинної адгезії*. Останню визначають як здатність клітин *вибірково* прикріплюватися одна до одної або до компонентів позаклітинного матриксу. Реалізують клітинну адгезію спеціальні глікопротеїни плазматичних мембран – *молекули адгезії*. Саме вони забезпечують вибіркоче прикріплення клітин до компонентів матриксу і взаємодію клітин між собою. Більш того, будучи трансмембранними білками, вони як структурно, так і функціонально з'єднують "контактера" (чи то макромолекули матриксу, чи то трансмембранні глікопротеїни контактуючої клітини) із внутрішньоклітинним цитоскелетом.

Не важко зрозуміти, що механізми клітинної адгезії фактично визначають архітектуру тіла – його форму, механічні властивості й розподіл клітин різних типів. З'єднання між клітинами утворюють шляхи сполучення, дозволяючи клітинам обмінюватися сигналами, які координують їхню поведінку й регулюють експресію генів. Прикріплення до сусідніх клітин і до компонентів позаклітинного матриксу впливає на орієнтацію внутрішньоклітинних структур. Міграція клітин в організмі, що розвивається, "направлення" їхнього руху при репараційних процесах є неможливими без процесів встановлення й розриву контактів, як і модифікації матриксу (про що вже йшлося раніше). Отже, системи клітинних контактів і механізми клітинної адгезії грають принципову роль в усіх проявах організації, функціонування й динаміки багатоклітинних організмів.

Тканини тварин є надзвичайно різноманітними. Проте, хоч і з певною мірою умовності, їх можна віднести до двох архітектурних типів. Так, у сполучних тканинах позаклітинний матрикс добре виражений (див. вище), тоді як розподілені в ньому клітини є нечисленими, а отже, прямі контакти між останніми є достатньо рідкими (більшу частину механічного навантаження бере на себе саме матрикс, а не клітини). Проте всі клітини таких тканин мають розвинуту систему контактування з макромолекулами та/або волокнистими компонентами матриксу, що позначається на особливостях функціонування тканини, зокрема на міжклітинній комунікації.

Прикладом іншого архітектурного типу може слугувати епітеліальна тканина, у якій клітини тісно зв'язані між собою з утворенням пласту, а позаклітинного матриксу мало (він представлений в основному базальною мембраною, що підстилає епітелій, див. вище). У цьому випадку епітеліоцити прикріплені один до одного напряму за участю міжклітинних контактів, на яких "заякорені" волокна цитоскелета (у такий спосіб механічне навантаження передається із клітини на клітину через низку сайтів адгезії).

Однак, незалежно від тканинного архітектурного типу, фізичні контакти відіграють у тканині принципову роль. При цьому слід підкреслити, що клітинні контакти є дуже різноманітними за своєю структурою, і їхні функції не вичерпуються однією лише передачею механічних взаємодій. Нині виділяють чотири основні функціональні типи клітинних контактів (кожен із яких має свою молекулярну основу) (рис. 4.11):

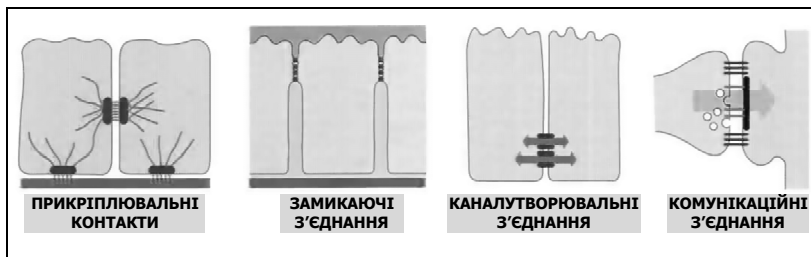


Рис. 4.11. Функціональні типи клітинних контактів у тканинах тварин
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2014, зі змінами)

1. **Прикріплювальні контакти** – з'єднують клітину з клітиною (як правило, за допомогою трансмембранних білків *кадгеринів*) або клітину з позаклітинним матриксом (зазвичай за допомогою трансмембранних білків *інтегринів*). Передають напругу через внутрішньоклітинний зв'язок із філаментами цитоскелета:
 - *актинових філаментів* – у **адгезійних** (міжклітинних) та **фокальних** (типу "клітина – позаклітинний матрикс") контактах;
 - *проміжних філаментів* – у **десмосомах** (міжклітинні контакти) та **напівдесмосомах** (контакти типу "клітина – позаклітинний матрикс");
2. **замикальні з'єднання** – (формуються за участю білків *клаудинів*) "герметизують" зазори між епітеліальними клітинами, перетворюючи клітинний пласт у непроникний (або напівпроникний) бар'єр. До таких з'єднань відносять **щільні** контакти у хребетних та **септовані** контакти у безхребетних;
3. **каналотворювальні з'єднання** – (утворені білками *конексинами* або *інексинами*) формують "тунелі", які з'єднують цитоплазми сусідніх (контактуючих) клітин, і за якими із клітини у клітину можуть "проходити" невеликі молекули та іони. До цієї групи належать **щільні** контакти (у тварин) і **плазмодесми** (у рослин);
4. **комунікаційні з'єднання** – (мають у складі *якірні* білки та білки, *залучені до передачі сигналу*) складні структури, що забезпечують передачу сигналу: вони дозволяють передавати сигнал від клітини до клітини через їхні плазматичні мембрани у точках контактування. До контактів цієї групи відносять **хімічні синапси** (у нервовій системі), **імунні синапси** (в імунній системі), а також комунікаційні з'єднання, які "реалізують комунікацію" шляхом передачі сигналу між клітинами через взаємодію ліганду із рецептором (детально це питання розглянуто в розділі "Інформаційні міжклітинні взаємодії").

Зауважимо, що прикріплювальні, замикальні й каналоутворювальні з'єднання, крім своєї структурної ролі, можуть виконувати й сигнальну функцію.

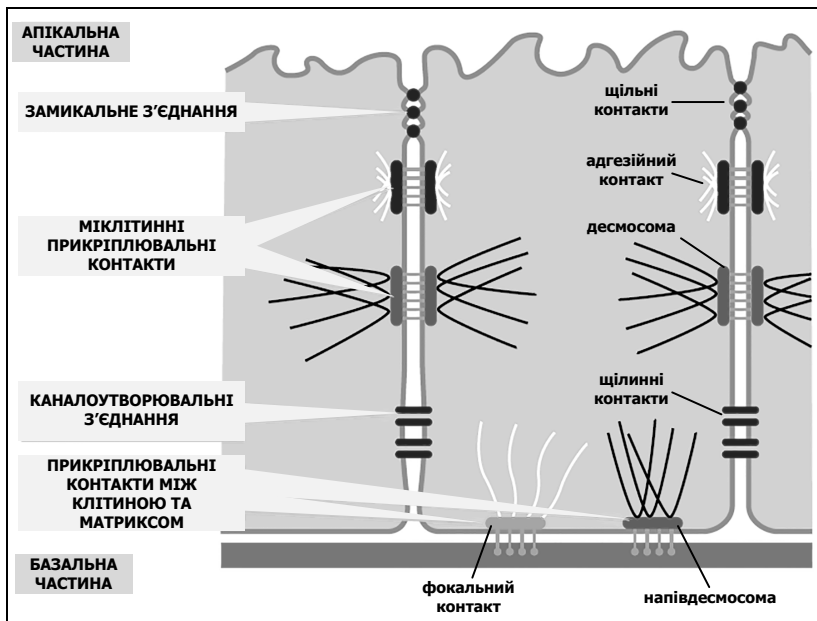


Рис. 4.12. Схематичне зображення клітинних контактів в епітелії хребетних (класифікація за їхньою первинною функцією)

*(за Альбертсом Б., Джонсоном А.,
Льюїсом Д. та ін., 2014)*

Найбільш широкий "спектр" міжклітинних контактів виявлений у зрілому епітелії, клітини якого міцно зчеплені одна з одною. На рис. 4.12 показано типовий розподіл клітинних з'єднань (які можна визначити за допомогою електронної мікроскопії) в одношаровому призматичному епітелії вистілки кишечника хребетних. У такій тканині один шар витягнутих клітин підстилає базальна мембрана, а найбільш віддалена від неї поверхня клітин (*апекс*) є вільною (контактує з позаклітинним середовищем).

По боках (на *латеральних* поверхнях) клітини утворюють міжклітинні контакти. Найближче до апекса розташовані *замикальні* контакти (відомі як *щільні* контакти у хребетних), не дозволяючи молекулам просмоктуватися епітелієм через міжклітинний простір. Нижче знаходяться два типи *прикріплювальних* контактів: *адгезійні* (точки прикріплення актинових філаментів) і *десмосоми* (точки прикріплення проміжних філаментів). Ще нижче (часто разом із додатковими десмосомами) містяться каналоутворювальні з'єднання (*щільні* контакти).

Додатковий набір сайтів адгезії прикріплює епітеліоцити до базальної мембрани: *фокальні* контакти (у тонкому кишечнику не виявлені, проте добре виражені в епітелії інших органів) – прикріплюють до матриксу актинові філаменти, *напівдесмосоми* – проміжні.

МОЛЕКУЛИ АДГЕЗІЇ ТА ЇХНЯ УЧАСТЬ У ФОРМУВАННІ КЛІТИННИХ КОНТАКТІВ

У будь якого із чотирьох представлених вище типів прикріплювальних контактів центральну роль відіграють *трансмембранні білки адгезії*, один кінець яких зв'язаний усередині клітини з її цитоскелетом, а інший – із певними структурами поза нею (рис. 4.13).

Такі трансмембранні молекули належать до двох основних суперродин (відповідно до двох основних типів прикріплення) (табл. 4.1): *кадгеринів*, які опосередковують переважно міжклітинні контакти, та *інтегринів*, які зазвичай беруть участь у прикріпленні клітин до компонентів матриксу.

Усередині кожної родини має місце спеціалізація: деякі кадгерини пов'язані з актиновими філаментами і формують адгезійні з'єднання, інші – із проміжними, з утворенням десмосоми. Подібно до цього, деякі інтегрини зв'язуються з актином утворюючи актинозалежні з'єднання клітин із матрик-

сом, тоді як інші – зв'язані з проміжними філаментами і формують напівдесмосоми. Із цього правила є декілька винятків. Так, деякі інтегрини опосередковують міжклітинні контакти, а не прикріплення клітин до компонентів матриксу.

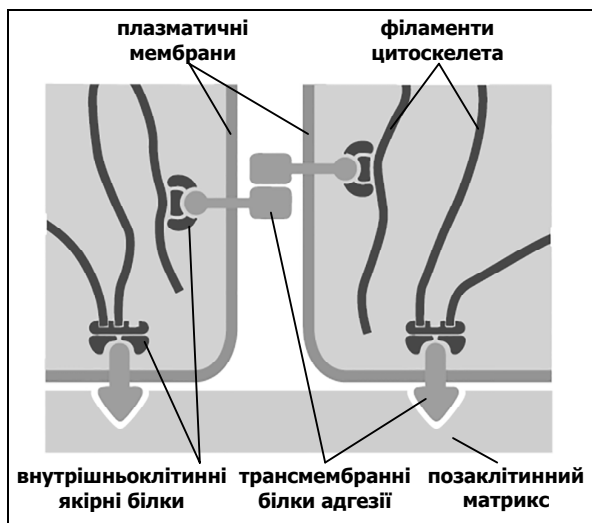


Рис. 4.13. Схема зв'язування цитоскелета з позаклітинними структурами за участю трансмембранних білків адгезії

(за Альбертсом Б., Джонсоном А.,
Льюїсом Д. та ін., 2014)

Слід підкреслити, що існують й інші типи молекул адгезії, які утворюють менш міцні з'єднання, ніж прикріплювальні контакти, проте за певних умов їх достатньо для зчеплення клітин. Крім згаданих вище суперродин кадгеринів та інтегринів, визначають ще дві – *селектини* й *адгезійні імуноглобуліни*. Білки першої з них (як і кадгерини та інтегрини) для здійснення своєї адгезійної функції потребують наявності іонів Ca^{2+} , другої – ні.

Так чи інакше, вважається, що міжклітинні контакти, опосередковані кадгеринами, – це клас з'єднань, який має найбільш фундаментальне значення.

Таблиця 4.1

Прикріплювальні контакти

З'єднання	Трансмембранний білок адгезії	Позаклітинний ліганд	Прикріплення внутрішньоклітинних філаментів	Внутрішньоклітинні якірні білки
Міжклітинні контакти				
Адгезійне з'єднання	Кадгерин (класичний)	Кадгерин на суміжній клітині	Актинові філаменти	α -катенін, β -катенін, плакоглобін (γ -катенін), p120-катенін, вінкулін, α -актинін
Десмосома	Кадгерин (десмоглеїн, десмоколін)	Десмоглеїн і десмоколін на суміжній клітині	Проміжні філаменти	плакоглобін (γ -катенін), плакофілін, десмоплакін
Контакти "клітина – матрикс"				
Фокальний контакт	Інтегрин	Білки позаклітинного матриксу	Актинові філаменти	Талін, вінкулін, α -актинін, філамін, паксилін, кіназа фокальних контактів (FAK)
Напів-десмосома	Інтегрин $\alpha 6 \beta 4$, колаген VII типу (BP 180)	Білки позаклітинного матриксу	Проміжні філаменти	Плектин, дистонін (BP 230)

Кадгерини

Кадгерини виявлені в усіх багатоклітинних тварин (чиї геноми розшифровані), а також у хоанофлагелатів (представників групи протистів). В інших еукаріотів, включаючи гриби і рослини, вони відсутні. Не виявлені кадгерини і в бактерій та архей.

Суперродина кадгеринів об'єднує як *класичні* кадгерини, так і *некласичні*. Вважається, що практично всі клітини хребетних (імовірно й інших тварин) виробляють, залежно від свого типу, один або декілька білків цієї суперродини (у людини їх нараховується близько 180). Крім того, існують вагомні докази того, що кадгерини є основними молекулами клітинної адгезії, що об'єднують клітини ранніх ембріональних тканин.

Перші три з відкритих та досліджених класичних кадгеринів названі відповідно до того, у якій тканині вони зустрічаються найчастіше:

- **Е-кадгерин** – виявлений на поверхні клітин багатьох епітеліальних тканин;
- **N-кадгерин** – локалізується на поверхні нервових і м'язових клітин, а також клітин кришталика;
- **R-кадгерин** – наявний на поверхні клітин плаценти й епідермісу.

Проте всі вони виявляються і в інших тканинах: N-кадгерин, скажімо, вироблюється фібробластами, Е-кадгерин експресується у деяких частинах мозку тощо.

Усі класичні кадгерини мають подібні послідовності внутрішньо- і позаклітинних доменів, виконують певні адгезійні функції і, у той чи інший спосіб, беруть участь у передачі сигналу (за участю своїх внутрішньоклітинних доменів вони "передають" сигнал усередину клітини, змінюючи її поведінку залежно від того, чи прикріплена вона, чи ні).

Некласичні кадгерини суттєво різноманітніші за своєю будовою, більше 50-ти з них виробляються виключно клітинами мозку. До цієї групи відносять, наприклад, *протокадгерини* (виявлені у мозку), *десмоколіни* і *десмоглеїни* (формують десмосоми), *T-кадгерини* (містяться на поверхні нервових і м'язових клітин, беруть участь у першу чергу в передачі сигналу). Останні не мають трансмембранного домену і прикріплюються до мембран клітин за допомогою *глікозилфосфатидилінозитольного якоря* (рис. 4.14).

Прикріплювальні клітинні контакти, побудовані за участю кадгеринів, у цілому є симетричними. Якщо в клітині з одного боку контакту з'єднання сполучено із актиновими філаментами, то і з іншого боку також. Крім того, з'єднання за участю кадгеринів, як правило, *гомофільні* (рис. 4.15): молекули кадгеринів на одній клітині зв'язуються з кадгеринами того ж (або дуже близького) типу, локалізованими на сусідній клітині.

Вважається, що молекули кадгеринів при формуванні контакту зв'язуються між собою своїми N-кінцевими доменами (вони містяться на найбільшій відстані від плазмолемі), у яких білковий ланцюг формує кінцевий вузол і поряд із ним – "карман". Молекули кадгеринів двох контактуючих клітин "вкладають" свої вузли в "кармани" протилежної молекули, устанавлюючи в такий спосіб зв'язок між собою (рис. 4.16).

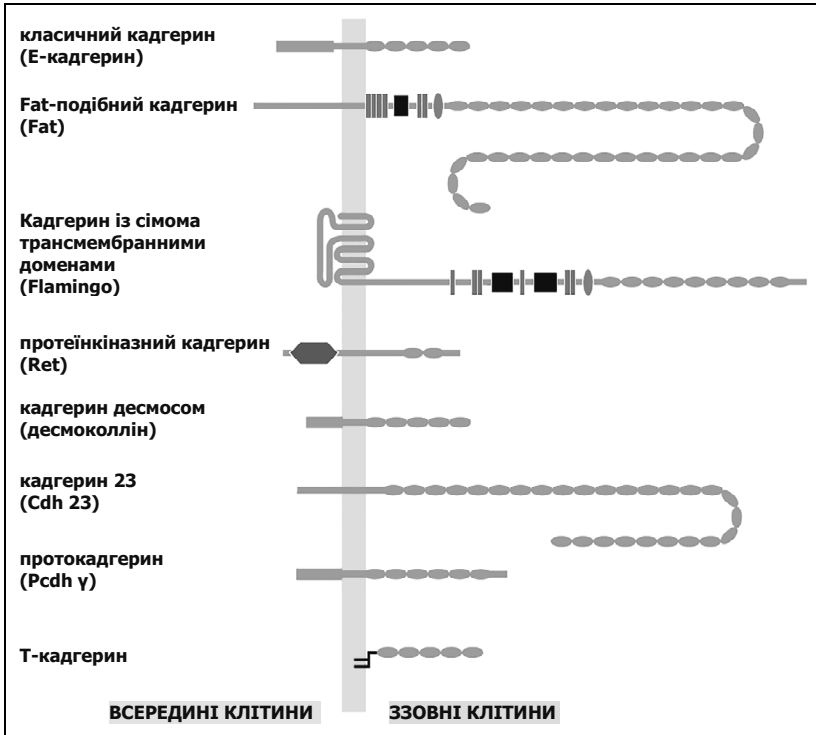


Рис. 4.14. Суперродина кадгеринів: овальні структури – кадгеринові домени; "неовальні" – консервативні
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2014)

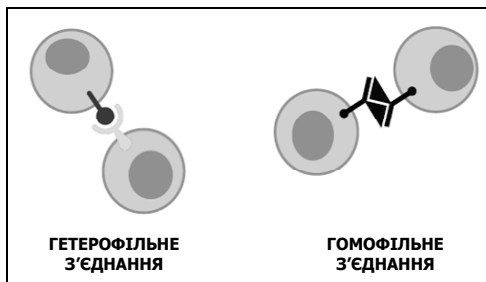


Рис. 4.15. Гомофільні й гетерофільні з'єднання
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2014)

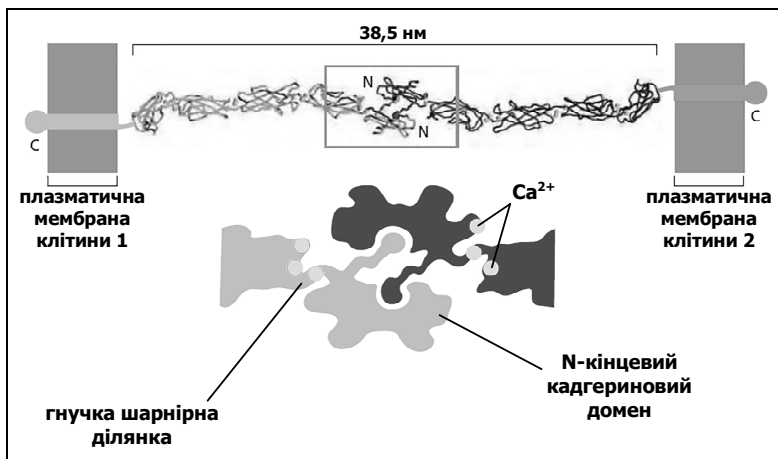


Рис. 4.16. Позаклітинний домен класичного кадгерину
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д.
та ін., 2014, зі змінами)

Усі члени кадгеринової суперродини, за визначенням, мають позаклітинну частину, яка складається із декількох копій послідовності, що має назву *кадгериновий домен*. Позаклітинна частина класичних кадгеринів містить 5 таких повторів, у десмоколінів та десмоглеїнів їх 4 або 5, тоді як у некласичних кадгеринів їхня кількість сягає понад 30.

Кожний кадгериновий домен формує достатньо щільний модуль, з'єднаний з наступним кадгериновим доменом *шарнірною ділянкою*. Слід підкреслити, що функціонування кадгеринів залежить від іонів Ca^{2+} (видалення Ca^{2+} із внутрішньоклітинного середовища приводить до послаблення опосередкованих цими молекулами адгезії контактів). Останні зв'язуються поблизу кожного шарніра і роблять його нерухомим, тому весь ланцюжок кадгеринових доменів поводить себе як твердий злегка зігнутий стрижень. При видаленні Ca^{2+} шарніри набувають здатності обертатися, і структура стає гнучкою. Конформація N-кінцевої ділянки при цьому дещо змінюється, зменшуючи спорідненість до відповідного кадгерину на поверхні протилежної клітини. Молекули кадгеринів, дестабілізовані видаленням Ca^{2+} , швидко розщеплюються протеолітичними ферментами.

На відміну від рецепторів розчинних сигнальних молекул, кадгерини, як і більшість інших молекул адгезії, зазвичай мають невелику спорідненість до своїх партнерів. Міцність же з'єднання досягається за рахунок багатьох слабких зв'язків. Зв'язуючись із протилежно орієнтованими партнерами на іншій клітині, молекули кадгеринів часто об'єднуються у кластери із сусідніми молекулами кадгеринів у тій же плазмолемі (рис. 4.17). Міцність такого з'єднання є набагато більшою, ніж міцність одиночного міжмолекулярного зв'язку. При цьому, однак, його можна з легкістю роз'єднати, послідовно розриваючи зв'язки між молекулами. Подібний "принцип застібки" працює також у випадку сполучень, утворених трансмембранними молекулами адгезії інших типів.

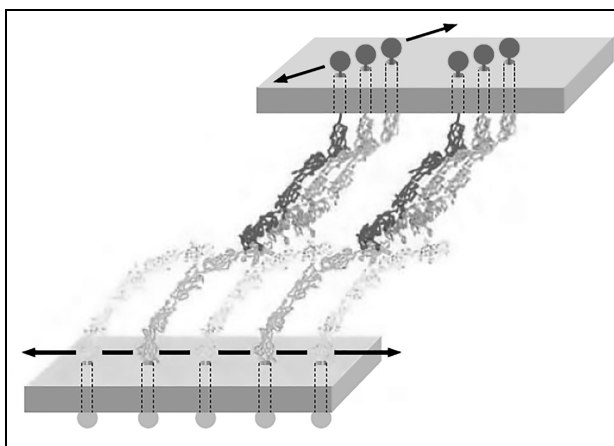


Рис. 4.17. З'єднання мембран двох клітин за участю кадгеринової "застібки"
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2014, зі змінами)

Процеси утворення та розривів прикріплювальних контактів є життєво важливими, оскільки вони постійно відбуваються як під час розвитку зародка, так і за структурних перебудов тканин дорослого організму. Так, поява і зникнення специфічних кадгеринів певним чином співвідносяться зі стадіями ембріогенезу, на яких здійснюється перегрупування клітин і зміни контактів між ними. Наприклад, агрегація клітин при формуванні епітелію є процесом оборотним. Дисперсні одиночні клітини (*мезенхі-*

мальні клітини) при виробленні молекул адгезії можуть "збиратися" разом з утворенням епітелію. І навпаки, епітеліоцити, змінюючи експресію певних білків (у тому числі й білків адгезії), можуть "роз'єднуватися" і навіть залишати батьківський епітеліальний пласт, стаючи "окремими" клітинами. Такі *епітеліально-мезенхімальні переходи* відіграють важливу роль у нормальному зародковому розвитку, яскравим прикладом чого може послугуватися утворення нервової трубки. Однак вони можуть бути ознакою і певного патологічного стану. Так, більшість форм раку виникає на основі епітелію. При цьому пухлини стають злоякісними, отримуючи, поряд з іншим, здатність до метастазування (детальніше процеси онкогенезу розглянуто у розд. 13). Це відбувається лише за умови набуття онкотрансформованими клітинами здатності відділятися від "рідного" епітелію і "надходити" до інших тканин.

Як зазначалося вище, позаклітинні домени кадгеринів утворюють гомофільні з'єднання, а їхні внутрішньоклітинні домени (класичних і деяких неklasичних кадгеринів) зв'язуються з філаментами цитоскелета (актиновими за адезійних контактів і проміжними у випадку десмосом). Утворений зв'язок із цитоскелетом не є прямим, у його формуванні бере участь група допоміжних *внутрішньоклітинних якірних білків*, які формують своєрідні кластери на кінці кадгеринів. Цей зв'язувальний комплекс, що приєднує один із білків кадгеринової родини до актинових або проміжних філаментів, складається з декількох різних молекул (рис. 4.18). Його компоненти змінюються залежно від типу прикріплення, проте головну роль, як правило, грає β -катенін або подібний до нього γ -катенін (*плакоглобін*). До формування адгезійних контактів залучений також дальній родич цих білків – *p120-катенін*, який допомагає регулювати збирання комплексу загалом.

Існують беззаперечні докази існування тісного зв'язку між адгезією і міжклітинною сигналізацією, яскравим прикладом чого може послугувати функціонування β -катеніну. З одного боку, він виступає як найважливіший якірний білок адгезійного з'єднання, а з іншого, як учасник міжклітинного сигнального (Wnt) шляху (переміщуючись із цитозолу до ядра, він активує транскрипцію певних генів). За адгезію і генно-регуляторну функції відповідають різні частини однієї молекули, проте, очеви-

дно, що одна й та сама молекула не може виконувати обидві функції одночасно. У результаті розпаду адгезійного контакту β -катенін здатний вільно переміщуватися до ядра, виступаючи в ролі сигнальної молекули, і навпаки, активність компонентів сигнального Wnt-шляху (які регулюють фосфорилування і деградацію β -катеніну) може контролювати доступність β -катеніну при утворенні адгезійного контакту.

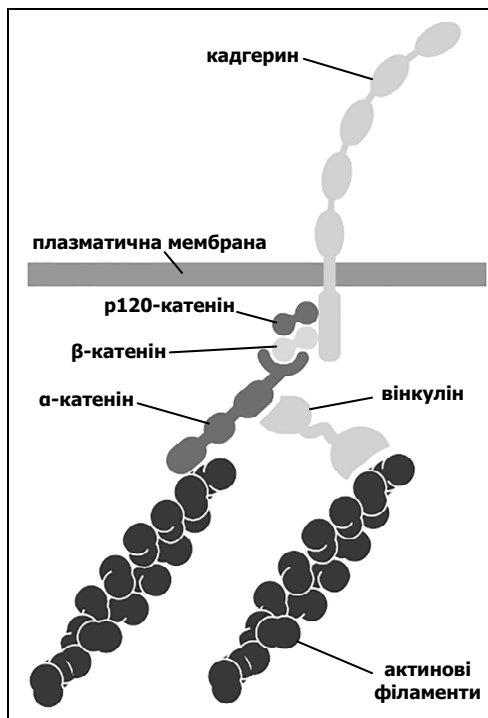


Рис. 4.18. Прикріплення класичних кадгеринів до актинових філаментів
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2014)

Як інший приклад можна згадати представників некласичних кадгеринів – білків підродини Flamingo, які мають трансмембранний домен, що сім разів перетинає плазмолему. Це дає всі підстави припустити, що ці білки можуть функціонувати як рецептори, спряжені з G-білками.

Адгезійні контакти. Здатні набувати різної форми. Так, у більшості неепітеліальних тканин вони можуть мати вигляд невеликих точок або смуг, які "організують" непрямий зв'язок між кортикальними актиновими філаментами двох взаємодіючих клітин.

Однак найтиповішими є адгезійні з'єднання в епітелії, у якому вони найчастіше формують безперервний **адгезійний пасок** (або **пасок зчеплення**) безпосередньо під апікальною поверхнею клітин (рис. 4.19). До такого паска кожної із клітин "кріпиться" скоротливий пучок актинових філаментів, орієнтований паралельно плазматичній мембрані й приєднаний до неї за допомогою кадгеринів (позаклітинні домени яких на сусідніх клітинах гомофільно зв'язуються) і асоційованих із ними внутрішньоклітинних якірних білків. У такий спосіб актинові пучки (за участю кадгеринів і якірних білків) фактично об'єднані у велику міжклітинну мережу.

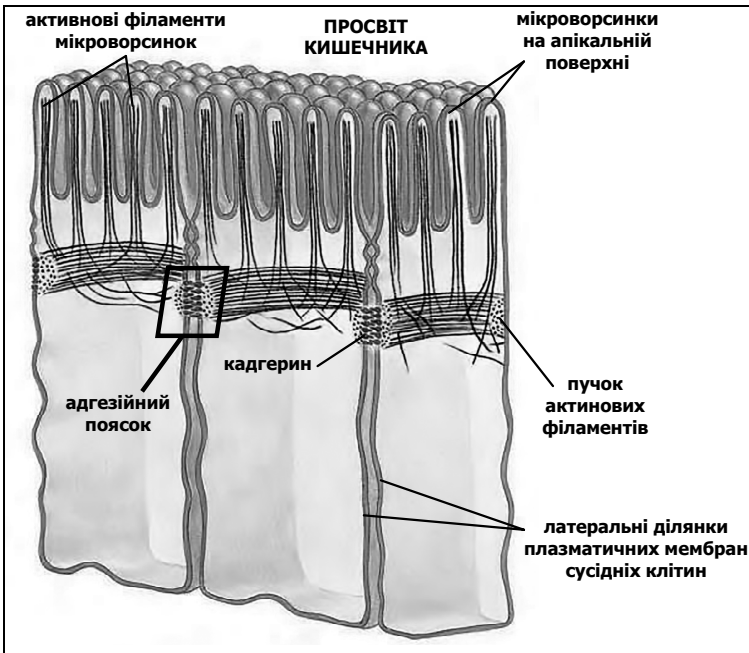


Рис. 4.19. Адгезійні контакти між епітеліоцитами тонкого кишечника
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2013)

Виступаючи в ролі посередника при зв'язуванні актинових філаментів однієї клітини з актиновими філаментами її сусідів, адгезійні контакти дозволяють клітинам у тканині координувати рух своїх актинових цитоскелетів. Створена за їхньої участі "актинова мережа" здатна скорочуватися, забезпечуючи тим самим необхідну для найважливіших процесів морфогенезу тварин рухливість – формування трубок, везикул та інших подібних структур із пласту епітеліальних клітин.

Десмосоми. Вважається, що основною функцією десмосом є забезпечення механічної міцності. Вони наявні в більшості зрілих епітеліїв (особливо багато в епідермісі), що робить зрозумілою їхню важливість для хребетних.

Десмосоми структурно подібні до адгезійних прикріплювальних контактів, проте, на відміну від них, вони зв'язані не з актиновими, а проміжними філаментами (рис. 4.20).

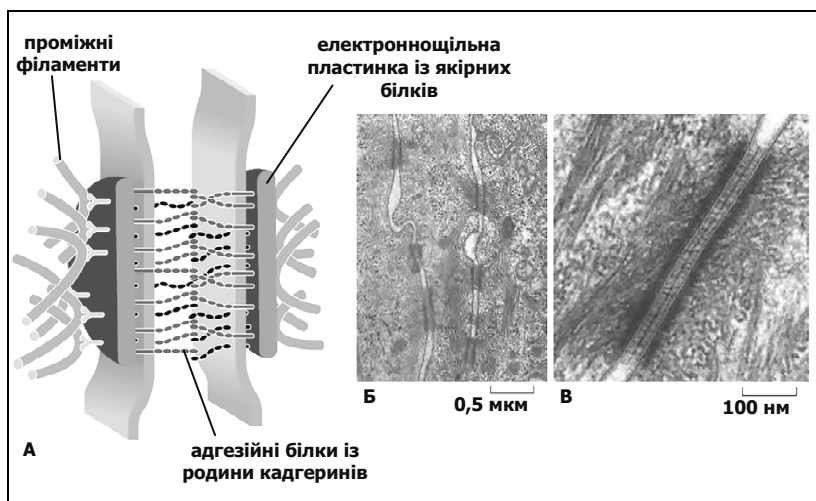


Рис. 4.20. Будова десмосоми:

А – структурні компоненти десмосоми; Б – електроннограма десмосомного контакту між епідермальними клітинами шкіри миші; В – електроннограма ділянки тканини, представленої на рис. Б, при більшому збільшенні (за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2014, зі змінами)

У місці контакту на цитоплазматичному боці кожної із взаємодіючих плазматичних мембран міститься *електроннощільна пластинка*, до складу якої входять різні *внутрішньоклітинні якірні білки*. До поверхні кожної такої пластинки кріпиться пучок проміжних філаментів, утворюючи міцний структурний каркас, зв'язаний (через посередництво трансмембранних білків адгезії з родини кадгеринів) з аналогічними пучками сусідньої клітини, що створює мережу, яка охоплює всю тканину (рис. 4.21). Тип прикріплення до десмосоми проміжних філаментів залежить від типу клітини: це можуть бути, скажімо, *кератинові філаменти*, як у більшості епітеліїв, або *десмінові*, як у кардіоміоцитах.

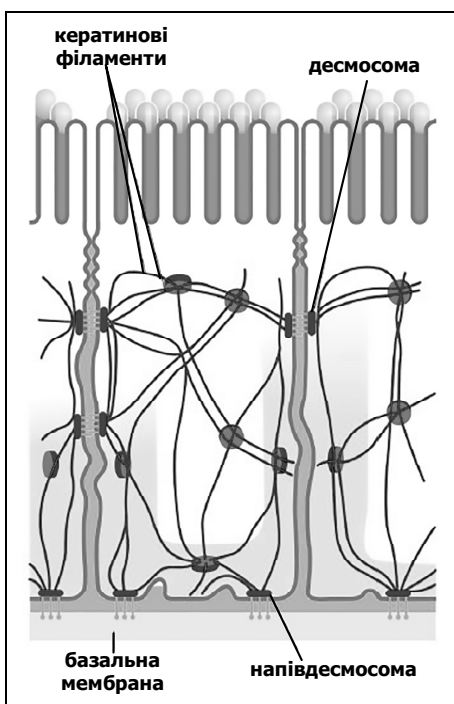


Рис. 4.21. Десмосоми, напівдесмосоми та мережа проміжних філаментів в епітелії тонкого кишечника
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2013)

Зв'язані з пластинками трансмембранні білки адгезії *кадгеринової родини* своїми позаклітинними доменами взаємодіють один з одним, з'єднуючи в такий спосіб суміжні мембрани (за участю Ca^{2+} -залежного механізму) (рис. 4.22).

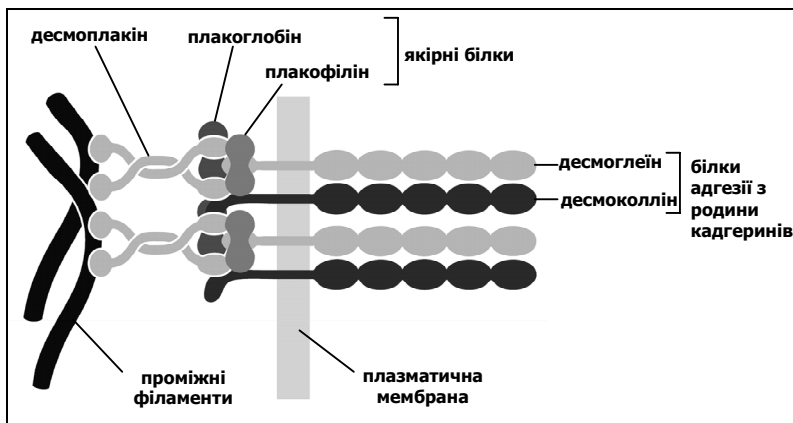


Рис. 4.22. Молекулярні компоненти десмосоми:

Десмоглеїн і десмоколлін – представники кадгеринової родини білків адгезії. Їхні цитоплазматичні кінці зв'язані з плакоглобіном (γ -катеніном) і плакофіліном (далекій родич p120-катеніну), який, у свою чергу, зв'язаний із десмоплакіном.

Останній з'єднується з бічними поверхнями проміжних філаментів, тим самим закріплюючи їх на десмосомі

(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2014, зі змінами)

Інтегрини

Клітини, про що вже згадувалося вище, створюють позаклітинний матрикс, упорядковують його та руйнують. Матрикс же, у свою чергу, суттєво впливає на життєдіяльність клітин. Цей вплив передається зазвичай через трансмембранні білки клітинної адгезії, які працюють фактично як рецептори позаклітинного матриксу, зв'язуючи його із внутрішньоклітинним цитоскелетом. Проте їхня роль не зводиться до простого механічного прикріплення: через них компоненти матриксу можуть впливати практично на будь-який аспект життєдіяльності клітини.

Інтегрини є одними з основних рецепторів, які зв'язують у тваринних клітинах більшу частину білків матриксу. Більш того, представники цієї великої родини гомологічних трансмембранних молекул адгезії можуть передавати сигнал в обох напрямках (зв'язування компоненту матриксу з інтегрином може сприйматися як сигнал ззовні, тоді як ізсередини клітини може надходити сигнал, що контролює зв'язування інтегрину з матриксом), а також "перетворювати" один сигнал на інший.

Тепер відомо багато різновидів інтегрину (у людини їх нараховується 24 різновиди), проте всі вони мають подібну будову. Молекула інтегрину складається з нековалентно зв'язаних глікопротеїнових субодиниць α і β . Обидві субодиниці є трансмембранними: мають короткий внутрішньоклітинний C-кінцевий домен і довгий позаклітинний N-кінцевий. Позаклітинна частина інтегринового димеру зв'язується зі специфічними амінокислотними послідовностями білків матриксу (наприклад, ламініну чи фібронектину) або з молекулами на поверхні інших клітин. Внутрішньоклітинні домени зв'язані з цитоскелетом за допомогою декількох білків, що утворюють своєрідний комплекс.

Усі форми інтегрину людини, крім одної, зв'язані всередині клітини з актиновими філаментами через посередництво білка *таліну* (рис. 4.23).

При цьому "голова" молекули інтегрину зв'язується безпосередньо з позаклітинним білком (наприклад, фібронектином), а внутрішньоклітинний – з таліном, який, у свою чергу, з'єднаний з актином мікрофіламентів. Утворений зв'язок посилюється додатковими білками, такими як *α -актинін*, *філамін* і *вінкулін*.

Утворені інтегринами контакти можуть бути невеликими, слабкими і тимчасовими, чи, навпаки, займати велику площу і бути добре вираженими й міцними. Прикладом останніх можуть слугувати **фокальні контакти**, які формуються, скажімо, фібробластами.

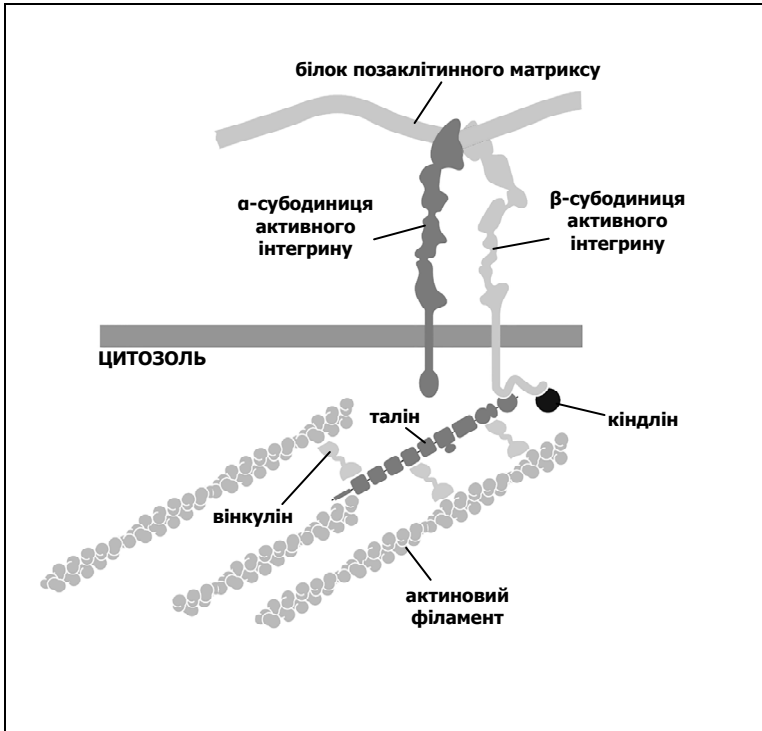


Рис. 4.23. Зв'язок молекули інтегрину з позаклітинним матриксом та актиновим цитоскелетом. Схема (за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2014, зі змінами)

В епітелії більша частина контактів клітини з матриксом представлена *напівдесмосомами*, у складі яких особливий тип інтегрину $\alpha\beta_4$ зв'язує клітину з ламініном базальної мембрани. У цьому унікальному випадку інтегрини внутрішньоклітинно з'єднуються з кератиновими філаментами через якірні білки *плектин* і *дистонін* (рис. 4.24). Крім того, до складу цього комплексу входить специфічний колаген XVII типу, який складається із трансмембранного домену й позаклітинної частини, що має характерні властивості колагену.

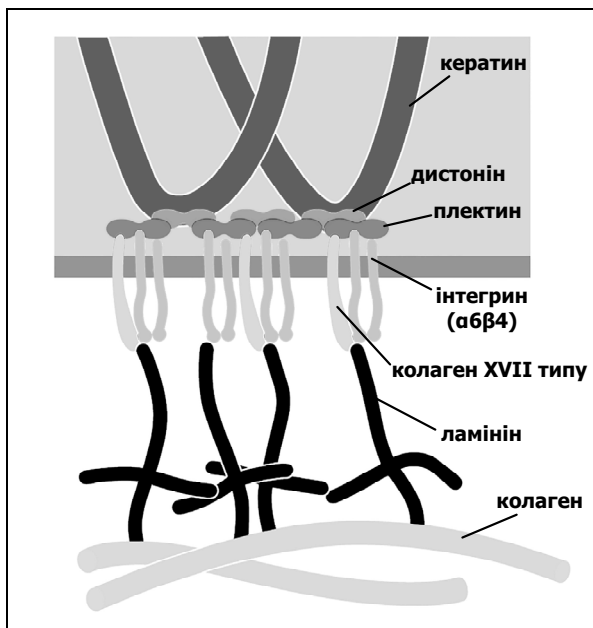


Рис. 4.24. Будова напівдесмосоми. Схема
 (за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д.
 та ін., 2014, зі змінами)

Мігруюча клітина (наприклад, фібробласт, чи епітеліоцит, що рухається вздовж базальної мембрани) має швидко встановлювати й розривати контакти з матриксом. Це здійснюється за рахунок того, що інтегрини здатні переходити з активного стану (за якого контакт устновлюється) у неактивний (за якого контакт утворитися не може) за рахунок алостеричної регуляції. Крім того, зв'язування лігандів з одного боку мембрани змінює здатність інтегринів з'єднуватися з іншими молекулами на її іншому боці. У згорнутому, неактивному стані інтегрину внутрішньоклітинні домени його α і β -ланцюгів розміщені близько і зв'язані один з одним. Коли конформація позаклітинного домену змінюється, цей контакт втрачається і внутрішньоклітинні частини цих ланцюгів разом із трансмембранними домонами розходяться. Унаслідок цього відкривається сайт зв'язу-

вання таліну, що міститься на кінці β -ланцюга, що, у свою чергу, приводить до збирання актинових філаментів. Так відбувається своєрідна активація ззовні.

Процес може відбуватися й у протилежному напрямку. Талін конкурує з α -ланцюгом інтегрину за сайт зв'язування з β -ланцюгом. Приєднання таліну до останнього розриває зв'язок між двома внутрішньоклітинними фрагментами ланцюгів, і вони розходяться. Унаслідок цього позаклітинна частина інтегрину набуває витягнутої, активної конфорації.

Така активація зсередини запускається внутрішньоклітинними регуляторними молекулами, наприклад фосфоінозитидом PIP_2 , здатним активувати талін, у результаті чого той міцно зв'язується з інтегриновим β -ланцюгом. Внутрішньоклітинні сигнальні молекули, у свою чергу, виробляються у відповідь на сигнали, отримані ззовні через рецептори іншого типу (наприклад, рецептори, що зв'язані з G-білками або тирозинкіназні рецептори). Отже, такі сигнали можуть керувати активацією інтегрину, і навпаки, активація інтегрину при прикріпленні до матриксу може впливати на рецепцію інших сигналів.

Як і інші молекули клітинної адгезії, інтегрини мають низьку спорідненість до ліганду, проте мають високу концентрацію на поверхні клітини: міцність з'єднання забезпечується за рахунок кластеризації молекул, що формують бляшку, на якій "стають на якір" численні філаменти цитоскелета.

Селектини

Селектини є поверхневими вуглеводзв'язувальними білками (*лектинами*), які беруть участь у встановленні різних тимчасових міжклітинних адгезійних взаємодій у кровотоці. Їхньою основною функцією (як мінімум у хребетних) є участь у запальних реакціях та в управлінні рухом лейкоцитів. Селектини контролюють зв'язування лейкоцитів із клітинами ендотелію, що вистилають кровеносні судини, у такий спосіб дозволяючи їм залишати кров'яне русло і надходити у тканину.

Селектин є трансмембранним білком із консервативним лектиновим доменом, який зв'язується з певним олігосахаридом на поверхні іншої клітини (рис. 4.25). Відомо як мінімум три типи селектинів: L-селектини, розташовуються на поверхні лейкоцитів, P-селектини – на тромбоцитах та ендотеліюцитах (локально активованих запальною реакцією) і E-селектини, які виявляються на активованих ендотеліальних клітинах.

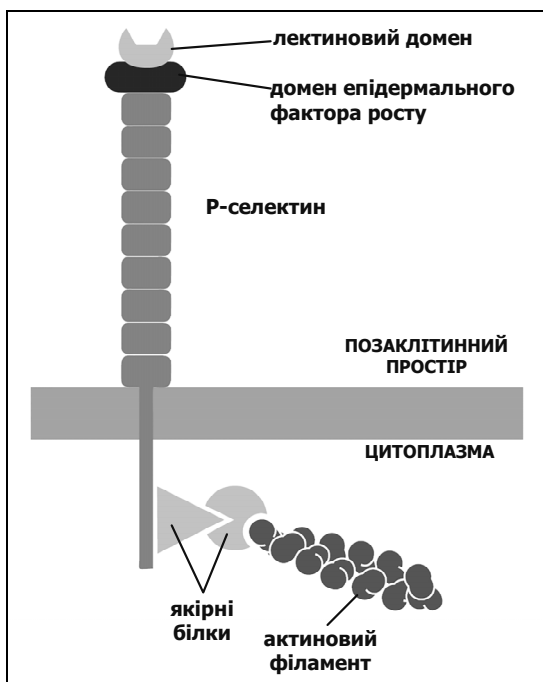


Рис. 4.25. Структура P-селектину
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2014, зі змінами)

Слід відзначити, що селектини працюють не поодинокі, а в кооперації з інтегринами, які підсилюють зв'язок клітин крові з ендотелієм. Міжклітинні контакти, у формуванні яких беруть участь і селектини, і інтегрини, є *гетерофільними* (зв'язок здійснюється між молекулами різного типу). При цьому

селектини зв'язуються з олігосахаридами глікопротеїнів або гліколіпідів, тоді як інтегрини – з певними білками.

Селектини й інтегрини діють послідовно, дозволяючи лейкоцитам залишати кровоток і надходити у тканину. Перші, локалізовані в плазмолемі ендотеліоцитів, зв'язуються з олігосахаридами на поверхні лейкоцитів, унаслідок чого вони прикріплюються, проте не міцно, до стінки кровоносної судини (селектини опосередковують слабкі адгезійні взаємодії, оскільки їхній лектиновий домен має низьку спорідненість до свого олігосахаридного ліганду). Потім у плазматичній мембрані лейкоцита активується певний інтегрин, здатний зв'язатися із специфічним білком – імуноглобуліном на мембрані ендотеліальної клітини. Утворений зв'язок є міцним, саме він і дозволяє лейкоциту залишити кров'яне русло (рис. 4.26).

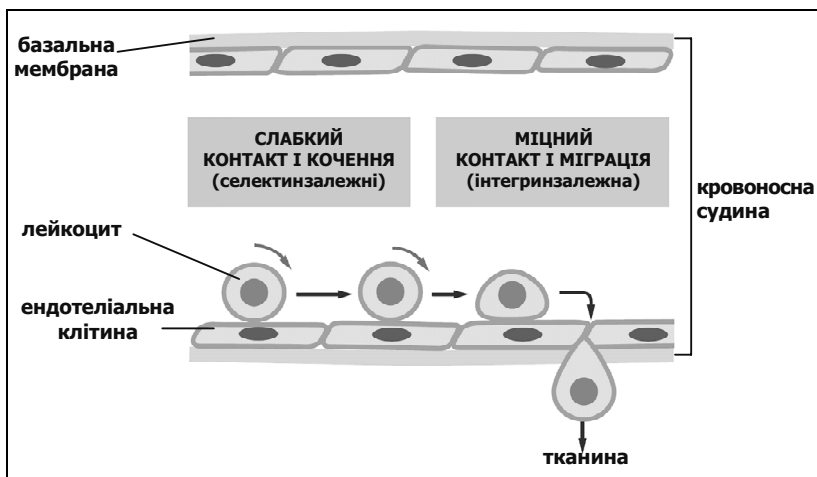


Рис. 4.26. Роль селектинів та інтегринів у міграції лейкоцитів із кровоносної судини у тканину. Схема
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2014, зі змінами)

Імуноглобуліни

Білки суперродини імуноглобулінів (Ig), великої і древньої родини поверхневих молекул, містять один або декілька позаклітинних Ig-подібних доменів, характерних для молекул антитіл.

Вони виконують цілий ряд "не імунологічних" функцій. Так, основні білки ендотеліальних клітин, які розпізнають інтегрини лейкоцитів (див. вище), – ICAM (intercellular cell adhesion molecules, міжклітинні білки клітинної адгезії) і VCAM (vascular cell adhesion molecules, білки адгезії клітин судин) – є представниками цієї суперродини. Вони опосередковують формування гетерофільних зв'язків, тоді як інші Ig, зокрема NCAM (neural cell adhesion molecules, молекула адгезії нервових клітин), гомофільних (рис. 4.27).

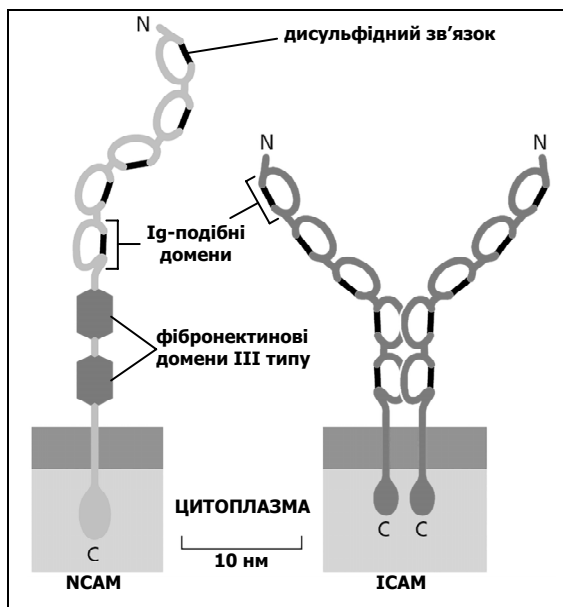


Рис. 4.27. Представники суперродини імуноглобулінів. У NCAM показано лише білковий остов (до нього часто приєднуються ланцюги полісахариду – сіалової кислоти, яка завдяки своєму негативному заряду може суттєво впливати на адгезію). ICAM гетерофільно зв'язується з інтегрином на поверхні лейкоцитів (за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2014, зі змінами)

Клітини при взаємодії із сусідами зазвичай використовують декілька різних білків адгезії. І хоча кадгерини і білки Ig-родини часто експресуються в одних і тих самих клітинах, контакти,

опосередковані кадгеринами, є міцнішими, і саме вони відповідають за з'єднання клітин між собою, відособлення груп клітин при утворенні тканин та підтриманні їхньої цілісності. Молекули, подібні до NCAM, як вважають, беруть участь лише в тонкому "підстроюванні" цих адгезійних взаємодій при розвитку та регенерації тканин, а також у формуванні особливих контактів.

Роль молекул адгезії у формуванні синапсів

Складні молекулярні системи адгезії грають особливо важливу роль у нейронах. Вони, поряд із хемоатрактантами й розчинними сигнальними факторами, визначають напрям росту аксона й "керують" утворенням специфічних нервових з'єднань. Крім інших молекул, у цих процесах велике значення мають білки адгезії із суперродини імуноглобулінів. Так, у дрозофіли білок Fasciclin 3 (споріднений NCAM) дозволяє конусам росту нейронів розпізнавати свої цілі при наближенні до них. Ці білки тимчасово експонуються на поверхні певних рухових нейронів та на поверхні м'язових клітин, які вони іннервують. За відсутності ж білка Fasciclin 3 мотонейрони нездатні розпізнати свої цільові м'язові клітини та сформувати з ними синапс.

Подібну роль білки родини імуноглобулінів відіграють і в хребетних. Так, представники підродини Sidekicks експресуються у різних шарах сітківки, формують синапси між нейронами, які виробляють один і той самий білок цієї підродини (опосередковують синаптичні з'єднання шляхом гомофільного зв'язування за принципом відповідності).

Важливо підкреслити, що молекули адгезії, залучені до формування синапсу, ні в якому разі не вичерпуються білками Ig-суперродини.

Щоб утворити синапс, пре- і пост синаптичні клітини мають не лише розпізнати одна одну й установити контакт. Їм потрібно також зібрати складну систему сигнальних рецепторів, іонних каналів, синаптичних пухирців, стикувальних білків та інших компонентів. Апарат синаптичної передачі сигналу не міг би існувати без молекул клітинної адгезії, які міцно з'єднують пре- і постсинаптичну мембрани і допомагають утримувати всі деталі механізму передачі сигналу в їх-

ньому "правильному" положенні. Так, кадгерини зазвичай сконцентровані точно на периферії синапсу, а також безпосередньо в зоні взаємодії мембран (це саме стосується і білків суперродини імуноглобулінів та інших молекул адгезії).

Виникає запитання, як молекули адгезії пов'язані з іншими компонентами синапсу та як утримують їх у "правильному" положенні. Вважається, що головна роль у цьому належить **білкам скефолду**. Ці внутрішньоклітинні молекули складаються із серії білокзв'язувальних доменів, яка містить зазвичай декілька **PDZ-доменів** – сегментів довжиною ~ 70 амінокислотних залишків, здатних розпізнавати і зв'язувати С-кінцеві внутрішньоклітинні хвости певних трансмембранних молекул (рис. 4.28).

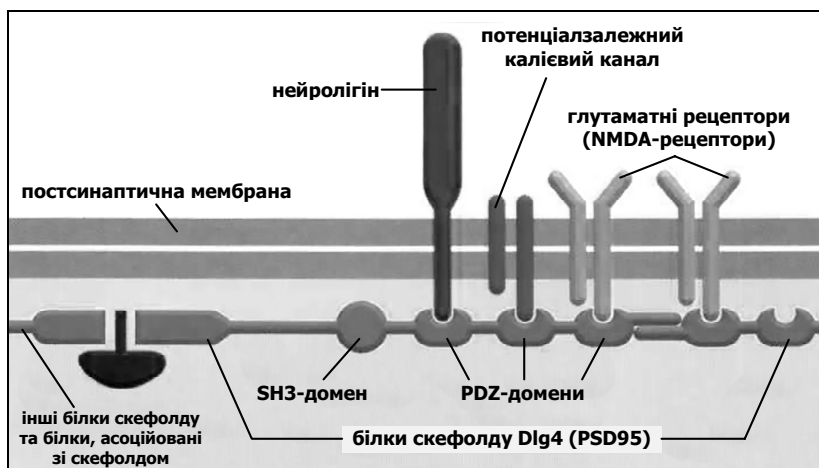


Рис. 4.28. Доменна структура білка скефолду Dlg4.

За допомогою своїх численних білокзв'язувальних доменів білок скефолду з'єднує різні складові синапсу. З'єднуючись з іншими молекулами скефолду (однаковими та/або різними) створює мережу, що об'єднує всі компоненти синапсу (за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2013, зі змінами)

Один домен білка скефолду може, припустімо, зв'язуватися з білком адгезії, інший – з іонним каналом-рецептором або приєднуватися до білка, що регулює екзо- чи ендоцитоз або забезпечує зв'язок із цитоскелетом. Більш того, одна молекула білка

скефолду може з'єднуватися з іншою з утворенням складної мережі. Декілька сотень різних білків беруть участь у її формуванні, причому всі компоненти синапсу займають у ній своє, "відведене" власне їм, місце (рис. 4.29).

Зауважимо, що білки скефолду беруть участь також у формуванні структур, не пов'язаних із синапсами та синаптичною передачею. Так, вони відіграють суттєву роль у всіх процесах організації епітелію, формують замикальні з'єднання між клітинами, "керують" полярністю клітин і навіть залучені до контролю проліферації.

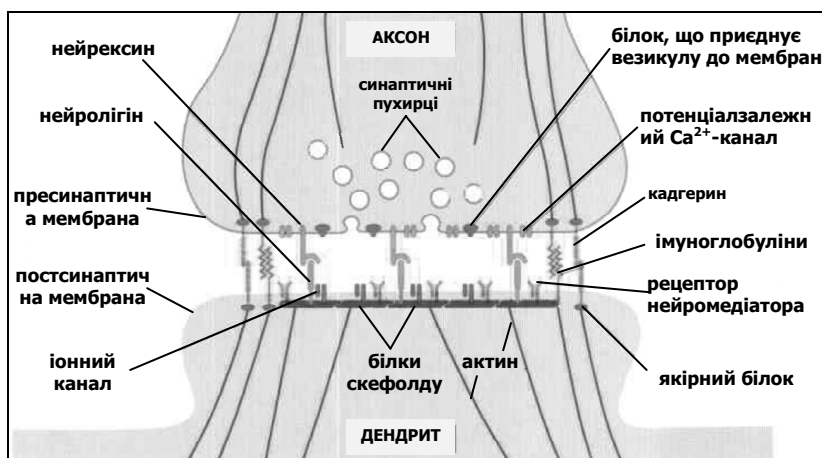


Рис. 4.29. Будова синапсу. Схема

(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2013, зі змінами)

ЗАМИКАЛЬНІ З'ЄДНАННЯ

Усі епітелії структурно поляризовані (мають базальний та апікальний бік, про вже йшлося вище). Те саме стосується і окремих епітеліальних клітин: їхня базальна частина, прикріплена знизу до базальної мембрани, відрізняється від апікальної, доступної зовнішньому середовищу (при цьому своїми бічними, латеральними, поверхнями епітеліоцити щільно прилягають один до одного). Будова нерозривно пов'язана з

функцією: епітелії працюють як селективні бар'єри проникності, відділяючи рідину, що проникає у тканину з базального боку, від рідини іншого хімічного складу, яка намагається проникнути з апікального. Ця бар'єрна функція потребує з'єднання сусідніх клітин у епітеліальному пласті за допомогою контактів так, щоб молекули не мали можливості вільно через нього рухатися. Така функція й покладається на замикальні з'єднання. Більш того, ці з'єднання, крім того, що "герметизують" простір між сусідніми клітинами, послуговуються "парканом", який відокремлює зони на плазмолемі кожної клітини, запобігаючи дифузії апікальних білків (білків-переносників, насосів тощо) у базальну частину, і навпаки.

Замикальні з'єднання, виявлені в епітелії хребетних, назвали *щільними контактами*. Такі контакти є непроникними для макромолекул, проте залишаються проникними для малих молекул, і така проникність є різною для різних епітеліїв. Так, в епітелії тонкого кишечника щільні контакти у 10 000 разів більш проникні для неорганічних іонів (наприклад, Na^+), ніж в епітелії сечового міхура. Ці відмінності відбивають різницю у білках, що формують з'єднання. Більш того, епітеліоцити здатні тимчасово змінювати властивості своїх щільних контактів, забезпечуючи посилене надходження розчинених речовин і води через "проломи" в бар'єрі (це особливо важливо, скажімо, при поглинанні амінокислот і моносахаридів із порожнини кишечника).

Щільні контакти є фактично мережею розгалужених ланцюжків, яка обплітає апікальний кінець кожної клітини по колу. Кожний ланцюжок складається із серії трансмембранних білків адгезії, локалізованих у кожній із взаємодіючих клітин. Позаклітинні домени цих білків прямо зчіплюються один із одним, перегороджуючи міжклітинний простір (рис. 4.30).

Основними трансмембранними білками таких ланцюжків є *клаудини*, необхідні для утворення й функціонування щільних з'єднань. Родина клаудинів є численною (у людини їх нараховується 24 різновиди). Вони вироблюються в різних комбінаціях у різних епітеліях, що надає кожному епітеліальному пласту свої властивості проникності. Вважають, що клаудини утворюють міжклітинні

пори – селективні канали, що дозволяють певним іонам перетинати бар'єр, утворений щільним з'єднанням, з одного боку на інший.

Крім клаудинів до складу щільних контактів входять трансмембранні білки *оклюдини* (функція невідома) і *трицелюлини* (споріднені оклюдину).

Утворюючи мережу ланцюжків, що герметизують, клаудини та оклюдини локалізовані у клітині в певному місці. Зазвичай їхня мережа знаходиться трохи апікальніше адгезійних контактів і десмосом, які механічно зв'язують клітини. Усю сукупність цих контактів називають *сполучним комплексом* (рис. 4.31).

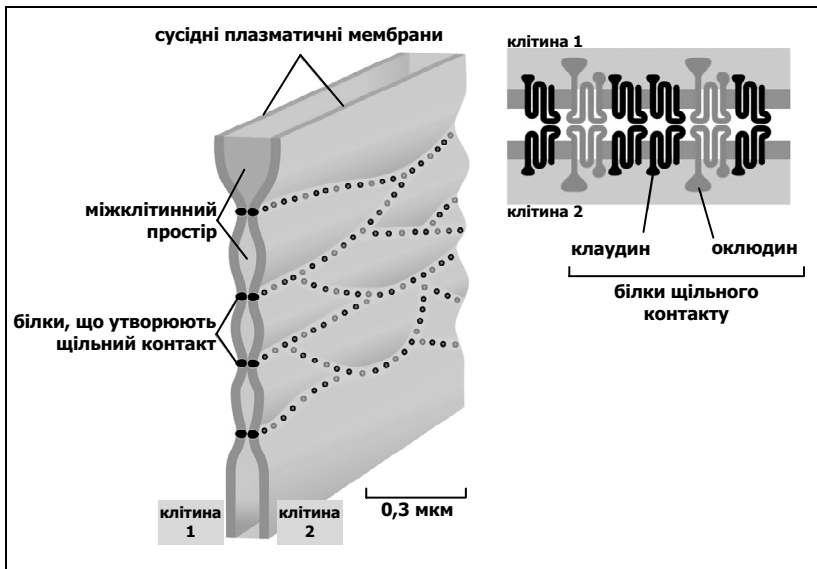


Рис. 4.30. Сучасна модель будови щільного контакту
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2014)

Компоненти такого комплексу формуються узгоджено. Вважають, що в розташуванні щільних з'єднань відносно інших структур беруть участь внутрішньоклітинні білки скефолду, що належать до родини Тіп (*Tight junction protein*, білок щільного з'єднання), які також називають *ZO-білки* (від лат. *zonula occudens* – замикальна платівка).

У безхребетних, наприклад комах або моллюсків, замикальні з'єднання мають інший вигляд і називаються *септованими контактами*. Як і щільні, ці контакти утворюють безперервну смугу навкруги кожного епітеліоцита, але відрізняються більш регулярною структурою: плазмолемі взаємодіючих клітин з'єднуються за допомогою білків, розташованих паралельними рядами з постійним інтервалом. Проте основні білки септованих з'єднань гомологічні клаудинам хребетних і взаємодіють з білками скефолду аналогічним чином.

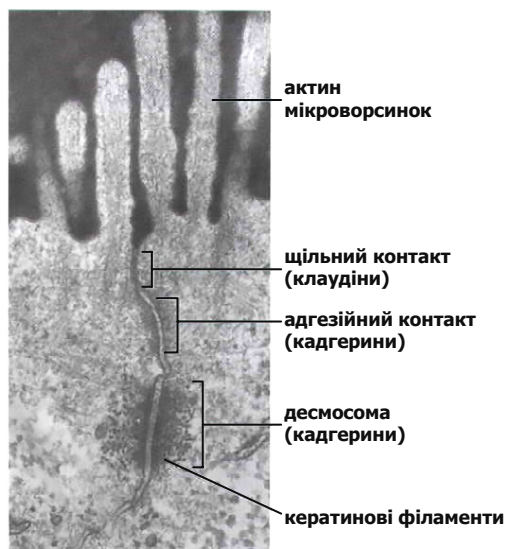


Рис. 4.31. Мікрофотографія сполучного комплексу епітелію тонкого кишечника хребетних
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2013)

Більшість клітин тваринних тканин мають виражену поляризацію. Існує певний набір компонентів, необхідних для формування такої полярності клітин (припускають, що він однаковий для всього тваринного царства). Вважається, що за нормальну полярність відповідають два взаємопов'язані механізми: завдяки одному з них клітина сама по собі "прагне" стати полярною, а другий направляє її вісь полярності відповідно до розташування сусідніх клітин

і базальної мембрани. Другий механізм характерний саме для епітелію, а перший, більш поширений, діє й в інших полярних клітинах.

У випадку епітеліальних клітин фундаментальні "генератори полярності" мають сформувати відмінні між собою апікальний і базальний полюси. Такими молекулярними генераторами є три зв'язані з мембраною білки: Par 3, Par 6 і атипова протеїназа C (aPKC). Перші два є білками скефолду, які містять PDZ-домени і зв'язуються один із одним та з aPKC. Комплекс з цих трьох компонентів має також сайти зв'язування інших молекул, важливих для процесу формування клітинної полярності.

Що ж змушує цю систему молекулярних генераторів полярності правильно орієнтуватися відносно своїх сусідів? Як з'ясувалося, в епітелії комплекс Par 3-Par 6-aPKC збирається в зоні міжклітинних контактів: у хребетних – поблизу щільних, у безхребетних – адгезійних, оскільки білки скефолду, що входять до складу комплексу, зв'язуються з хвостами певних трансмембранних білків адгезії.

КАНАЛОУТВОРЮВАЛЬНІ З'ЄДНАННЯ

Щільні контакти не дають речовинам проходити між клітинами епітелію, фактично виконуючи функцію ізоляції. Інший тип з'єднувальних структур несе протилежну функцію: це своєрідні "містки", по яких речовини здатні проходити з однієї клітини в іншу. Ці містки у тварин (*щілинні контакти*) і в рослин (*плазмодесми*) побудовані по-різному. Проте в обох випадках функції схожі: такі контакти дозволяють сусіднім клітинам обмінюватися невеликими молекулами, але не макромолекулами (у випадку плазмодесм є декілька винятків, про що йтиметься далі).

Щілинні контакти

Щілинні контакти наявні у більшості тканин тварин, включаючи епітелії та сполучні тканини. На мікрофотографіях щілинного контакту можна розрізнити дві плазмолемми, розділені проміжком постійної ширини у 2–4 мкм. Його пронизують

каналоутворювальні білки, що належать до двох різних родин: **конексини** та **іннексини**. У хребетних наявні білки обох родин (проте родина конексинів чисельніша і в людини нараховує 21 представника), тоді як у безхребетних, скажімо у дрозофіли, виявлені лише іннексини.

Білки цих родин, незважаючи на відмінність у амінокислотній послідовності, мають подібну форму й виконують однакову функцію. Канали, ними сформовані, дозволяють неорганічним іонам і малим водорозчинним молекулам проходити з цитоплазми однієї клітини в цитоплазму іншої, тим самим забезпечуючи як електричне, так і метаболічне sprzęження клітин.

Конексини є трансмембранними білками з чотирма трансмембранними доменами. Шість таких білків, збираючись разом, формують *напівканал*, або **конексон**. Якщо конексини (у конексоні) плазматичних мембранах двох контактуючих одна з одною клітин з'єднуються своїми позаклітинними доменами, вони утворюють неперервний водний канал, який з'єднує внутрішній вміст цих двох клітин (рис. 4.32). Щілинний контакт складається з багатьох таких пар конексонів (неперервних каналів) і являє собою фактично молекулярне сито. конексони утримують контактуючі мембрани на фіксованій відстані одна від одної (звідси й назва "щілинний контакт").

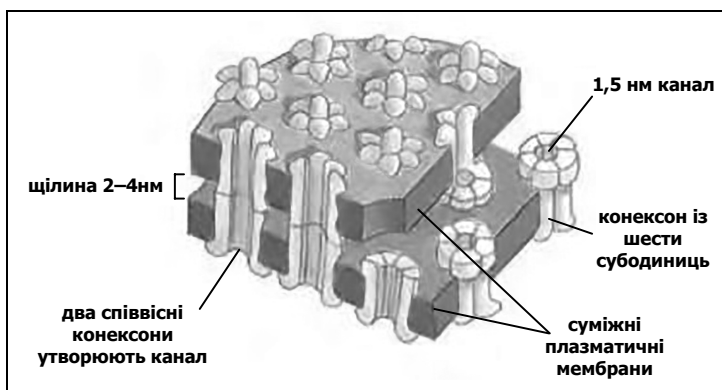


Рис. 4.32. Будова щілинного контакту. Схема
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2014, зі змінами)

Щільні контакти в різних тканинах можуть мати різні властивості, оскільки можуть бути утворені конексинами в різних комбінаціях, які будуть створювати канали з різною проникністю. Більшість клітин виробляє декілька типів конексинів, а "комплект" різних конексинів може утворювати гетеромерний конексон зі своїми особливими властивостями. Крім того, сусідні клітини, що експресують різні конексини, можуть формувати міжклітинні канали, у яких два з'єднані напівканали відрізняються.

Кожне скупчення конексонів є структурою динамічною, яка постійно збирається, розбирається, перебудовується (час життя молекули конексина становить декілька годин) і може включати у себе від декількох одиниць до багатьох тисяч напівканалів. Старі конексони видаляються із центру скупчення і руйнуються (механізм цього невідомий), а нові вбудовуються в плазматичну мембрану шляхом екзоцитозу, подібно до інших інтегральних мембранних білків, а потім дифундують у площині мембрани доти, поки не "натикнуться" на скупчення і не приєднаються до нього. А значить, у плазмолемі на відстані від щільного контакту мають бути конексони, які не є спареними з напівканалами іншої клітини. Такі неспарені канали мають закриту конформацію, що запобігає витоку через них низькомолекулярних сполук.

У тканинах із клітинами, що електрично збуджуються, мета спряження клітин за участю щільних контактів очевидна. Так, деякі нервові клітини електрично спряжені, що дозволяє потенціалам дії швидко поширюватися від клітини до клітини, не "затримуючись" на хімічних синапсах (див. нижче). Це дає перевагу в тих випадках, коли швидкість і надійність передачі сигналу є дуже важливими, або коли декілька нейронів мають "спрацювати" синхронно. У хребетних електричне спряження через щільні контакти, крім того, синхронізує скорочення серцево-м'язових клітин, а також клітин гладенької мускулатури, відповідальних за перистальтику кишечника.

Щільні контакти наявні також і в багатьох незбудливих тканинах: обмін малими метаболітами та іонами допомагає їм координувати діяльність окремих клітин. Щільні з'єднання необхідні, наприклад, у печінці для координації відповіді її клі-

тин на сигнал від нервового закінчення, яке контактує лише з декількома гепатоцитами. Нормальний розвиток фолікулів у яєчнику також неможливий без щільних комунікацій між яйцеклітиною і фолікулярними клітинами, що її оточують. Вважається, що спряження через щільні контакти також відіграє важливу роль в ембріогенезі. У раних ембріонах хребетних (починаючи з восьмиклітинної стадії) більшість клітин електрично спряжені одна з одною. Коли відособлені групи клітин ембріона набувають своїх унікальних рис і починають диференціюватися, вони, як правило, втрачають спряження з клітинами оточуючої їх тканини. Однак усередині кожної групи клітини залишаються спряженими одна з одною і тому поводяться як узгоджений ансамбль, усі учасники якого дотримуються одного шляху розвитку.

Подібно до звичайних іонних каналів, окремі канали щільного контакту не залишаються відкритими постійно (вони переходять із відкритого стану в закритий і навпаки). Більш того, проникність щільних контактів може швидко (за секунди) і оборотно зменшитися, знизивши рН цитоплазми або збільшивши концентрацію вільного Ca^{2+} у цитозолі до великого значення.

Механіка залежності проникності щільних каналів від рН наразі невідома, проте існують дані щодо її Ca^{2+} -залежної регуляції. При пошкодженні клітинної мембрани іони, концентрація яких у позаклітинному середовищі є високою (наприклад, Na^+ або Ca^{2+}) спрямовуються в клітину, а цінні метаболіти – назовні. Якщо пошкоджена клітина зберігає спряження із сусідами, то й вони зазнають небезпечних змін хімічного складу. Проте, великий приток Ca^{2+} у травмовану клітину приводить до негайного закриття каналів щільного контакту, надійно її ізолюючи й запобігаючи пошкодженню інших. Слід зазначити, що щільні комунікації регулюються також за допомогою позаклітинних сигналів.

Плазмодесми

Тканини рослин побудовані за іншим принципом, ніж тканини тварин. Однією із головних відмінностей є те, що переважно всі рослинні клітини замкнені в жорстку клітинну стінку (багату на целюлозу та інші полісахариди). Клітинні стінки сусідніх клітин

міцно скріплені, тому рослинам не потрібні прикріплювальні контакти для утримання клітин на "своєму" місці. Однак необхідність у прямій міжклітинній комунікації залишається. Реалізується вона за рахунок **плазмодесм**, контактів, котрі, як і щілинні, напряду з'єднують цитоплазми сусідніх клітин.

Плазмодесма (майже циліндричний канал діаметром від 20 до 40 нм) вислана плазматичною мембраною, яка без перерви переходить з однієї клітини на іншу. Як правило, в каналі плазмодесми міститься складно побудована структура – **десмотрубочка**, яка є продовженням глЕПР кожної із суміжних клітин (рис. 4.33). Низькомолекулярні сполуки можуть проходити із клітини в клітину по простору між зовнішньою поверхнею десмотрубочки і внутрішньою поверхнею циліндричного каналу, сформованого плазматичною мембраною. Як тільки при поділі клітини на стадії цитокінезу утворюється нова клітинна стінка, у ній одразу формуються плазмодесми. Таке формування відбувається навкруг елементів глЕПР, які в ході цитокінезу опиняються зануреними у клітинну пластинку, що розвивається. Плазмодесми можуть бути сформовані й *de novo* в уже існуючій клітинній стінці. Вони розташовані в ній щільними групами, які називають **поровими полями**. Коли необхідність у плазмодесмах відпадає, вони без проблем можуть бути ліквідовані.

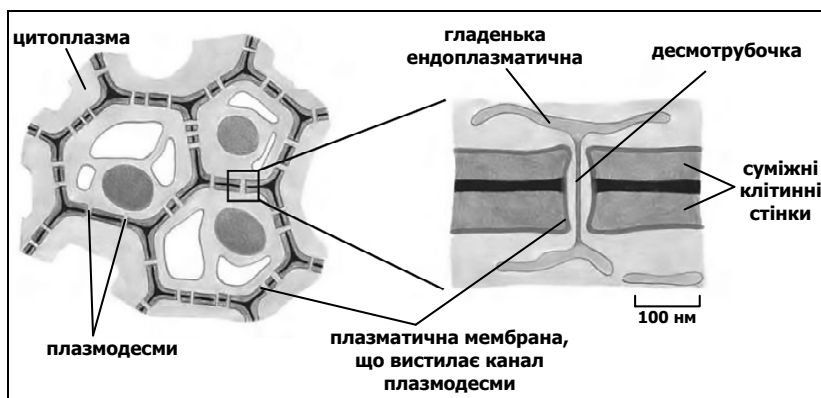


Рис. 4.33. Будова плазмодесми. Схема
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2014, зі змінами)

Незважаючи на відмінність у будові, щільні контакти і плазмодесми діють зазвичай однаково: пропускають подібні за розміром молекули і регулюють сам процес перенесення.

Як уже згадувалося вище, плазмодесми інколи здатні пропускати не лише невеликі за розміром молекули. У процесі формування рослини групи клітин у меристемах пагона й кореня можуть обмінюватися сигналами, які будуть визначати їхню подальшу долю. Деякі білки-регулятори експресії, залучені до цього процесу, переходять із клітини в клітину по плазмодесмах. Вони зв'язуються з певними компонентами плазмодесми і проходять через них усупереч обмеженню за розміром. У деяких випадках мРНК, що кодує цей білок, також може проходити через плазмодесми. Більш того, цей шлях використовують деякі віруси рослин: інфекційна вірусна мРНК або навіть інтактні вірусні частки можуть у такий спосіб проникати із клітини в клітину. Такі віруси продукують білки, які, зв'язуючись з певними структурами плазмодесми, суттєво збільшують ефективний діаметр її отвору (точний механізм на сьогодні невідомий).

КОМУНІКАЦІЙНІ З'ЄДНАННЯ

Фундаментальним завданням нервової клітини, або *нейрона*, є отримання, проведення і передача сигналу. Для виконання цих функцій нейрони часто мають велику довжину. Кожний нейрон складається із тіла (містить ядро) і декількох відростків. Зазвичай один довгий аксон передає сигнали від тіла нейрона до віддалених клітин-мішеней, а декілька більш коротких дендритів виходять із тіла клітини як антени, збільшуючи площу поверхні для отримання сигналів від аксонів інших нейронів. Тіло клітини саме по собі також приймає сигнали. Типовий аксон на своєму дальньому кінці галузиться, передаючи одночасно сигнал багатьом клітинам-мішеням. Дендрити також здатні сильно галузитися: у деяких випадках вони можуть приймати до 100 000 вхідних сигналів на один нейрон.

Мозок людини складається із приблизно 10^{11} нейронів, серед яких можна виділити понад 1000 різних типів. Зрозуміло, що утворення та функціонування такої складної структури є можливим лише за наявності високоспеціалізованої комунікаційної мережі.

На відміну від інших типів клітин, нейрони можуть специфічно контактувати з багатьма різними типами клітин: іншими нервовими клітинами, клітинами залоз, м'язовими клітинами тощо, які можуть бути розташовані при цьому на великій відстані від них. Цей зв'язок відрізняється високою швидкістю й точністю, що забезпечуються спеціалізованими структурними утвореннями – синапсами (грецькою означає "зв'язок", "застібка" або "гачок").

Термін і саме поняття синапсу було введено в біологію англійським фізіологом Чарльзом Шеррінгтоном у 1897 р. Але ще в 1850 р. Клод Бернард припустив, що контакт між нервовою клітиною та її мішенню має бути високоспеціалізованим. Однак незаперечні морфологічні докази існування синапсу були отримані лише в 1911 р. Сантьяго Рамон-і-Кахалом, який визначив два обов'язкові елементи синапсу – пресинаптичне закінчення та постсинаптичну сприймальну ділянку, а також припустив існування третього елементу – синаптичної щілини між першими двома. Понад 30 років потому електронно-мікроскопічні дослідження нервово-м'язового сполучення сформуvalи уявлення про синапс як про спеціалізовану ділянку, що містить малі секреторні (синаптичні) пухирці (близько 40 нм у діаметрі) і специфічні ущільнення, пов'язані з мембраною, про які вже згадувалося вище (рис. 4.34; 4.35). У 1950-х рр., завдяки роботам Палая, де Робертіса, Беннета й інших дослідників, це уявлення поширилось і на центральну нервову систему.

На сьогодні склалося достатньо чітке уявлення щодо структурно-функціональної організації синапсів та їхніх різновидів (власне синапс, нервово-м'язовий синапс, збуджувальний, гальмівний тощо). Сигнальні молекули, що забезпечують синаптичну передачу, називають **нейромедіаторами**.

У синапсі традиційно розрізняють декілька частин: пресинаптичну й постсинаптичну ділянки, а також синаптичну щілину. До складу першої входять **пресинаптична мембрана** й **синаптичні (секреторні) пухирці** з нейромедіатором. У нервовому закінченні локалізовані також мітохондрії, які забезпечують необхідною енер-

гією процес вивільнення нейромедіатору, ендосоми й мембранні пухирці, що залучені до мембранного кругообігу. Виявляють також елементи глЕПР, котрі виконують роль внутрішньоклітинних сховищ іонів Ca^{2+} .

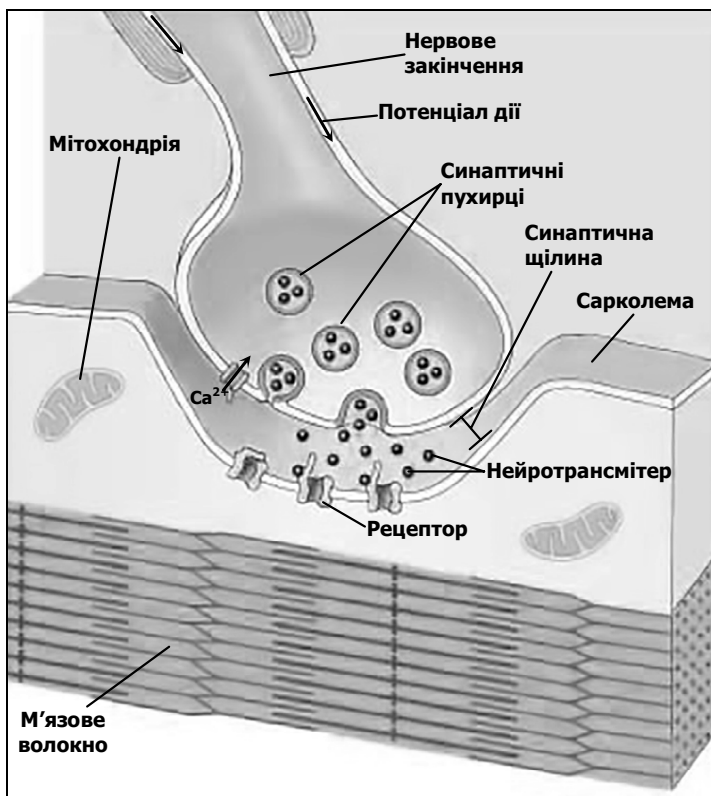


Рис. 4.34. Схема будови синаптичного контакту (за Лодішем Х., Берком А., Мацудаіра П. та ін. 2004)

Нервові закінчення містять два класи секреторних пухирців: власне *синаптичні* та з *електроннощільним центром*. Вони розрізняються як за будовою, так і за своїми властивостями. Синаптичні пухирці – це високоспеціалізовані секреторні утворення, які зберігають і секретують *небілкові* нейромедіатори, такі як ацетил-

холін, гліцин, глутамат, γ -аміномасляну кислоту тощо. Такі нейро-медіатори можуть синтезуватися за допомогою ферментів, що містяться як у тілі нейрона, так і в його закінченнях (їхні запаси в синапсі можуть відновлюватись досить швидко).

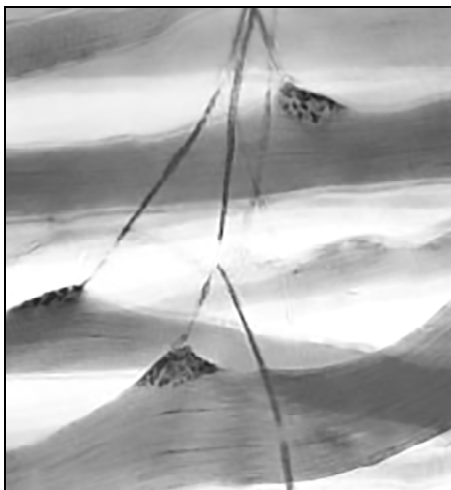


Рис. 4.35. Нервово-м'язовий контакт. Мікрофотографія
(за Лодішем Х., Берком А., Мацудаїра П. та ін. 2004)

Швидкий екзоцитоз синаптичних пухирців відбувається виключно в **активній зоні** в результаті електричної стимуляції нервового закінчення. Різні класи нервових клітин передають різні за важливістю сигнали, але форма сигналу завжди однакова – це зміна електричного потенціалу плазматичної мембрани нейрона. Сигнал поширюється за рахунок електричного збудження, яке виникає в одній частині клітини й поширюється на інші. Така біжуча хвиля електричного збудження відома як **потенціал дії**, або **нервовий імпульс**, може передавати сигнал без затухання від одного кінця нейрона на інший зі швидкістю до 100 м/с і більше (потенціали дії прямо впливають із властивостей катіонних каналів).

Процес передачі сигналу в синапсі починається з того, що нервовий імпульс досягає нервового закінчення і деполяризує його плазмолему. Деполяризація швидко відкриває потенціалзалежні

Ca^{2+} -канали в цій мембрані. Оскільки концентрація Ca^{2+} назовні більш ніж у 1000 разів перевищує концентрацію вільного Ca^{2+} усередині клітини, то іони Ca^{2+} стрімко входять у пресинаптичне закінчення. Це, у свою чергу, запускає Ca^{2+} -залежний екзоцитоз синаптичних пухирці із, скажімо, ацетилхоліном і процес фосфорилування (через Ca^{2+} -кальмодулінзалежні протеїнкінази) білка синапсину мембрани синаптичного пухирця, білка, який у фосфорильованому стані перестає "стримувати" синаптичні пухирці.

По закінченні екзоцитозу мембрани синаптичних пухирців формують мембранні пухирці, що повторно беруть участь у формуванні синаптичних пухирців (відбувається ендоцитоз). У кожному циклі екзо-ендоцитозу вони "перезаряджаються" нейромедіатором завдяки спеціалізованому транспортеру, наявному в їхній мембрані.

Пухирці з електроннощільним центром містять білкові нейромедіатори та аміни. Нейропептиди утворюються на рибосомах грЕПР у тілі клітини, "дозрівають" у апараті Гольджі й переносяться упакованими в мембранні пухирці в нервові закінчення за допомогою *аксонного (антероградного)* транспорту зі швидкістю до 400 мм на добу вздовж шляхів, утворених у відростках мікротрубочками. За своїми властивостями пухирці з електроннощільним центром нагадують секреторні гранули ендокринних клітин, що містять білкові гормони та аміни. Їхній екзоцитоз не обмежується лише активними зонами.

Синаптичні пухирці й пухирці з електроннощільним центром відіграють різну роль у нейронній передачі. Секреція через синаптичні пухирці відповідає за швидку передачу сигналу від точки до точки, тоді як другі залучені переважно до модуляторної передачі сигналу на велику відстань між нейронами й нейронами та іншими клітинами.

Постсинаптична частина представлена *постсинаптичною* мембраною з *рецепторами* (зв'язують екзоцитований пресинаптичним сайтом нейромедіатор), а також мітохондріями й елементами глЕПР. Головною ознакою постсинаптичної ділянки є потовщення мембрани і присутність електроннощільного матеріалу (постсинаптичного ущільнення), який вистеляє її цитоплазматичну поверхню (про що йшлося вище).

Головними функціональними елементами постсинаптичної ділянки є мембранні рецептори, які зв'язують молекули нейромедіатору, що приводить до відкриття іонних каналів. Перший тип рецепторів становлять рецептори, пов'язані з каналами. Це фактично лігандозалежні канали. Приєднання нейромедіатору змінює їхню конформацію так, що в мембрані утворюється відкритий канал для певних іонів. Такі рецептори опосередковують швидкі, прості й короточасні ефекти. Місце їхнього впливу визначено з великою точністю: медіатор, який вивільнюється нервовим закінченням, впливає лише на одну постсинаптичну клітину. До цієї групи належать рецептори ацетилхоліну, глутамату, γ -аміномасляної кислоти та гліцину.

Другий тип рецепторів – неканальні білки, які після приєднання нейромедіатору запускають каскад ферментативних реакцій, що приводить до утворення внутрішньоклітинних вторинних посередників. Останні викликають зміни в постсинаптичній клітині, у тому числі й модифікацію іонних каналів клітинної мембрани. Такі рецептори опосередковують повільні, складні та тривалі ефекти. У цьому випадку медіатор, вивільнюваний нервовим закінченням, може впливати одночасно на декілька клітин, розташованих поблизу. Рецептори, не зв'язані з каналами, виконують нейромодуляторну роль у синаптичній передачі: вони впливають на швидкі відповіді, опосередкованої рецепторами, пов'язаними з каналами, що локалізовані в тій же клітині.

Деякі небілкові нейромедіатори, наприклад глутамат, можуть зв'язуватись з рецепторами обох типів, викликаючи і швидку відповідь, і модуляторний ефект. Білкові нейромедіатори зв'язують тільки другий тип рецепторів. Активація рецепторів обох типів викликає послідовність реакцій, таких як фосфорилування ферментів і білків, що приводить до радикальних змін мембрани, цитоскелета й метаболізму як у постсинаптичній ділянці, так і в усій клітині-мішені в цілому. Означені зміни можуть бути як короточасними, так і досить тривалими.

Проміжок між пре- та постсинаптичними мембранами, ширина якого становить 20–35 нм, називають **синаптичною щілиною**. У цю щілину із синаптичних пухирців і вивільнюється нейромедіатор. Він швидко дифундує через щілину й викликає

електричні зміни в постсинаптичній клітині, зв'язуючись із медіатор-залежними іонними каналами (в її мембрані) та відкриваючи їх, або спричинюючи нейромодуляторний ефект. Після секреції нейромедіатор швидко видаляється: його або знищують спеціалізовані ферменти синаптичної щілини, або він захоплюється назад нейроном, що його виділив, чи гліальними клітинами. Зворотний захват забезпечується різними Na^+ -залежними транспортерами нейромедіаторів. Таке швидке видалення забезпечує просторову й часову точність сигналізації в синапсі. Воно зменшує можливість того, що нейромедіатор вплине на сусідні клітини, які не є мішенями. Синаптична щілина має бути вільною від нейромедіатора до наступного "викиду", щоб часова послідовність повторної сигнальної події могла бути точно переданою у постсинаптичну клітину.

Хімічний синапс. Основною його функцією є передача через синаптичну щілину нервових імпульсів, які надходять до пресинаптичної мембрани. У результаті її деполяризації за дії нервового імпульсу відкриваються потенціалзалежні Ca^{2+} -канали, що приводить до збільшення мембранної провідності для іонів кальцію. Зростання концентрації цих катіонів і є початковим етапом екзоцитозу нейромедіаторів. Медіатор дифундує через синаптичну щілину, зв'язується з рецепторними білками в мембрані постсинаптичної клітини і викликає генерацію постсинаптичних потенціалів. Час від моменту надходження нервового імпульсу до пресинаптичного закінчення до виникнення постсинаптичного потенціалу називають **синаптичною затримкою**.

Електричний синапс. У синапсах з електричним механізмом імпульс із пресинаптичної мембрани на постсинаптичну передається електротонічно. Така передача забезпечується завдяки дуже вузькій синаптичній щілині та наявності в обох мембранах каналів (подібних до щілинних), які й забезпечують проходження іонів з однієї контактуючої клітини в сусідню. У процесі еволюції нервової системи кількість електричних синапсів зменшується. У синапсах зі *змішаним* механізмом передача сигналів відбувається одночасно як через медіатори, так і через потік іонів.

ПАТОЛОГІЯ КЛІТИННИХ КОНТАКТІВ

Зміни комунікації клітин та їхнього "упізнання"

Утворення клітинних агрегатів та розпізнавання "своїх" і "чужих" – необхідна й украй важлива властивість клітинної кооперації. Значну роль у цьому відіграють поверхневі антигени – маркери відповідного типу клітин. Відомо, що при запаленні, регенерації та онкогенезі може змінюватись тип поверхневого антигену та його "доступність" з боку позаклітинного простору. Установлено, що при зникненні характерних для даного типу клітин антигенів можуть з'являтися "ембріональні" та аномальні (наприклад, карциноембріональні) антигени.

Патологія клітинних з'єднань

Пошкодження клітинних з'єднань виявлені за різних хвороб. У пухлинах, зокрема, знайдено кореляцію між змінами структури клітинних контактів і порушенням клітинних зв'язків, більш того, виявлено аномальні міжклітинні контакти. При цьому відбуваються зміни міжклітинної адгезії в бік її послаблення вже на ранніх стадіях онкогенезу.

Розподіл і кількість клітинних контактів на поверхні пухлинних клітин може бути одним із критеріїв характеру росту пухлини. При патології виявлено пошкодження десмосом, у результаті чого виникає дисоціація клітин і накопичення в позаклітинному просторі продуктів метаболізму. Патологічні зміни можуть стосуватися і самих десмосом у вигляді утворення псевдодесмосом (добре розвинена пластинка лише на одній клітині), розходження стиків у зоні десмосом, виникнення десмосом у тих клітинах, де вони за нормальних умов не зустрічаються. Зміни структури десмосом спостерігаються при метаплазії, дисплазії, рості пухлин, псоріазі тощо.

Частіше має місце пошкодження щільних контактів клітин (збільшенням їхньої проникності в результаті розходження контактів), що, у свою чергу, приводить до розладу парацелюлярного транспорту і пошкодження структури гістогематичних бар'єрів (наприклад, при підвищенні внутрішньосудинного гідростатичного тиску, мозковій комі, холестазі, шоці, нефротичному синдромі).

Патологія міжклітинних контактів також проявляється в їхньому збереженні в тих випадках, коли вони повинні зникати у процесі дозрівання клітин. Це відбувається, скажімо, в епідермісі при паракератозі, що проявляється надмірним утворенням рогового шару й пояснюється затримкою дозрівання і гальмуванням злущування клітин. В інших випадках спостерігається розпад тих контактів, які повинні існувати за нормальних умов. При цьому клітини втрачають зв'язок між собою. Розділені клітини мають потовщену плазматичну мембрану. Це явище пов'язано зі зменшенням кількості іонів кальцію в позаклітинній рідині або викликане впливом на клітинну мембрану фосфоліпаз.

Альтерація клітинних контактів закономірно спостерігається у процесі канцерогенезу, вона лежить в основі порушення контактного гальмування проліферації пухлинних клітин, сприяє пухлинній інфільтрації та метастазуванню.

Запитання для самоперевірки

1. Хімічний склад і головні функції міжклітинної речовини.
2. Хімічний склад та особливості структурно-функціональної організації основної речовини матриксу сполучної тканини.
3. Колагени: будова, функції та утворення.
4. Особливості структурно-функціональної організації еластину.
5. Особливості структурно-функціональної організації фібронектину.
6. Структурно-функціональна організація базальної мембрани.
7. Механізми реорганізації та оновлення позаклітинного матриксу сполучних клітин.
8. Молекули адгезії та їхня участь у формуванні клітинних контактів.
9. Кадгерини, інтегрини, селектини, імуноглобуліни: особливості структурно-функціональної організації, роль у формуванні міжклітинних контактів.
10. Роль молекул адгезії у формуванні синапсів.
11. Структурно-функціональна характеристика прикріплювальних контактів.
12. Структурно-функціональна характеристика замикальних з'єднань.
13. Структурно-функціональна характеристика каналотворювальних з'єднань.
14. Структурно-функціональна характеристика комунікаційних контактів.
15. Патологія клітинних контактів.

Рекомендована література

Загальна цитологія і гістологія : підручник / М. Е. Держинський, Н. В. Скрипник, Г. В. Островська та ін. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2010.

Клетки / под ред. Б. Льюина и др. ; пер. с англ. – М. : БИНОМ, Лаборатория знаний, 2011.

Beckerle M. Cell adhesion / M. Beckerle. – Oxford : Oxford University Press. – 2002.

Biology / P. Raven, B. Johnson, K. Mason et al. – N. Y., 2014.

Cooper G. M. The cell: a molecular approach / G. M. Cooper. – N. Y., 2000.

Miner J. H. Extracellular matrix in development and disease / J. H. Miner. – Elsevier Science, 2005.

Molecular Biology of the Cell / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis et al. – N. Y., 2013.

Molecular Biology of the Cell / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis et al. – N. Y., 2014.

Molecular cell biology / H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky et al. – N. Y., 2002.

Molecular cell biology / H. Lodish, A. Berk, A. Kaiser et al. – N. Y., 2013.

Розділ 5

ІНФОРМАЦІЙНІ МІЖКЛІТИННІ ВЗАЄМОДІЇ

Міжклітинна хімічна сигналізація – частина складної системи зв'язку, яка керує основними клітинними процесами і координує їх. Здатність клітин реагувати на навколишнє мікросередовище – основа розвитку, відновлення, гомеостазу нормальної тканини. Помилки в передачі й обробці інформації у клітині лежать в основі багатьох хвороб – різних форм раку, аутоімунних захворювань, діабету, вроджених вад розвитку. Розуміння процесів передачі сигналів клітини дозволяє як керувати фізіологічними процесами, так і ефективно лікувати хвороби.

Здатність сприймати хімічні сигнали з оточення притаманні всім клітинам. Бактерії відчувають наявність і концентрацію поживних або токсичних речовин, відповідно до цього змінюючи свій рух. Багато одноклітинних еукаріотів, крім того, реагують на сигнальні молекули, що секретуються клітинами інших особин, здійснюючи міжклітинну комунікацію – на цьому базуються процеси, наприклад, парування у дріжджів. Проте найвищого рівня складності інформаційні міжклітинні зв'язки досягають у багатоклітинних організмів. Це обумовлено тим, що якщо життєдіяльність клітини прокаріотів і одноклітинних еукаріотів значною мірою здійснюється автономно, поведінка кожної окремої клітини у багатоклітинних рослин і тварин має ретельно контролюватися і регулюватися, щоб задовольнити потреби організму в цілому. Це досягається за допомогою різних *сигнальних молекул*, які секретуються або експресуються на поверхні однієї клітини

і зв'язуються з рецепторами інших клітин, тим самим інтегруючи та координуючі функції багатьох окремих клітин цілісного організму.

Усе різноманіття інформаційних міжклітинних взаємодій вкладається у схему послідовних подій (рис.5.1), концепцію якої запропонував Пауль Ерліх (*концепція сигнал – відповідь*): *сигнал → рецептор → вторинний посередник → відповідь*. У відповідь на специфічний сигнал клітина, як правило, запускає молекулярний каскадний механізм, який реалізує *інтегративний* шлях біохімічної відповіді.

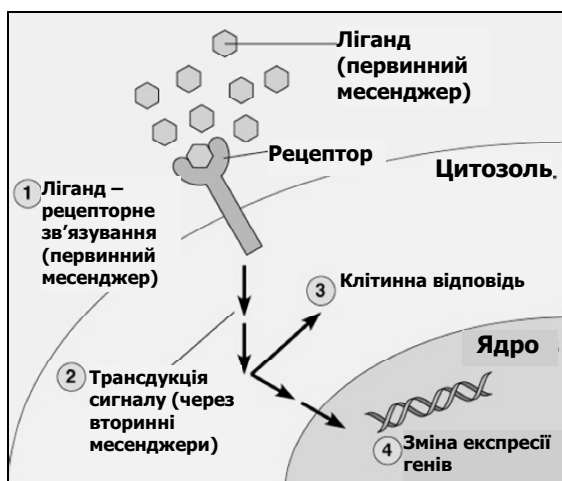


Рис. 5.1. Загальні етапи клітинної сигналізації. Схема

Рецептор (R) – велика (зазвичай білкова) молекула, локалізована на поверхні клітини, клітинної органели або в цитоплазмі клітини, яка специфічно реагує зміною своєї просторової конфігурації на приєднання до неї молекули деякої хімічної речовини (гормону, медіатора, ростового фактора тощо).

Сигнальна молекула (ліганд) – молекула, що зв'язується з рецепторами або іншими молекулами з певним ступенем специфічності та афінності.

З точки зору цитофізіологічних і фармакологічних ефектів, природні та синтетичні ліганди рецепторів також класифікують на **агоністи**, які імітують функцію природного гормону чи регулятора, зв'язуючись з рецептором і індукуючи нормальну відповідь, та **антагоністи**, які зв'язуються з рецептором, але не відповідь індукують. При цьому, займаючи ліганд-зв'язувальний сайт, вони можуть блокувати зв'язування природного гормону або агоніста і, відповідно, знижувати звичайну фізіологічну активність гормону.

Найвідомішими **екзогенними сигнальними молекулами (первинними посередниками)** є гормони, але клітини здані реагувати й на інші біомолекулярні сигнали. Сигнальними молекулами можуть бути, по-перше, **гідрофільні молекули** (наприклад, нейромедіатори, цитокіни, пептидні гормони, антигени), які зв'язуються з рецепторами плазмолемми (**мембранними рецепторами**), і, по-друге, **ліпофільні молекули**, здатні проходити через ліпідний бішар плазмолемми до цитозолу та зв'язуватися з внутрішньоклітинними рецепторами. Транспорт таких ліпофільних сигнальних молекул до клітин-мішеней найчастіше здійснюється за допомогою білків-переносників, які утримують ліганд. Подібні ліпофільні ліганди регулюють клітинні процеси розвитку, диференціювання та метаболізм організму в цілому. До цієї групи відносять стероїди (глюкокортикоїди, мінералокортикоїди, статеві гормони тощо), тиреоїдні гормони, тироксин, ретиноїди, велику групу молекул, структурно подібних до вітамінів А і D.

Слід наголосити, що за винятком незначних відмінностей, засоби передачі сигналу однакові для більшості клітин, а внутрішньоклітинні каскади ферментативних реакцій часто не залежать від типу сигнальної молекули. Коли така молекула зв'язується з клітинною поверхнею, запускається каскад реакцій, які викликають певні внутрішньоклітинні процеси, скажімо, початок проліферації. Підкреслимо, що різні клітини по-різному реагують на один і той самий сигнал: специфічність клітинної відповіді в більшості випадків визначається типом рецептора клітини, яка генерує відповідь (**клітини-мішені**). У клітинах

кожного конкретного типу є характерний набір рецепторів, розташованих або на клітинній поверхні, або в цитозолі, або безпосередньо в ядрі, які слугують для отримання *специфічного* сигналу та запуску *специфічного* каскаду ферментативних реакцій, що й спричиняє клітинну відповідь.

Слід відмітити, що фосфорилування та дефосфорилування є основними механізмами внутрішньоклітинної передачі сигналу. Важливу роль у цих процесах відіграють два типи ферментів – *кінази* й *фосфатази*. Більшість сигналів, що надходить у клітину, обробляється за допомогою кіназ.

Кіназами називаються ферменти, які забезпечують утворення фосфатних ефірів у білкових молекулах. Клітина має понад 500 різних кіназ, але серед них можна виділити два основні типи: *тирозинкінази* (утворюють фосфатні зв'язки на тирозинових залишках специфічних субстратів) і *серинтреонінкінази* (утворюють фосфатні зв'язки на залишках серину й треоніну).

Фосфорилування виконує дві основні функції в процесі передачі сигналу. По-перше, при фосфорилуванні змінюється конформація білків і активуються ферменти, які також можуть виявляти кіназну активність, тобто передача сигналу полягає у хвилеподібній активації білків. По-друге, фосфорилування, особливо тирозину, створює в молекулах білків *стикувальні ділянки*, з появою яких до процесу залучаються нові білки, що взаємодіють з уже активованими елементами сигнального шляху.

Дефосфорилування забезпечується специфічними *фосфатазами*, ферментами, які видаляють фосфати лише з певного субстрату. Рівень процесів фосфорилування у клітині залежить від балансу між активними кіназами й фосфатазами.

Як вважають сьогодні, у процесі еволюції фосфатази практично не зазнали змін. Це означає, що вони залучені до реалізації життєво важливих функцій в усіх еукаріотичних клітинах. На підтвердження цього слугує той факт, що фосфорильовані залишки серину та треоніну містять понад 97 % фосфатів, зв'язаних з білками активованих клітин.

ТИПИ НАДХОДЖЕННЯ СИГНАЛЬНИХ МОЛЕКУЛ ДО КЛІТИН

Для перенесення сигнальних молекул в багатоклітинних системах використовуються різні способи (рис. 5.2), які класифікуються за двома критеріями: за типом секретуючих клітин та відстанню перенесення та дії сигналу.

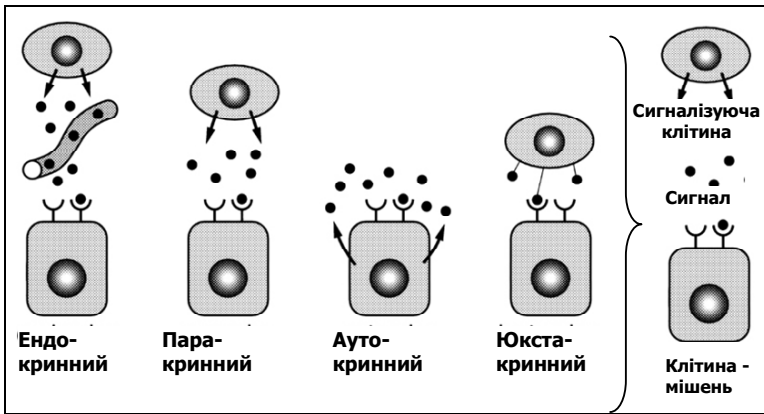


Рис. 5.2. Способи надходження сигнальних молекул до клітин. Схема

ЕНДОКРИННА СИГНАЛІЗАЦІЯ

При *ендокринній сигналізації* гормони, що виділяються в позаклітинну рідину клітинами ендокринних залоз, доставляються до віддалених клітин-мішеней за участю кровотоку (рис. 5.2). Оскільки поширення ендокринного сигналу визначається дифузією та кровотоком, воно відбувається досить повільно: час пошуку гормоном відповідної клітини-мішені вимірюється, як правило, хвилинами.

Специфічність сигналів у ендокринній системі визначається хімічною природою сигнальної речовини та природою рецепторів клітини-мішені: кожний тип ендокринної клітини

секретує у кров свій тип гормону, клітина ж, що має комплементарний цьому гормону рецептор, дає відповідь, характерну для даної клітини.

Ендокринна сигналізація підтримує гомеостаз, опосередковує відповіді організму на різноманітні стимули, регулює його ріст і розвиток.

ПАРАКРИННА СИГНАЛІЗАЦІЯ

Паракринна сигналізація (від гр. *para* – поруч) – здійснюється сигнальними молекулами (гормонами або факторами росту), що виділяються клітинами безпосередньо у міжклітинне середовище і впливають на клітини найближчого оточення, які мають рецептори до даного сигнального агента (рис. 5.2).

Паракринний механізм є головним у процесах міжклітинної сигналізації при загоюванні ран, відновленні тканин і процесах ембріонального та постембріонального розвитку.

Прикладами паракринної сигналізації є контроль проліферації й міграції ендотеліальних клітин судин сусідніми клітинами-періцитами, які оточують капіляри. У свою чергу, ендотеліальні клітини також здатні продукувати паракринний сигнальний агент – оксид азоту (NO), який дифундує в гладеньких м'язах стінки тих самих судин, де викликає їхню релаксацію і розширення кровоносних судин. Паракринні взаємодії між імунними клітинами і фібробластами необхідні для нормального відновлення пошкоджених тканин.

СИНАПТИЧНА СИГНАЛІЗАЦІЯ

Синаптична сигналізація (рис. 5.3) за принципом подібна до паракринної, але здійснюється в особливих структурах – *синапсах*, утворених між клітинами, які продукують сигнал (пресинаптичні нейрони) і постсинаптичними клітинами.

ми-ефекторами, що приймають цей сигнал (м'язові клітини, клітини ендокринних залоз). Сигнальними молекулами в таких випадках виступають нейромедіатори – ацетилхолін, дофамін, гамма-аміномасляна кислота, серотонін тощо.

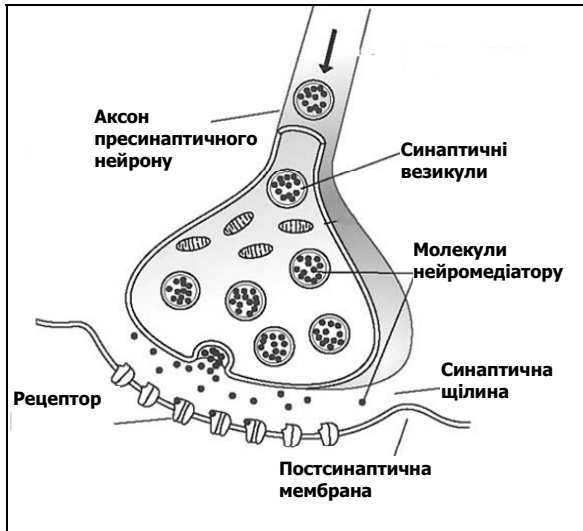


Рис. 5.3. Принцип організації хімічного синапсу як різновиду паракринної сигналізації. Схема

Нейрон секретує нейротрансмітер у синаптичну щілину, інший нейрон/нейрони (чи клітина-мішень) зв'язуються з цим нейротрансмітером і генерують біоелектричний сигнал. Концентрація сигнального ліганду в інтерстиційній рідині є достатньо високою. Так, концентрація ацетилхоліну в синаптичній щілині нервово-м'язового з'єднання становить 5×10^{-4} моль/л. Відповідно, рецептори нейромедіатору в синапсі мають низьку спорідненість до свого ліганду і не можуть помітно реагувати на низькі концентрації нейромедіатору, що надходить шляхом дифузії від сусідніх синапсів. Специфічність визначається тісним контактом між закінченням нервового волокна та специфікою системи "сигнального реагування" клітини-

мішені. Нейромедіатор швидко видаляється із синаптичної щілини спеціальними гідролітичними ферментами або мембранними транспортними білками, які перекачують його назад до нервового закінчення. Цим досягається точність дії сигналу не лише в просторі, але й у часі.

АУТОКРИННА СИГНАЛІЗАЦІЯ

При *аутокринній сигналізації* клітини реагують на речовини, які самі продукують (рис. 5.2). За аутокринним шляхом діють багато факторів росту, він є специфічною аутоstimуляцією і властивий клітинам імунної системи, культивованих клітин, які секретують ростові фактори росту для стимуляції свого власного росту і проліферації. Цей тип сигналізації особливо часто зустрічається в пухлинних клітинах, багато із яких продукують фактори росту в надмірних кількостях, що веде до нерегульованої проліферації самих пухлинних клітин, а також оточуючих їх здорових клітин, і може призвести до значного пухлинного росту.

ЮКСТАКРИННА СИГНАЛІЗАЦІЯ

Юкстакринна сигналізація (контактозалежна) опосередковує взаємозв'язки клітина – клітина або клітина – позаклітинний матрикс і потребує безпосереднього контакту клітин (дифузія сигнальних молекул поза клітиною не відбувається) (рис. 5.2).

Залежно від механізму передачі сигнальної молекули та її взаємодії з ефектором можна виділити 3 різновиди юкстакринної сигналізації:

- взаємодія мембранного ліганду (білок, олігосахарид, ліпід) однієї клітини і мембранного білка-рецептора іншої клітини;

- перенесення відносно невеликих сигнальних молекул між двома клітинами через адгезійні контакти між сусідніми клітинами;
- взаємодія глікопротеїнів позаклітинного матриксу і мембранних білків клітини.

Юкстакринна сигналізація відіграє важливу роль в імунних реакціях, у регуляторних процесах за участю деяких факторів росту, цитокінів та хемокінів. Цей спосіб надзвичайно важливий у процесах розвитку, зокрема, в інформаційних взаємодіях клітин, що перебувають на різних стадіях диференціювання.

Деякі сполуки в різних умовах можуть діяти двома або навіть трьома шляхами міжклітинної взаємодії. Наприклад, невеликі похідні амінокислот, такі як адреналін, можуть функціонувати як нейромедіатори (паракринна/симпатична сигналізація) і як системні гормони (ендокринна сигналізація). Деякі білкові регулятори, такі як епідермальний фактор росту (*EGF*) або інші фактори росту, синтезуються як позаплатматична частина мембранного білка – у такому випадку мембранозв'язаний *EGF* може взаємодіяти з сусідньою ефекторною клітиною при безпосередньому контакті (юкстакринний шлях). При розщепленні протеазою вивільнюється секретований *EGF*, який діє вже як паракринний сигнал на навколишні клітини або навіть як ендокринний сигнал – на віддалені клітини.

КЛІТИННІ РЕЦЕПТОРИ ТА ЇХНЯ УЧАСТЬ У ПРОЦЕСАХ МІЖКЛІТИННОЇ СИГНАЛІЗАЦІЇ

Усі клітини організму постійно обмінюються різною інформацією. Щоб ідентифікувати в інформаційному потоці певну сигнальну молекулу клітина має експресувати специфічний набір рецепторів. Отже, клітина здатна відповісти лише на той сигнал, до якого вона має рецептор. Здатність клітини виконувати або не виконувати певну функцію часто базується саме на наявності або відсутності в неї певного рецептора. Набір рецеп-

торів може змінюватися у процесі розвитку та диференціювання. Експресія або втрата рецептора є запрограмованими процесами клітинної диференціації.

Рецептори є високоспецифічними, їхня специфічність є однією з основних особливостей сигнальної системи. Але різні клітини здатні експресувати однакові рецептори, а отже, і зв'язувати однакові ліганди. Специфічність клітинної відповіді залежить не лише від специфічності ліганду та рецептора, але й від специфічності внутрішньоклітинної ланки передачі сигналу. Так, ацетилхолін викликає скорочення скелетних м'язів, розслаблення серцевого м'яза, посилення секреції секреторних клітин.

У процесах міжклітинної сигналізації важливою є не лише здатність клітини сприймати інформаційний сигнал за участю механізму активації рецепторів специфічним лігандом, але й здатність клітини пригнічувати його.

Існують різні механізми інактивації сигнального каскаду, що використовуються клітинами в процесі їхнього росту та диференціювання, залежно від умов.

Першою ланкою серед таких механізмів є зниження ліганд-рецепторного зв'язування. Воно може бути здійснено за рахунок *руйнування ліганду* або його *секвестрування* (ізоляції) і *десенсибілізації клітини-мішені*, що означає втрату або зниження її чутливості до ліганду.

Зв'язування ліганду з його рецептором є оборотним процесом, оскільки залежить від слабких, нековалентних зв'язків (іонні, вандерваальсові, гідрофобні взаємодії) і молекулярної комплементарності між поверхнею рецептора та ліганду. Ліганд швидко дисоціює від рецептора й може бути деградований. Так, ацетилхолін руйнується ферментом холінестеразою протягом мілісекунд після його вивільнення із нервових закінчень.

Видалення ліганду шляхом секвестрування може відбуватися за рахунок зв'язування з білками, які не є його специфічним рецептором (це можуть бути так звані рецептори-пастки або деякі позаклітинні білки). "Рецептори-пастки" є рецепторами клітинної поверхні, які зв'язують ліганд, але не передають сигнал далі (скажімо, усічені рецептори факторів росту або цитокінів). Аналогічно, розчинні позаклітинні білки, що

містять лігандзв'язувальний домен можуть також ізолювати ліганд. В обох випадках ефект позаклітинного сигналу нейтралізується до зв'язування з рецептором.

Якщо ліганд не може бути деградований або секвестрований, клітина-мішень після тривалої активації може втрачати до нього чутливість. Така **десенсибілізація** може відбуватися кількома способами, основними із яких є інактивація рецептора (блокування його взаємодії з наступними компонентами сигнального каскаду), секвестрування рецептора в ендоцитозних пухирцях (із яких він може бути повернений на плазматичну мембрану) або, зрештою, деградація рецептора в лізосомах. Ці механізми десенсибілізації рецептора, як правило, функціонують у певній послідовності, і перехід від однієї стадії до іншої може залежати від таких факторів, як, наприклад, концентрація ліганду. Так, інактивація рецепторів, асоційованих із G-білками (*GPCRs*, до яких належать, зокрема, адренорецептори – *див. нижче*) може бути здійснена при їхньому фосфорилуванні різними протеїнкіназами. Фосфорильований рецептор потім зв'язується із цитозольним білком арестином, формуючи комплекс, який блокує будь-які взаємодії з компонентами сигнального каскаду і сприяє поєднанню рецептора з клатриновими ямками, викликаючи рецептор-опосередкований ендоцитоз.

У багатьох сигнальних каскадах існують внутрішньоклітинні інактивуючі компоненти, які запускаються за більш-менш тривалої ліганд-рецепторної взаємодії, діючи за принципом негативного зворотного зв'язку.

КЛАСИФІКАЦІЯ РЕЦЕПТОРІВ

Сигнальні рецептори класифікуються в першу чергу за розташуванням, пов'язаним з особливостями їхніх лігандів.

Внутрішньоклітинні рецептори розташовані в цитоплазмі клітини і активуються гідрофобними молекулами-лігандами, які можуть проходити через плазматичну мембрану.

Рецептори клітинної поверхні (мембранні) зв'язуються із зовнішніми (переважно гідрофільними) сигнальними молекулами і перетворюють позаклітинний сигнал у внутрішньоклітинний сигнальний каскад. Розподіл мембранних рецепторів на підродина (підгрупи) ґрунтується на їхніх біохімічних відмінностях і функціональній специфіці.

Основні категорії рецепторів клітинної поверхні включають (рис. 5.4):

- *рецептори, асоційовані з G-білком (G PCRs – G Protein-Coupled Receptors)* – після зв'язування ліганду активують мембранний G-білок, який потім взаємодіє із спеціальним мембранним ферментом, запускаючи сигнальний каскад у цитоплазмі, або з іонним каналом;
- *рецептори з ферментативною активністю* – при зв'язуванні ліганду активується або їхній власний ферментативний домен, або тісно асоційований з рецептором фермент, які, у свою чергу, активують наступні цитоплазматичні ланки каскаду;
- *рецептори, що активують протеоліз-асоційовані сигнальні каскади*. У таких каскадах після формування ліганд-рецепторного комплексу активується протеолітична реакція, у результаті якої вивільнюється до цього зв'язаний фактор транскрипції й запускається експресія відповідних генів;
- *іонотропні рецептори-канали* – зв'язують ліганд і відкривають свій специфічний канал через мембрану, що дозволяє конкретним іонам проходити через нього, унаслідок чого зазвичай змінюється мембранний потенціал.

РЕЦЕПТОРИ ЛІПОФІЛЬНИХ СИГНАЛЬНИХ МОЛЕКУЛ

Хоча більшість сигнальних рецепторів, як правило, розташовані на поверхні клітини, деякі групи рецепторів не вписуються у загальноствановлену модель трансдукції сигналу – це внутрішньоклітинні рецептори, які зв'язують малі або ліпофільні мо-

лекули, такі як стероїдні гормони, здатні перетинати клітинну мембрану. Сигнальні шляхи, що активуються цими рецепторами, є досить простими порівняно з іншими каскадами, проте їм властиві ті самі принципи – зв'язування ліганду, зміна конфорації, посилення сигналу, транслокація у клітині.

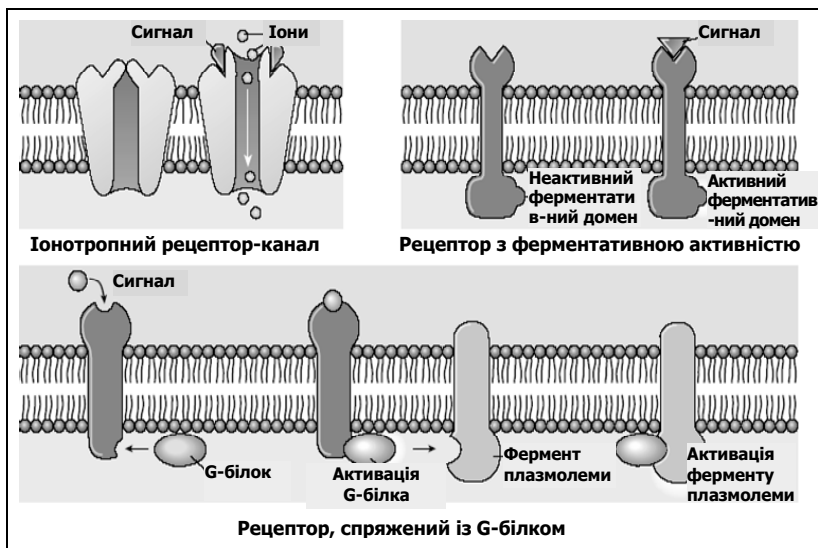


Рис. 5.4. Розподіл мембранних рецепторів на функціонально специфічні підродини. Схема (за Равеном П., Джонсоном Г., Сінгером С. та ін., 2005)

Важливою родиною внутрішньоклітинних рецепторів є **ядерні рецептори**, які включають рецептори стероїдних гормонів, гормонів щитовидної залози, ретиноїдів і вітаміну D. Усі ці ліганди є малими і гідрофобними молекулами, і тому легко можуть дифундувати через плазматичну мембрану. Хоча самі ліганди розрізняються за своєю структурою, усі ядерні рецептори структурно подібні. Вони є типовим прикладом *рецепторів із транскрипційною активністю*, що містять домен, який активує транскрипцію, ДНК-зв'язувальний домен і лігандзв'язувальний домен (рис. 5.5). За відсутності ліганду

рецептори, як правило, є зв'язаними в неактивній конформації в комплексі з білками-інгібіторами (часто це шаперони/білки теплового шоку). Зв'язування ліганду викликає конформаційні зміни, які ведуть до дисоціації білка-інгібітора від рецептора (рис. 5.5).

Далі рецептор може переміщуватися в ядро, якщо він був локалізований у цитоплазмі, або він може бути вже в ядрі. У будь-якому разі, ліганд-рецепторний комплекс тепер може зв'язатися зі специфічними послідовностями ДНК через свій ДНК-зв'язувальний домен. Зв'язування з ДНК також може бути полегшено шляхом об'єднання комплексу рецептор-ліганд з іншими білками ("коактиваторами"). Послідовність ДНК, із якою зв'язується комплекс рецептор – ліганд, є промоторною ділянкою генів-мішеней; у разі гормонів це називається *елементом гормональної відповіді* (HRE – hormone response element).

Деякі ядерні рецептори є протоонкогенами (наприклад, трансформуючий ген *erbA*, що кодує рецептори тиреоїдних гормонів T_3 і T_4), які при мутаціях перетворюються на онкогени, продукти яких порушують генетичну регуляцію клітин-мішеней і ведуть до трансформації клітини.

Деякі рецепторні білки цієї групи здатні зв'язуватися з відповідними елементами гормональної відповіді навіть у неактивному стані. Такі не зв'язані з лігандом рецептори часто діють як репресори гена. При зв'язуванні гормону з лігандзв'язувальним доменом рецептора відбуваються *алостеричні зміни*, які зумовлюють активацію гена. До такої репресорно-індукторної системи належать рецептори естрогенів і гормонів щитоподібної залози.

Слід підкреслити, що ефекти стероїдної сигнальної системи виявляються після характерного *періоду затримки*, яка триває декілька годин: сигнальна система ліпофільних гормонів не активує гени швидкої відповіді. Фактично реакція клітини на збільшення концентрації стероїдних гормонів може тривати протягом декількох годин або днів.

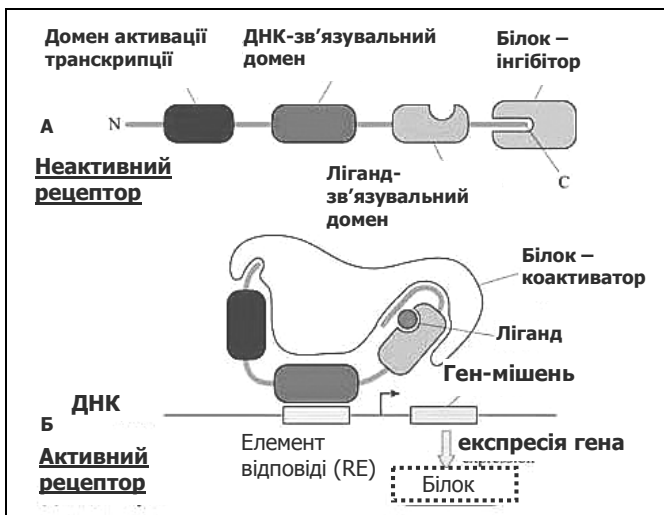


Рис. 5.5. Механізм активації ядерних рецепторів:
 (А) – неактивний рецептор, пов'язаний з інгібуючим білком;
 (Б) – у рецепторі зв'язування ліганду індукує конформаційні зміни у лігандзв'язувальному домені, що дозволяє білку-інгібітору дисоціювати від комплексу, а білку-коактиватору – приєднатися. Це сприяє подальшому зв'язуванню комплексу з елементом гормональної відповіді в ДНК-послідовності промотора та ініціації транскрипції. Схема

РЕЦЕПТОРИ КЛІТИННОЇ ПОВЕРХНІ (МЕМБРАННІ)

Лігандами мембранних рецепторів є переважно гідрофільні сигнальні молекули, які не здатні проникати через гідрофобний бар'єр плазматичної мембрани. Прикладами таких сигнальних молекул є *біогенні аміни, похідні амінокислот* (адреналін, норадреналін, дофамін, серотонін, гістамін, ацетилхолін), *амінокислоти та іони* (глутамат, Ca^{2+} , ГАМК), *пептиди й білки* (ангіотензин, брадикінін, тромбін, бомбезин, ендорфіни, глюкагон, кальцитонін, релізінг-фактори тощо), *нуклеотиди, фактори росту, цитокіни, хемокіни*.

Крім того, через мембранні рецептори можуть діяти й деякі інші речовини і фактори. По-перше, це окремі ліпідні речовини, що є факторами реакцій запалення та інших регуляторних процесів – фактор активації тромбоцитів (*PAF*), простагландини, лейкотриєни, лізофосфатидна кислота анандамін, сфінгозин-1-фосфат (*SIP*) та інші. По-друге, за участю поверхневих мембранних рецепторів реалізується дія таких специфічних сигналів, як кванти світла, одоранти і феромони, антигени бактеріальних стінок тощо.

Рецептори гідрофільних сигнальних молекул належать до групи інтегральних мембранних глікопротеїнів. Вони залучаються до численних процесів, серед яких:

- регуляція іонних каналів під час нервової передачі;
- сигналізація за участю факторів росту – клітинна диференціація, контроль клітинного циклу, ангіогенез, апоптоз, процеси онкогенезу;
- реєстрація присутності інформаційних сигналів (нейромедіаторів, квантів світла, запахових молекул, антигенів, цитокінів, гормонів пептидної природи тощо);
- клітинна адгезія, розпластування, міграція, зміна або підтримання форми клітин;
- ендо- та екзоцитоз;
- інсулінова стимуляція поглинання глюкози;
- регуляція функцій імунної системи;
- процеси розвитку в ембріональному і постембріональному періодах.

Іонотропні рецептори-канали

За структурно-функціональними особливостями такі рецептори є *ліганд-керваними іонними каналами*. Вони представлені родиною споріднених білків і являють собою мультисубодиничні білкові комплекси з декількома транс мембранними доменами.

Лігандами таких рецепторів є нейромедіатори. Зв'язування ліганду (нейромедіатору) з рецептором на зовнішній поверхні плазмолем викликає зміну в просторовій конформації рецеп-

торного білка і відкриває в ньому іонний канал. Це дозволяє певним іонам рухатися у клітину або із неї, унаслідок чого змінюється поляризація клітинної мембрани. Залежно від напрямку зміни мембранного потенціалу, виникає збудження або гальмування системи.

Для таких рецепторів характерні іонна селективність (наприклад, до катіонів, а не аніонів), дуже швидка реакція відповіді (мілісекундний рівень), і, для більшості – швидка десенситизація після впливу агоністів.

Найчастіше в еукаріотичних клітинах зустрічаються канали для іонів Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , Cl^- .

Типовим представником іонних каналів і "еталоном" при вивченні всіх інших іонотропних рецепторів є *нікотинний ацетилхоліновий рецептор* (крім ацетилхоліну, він активується також ніотином) (рис. 5.6). Найбільш досліджений цей рецептор у синапсах, сформованих моторними нейронами і клітинами скелетних м'язів. Активований рецептор здатний пропускати 15 000–30 000 іонів Na^+ або K^+ за мілісекунду, викликаючи деполяризацію ~ 15 мВ від потенціалу спокою м'язів.

Рецептор складається із 5 білкових субодиниць – 2 α , які містять сайт зв'язування ацетилхоліну, і по одній β , δ та γ або ϵ . Амінокислотний склад альфа-спіралей субодиниць (*M2- α -спіралі*), що вистеляють порожнину каналу, визначають його іонну специфічність. Зокрема, в ацетилхоліновому та в інших катіонних рецепторах-каналах в них зосереджені від'ємно заряджені амінокислоти, тоді як в аніонних (гліциновий та ГАМК-рецептор) – позитивно-заряджені амінокислотні залишки.

Рецептори, спряжені з G-білками (GPCRs)

Зв'язування ліганду з рецептором цього типу приводить до активації специфічних G-білків (рис. 5.7). Активовані G-білки, у свою чергу, спричинює зміну активності молекулярних мішеней (аденілатциклази, фосфоліпази, іонних каналів, цГМФ-фосфодіестерази).

G-білки не належать до класичних мембранних білків. Вони приєднані до цитоплазматичного боку плазмолемі за допомогою специфічних ліпідних зв'язків.

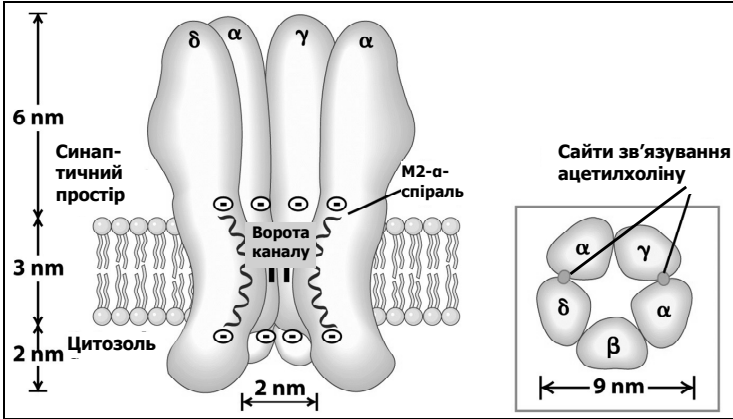


Рис. 5.6. Схематична будова типового іонотропного рецептора – нікотинового ацетилхолінового рецептора (за Лодішем Н. та ін., 2008, зі змінами)

Гетеротримерний G-білок складається із трьох субодиниць – α , β та γ , нековалентно зв'язаних між собою. α -субодиниця є ГТФазою, здатною зв'язувати ГТФ і гідролізувати її до ГДФ. Існують різні форми α -субодиниць, кожна з яких виконує різні функції в процесі передачі сигналу, по-різному впливаючи на ефекторні молекули.

β - і γ -субодиниці утворюють димер, щільно з'єднуючись нековалентними зв'язками. Агрегація α -субодиниці-ГДФ і димеру з β - і γ -субодиниць утворює неактивний комплекс, який прикріплюється до С-кінцевої ділянки рецептора. Зв'язування ліганду з цим рецептором приводить до зміни конформації його цитоплазматичного домену та наступної зміни конформації α -субодиниці. Останнє знижує спорідненість α -субодиниці до ГДФ і, як результат, ГДФ відщеплюється від активної ділянки α -субодиниці.

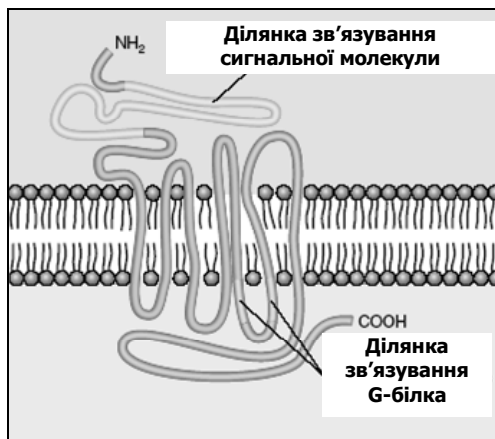


Рис. 5.7. Схема будови рецептора, спряженого з G-білком
(за Равеном П., Джонсоном Г., Сінгером С. та ін., 2005)

На зміну ГДФ до активної ділянки α -субодиниці приєднується ГТФ, чия внутрішньоклітинна концентрація в 10 разів вища за концентрацію ГДФ. Після зв'язування ГТФ α -субодиниця набуває активної конформації й відщеплюється від рецептора й від $\beta\gamma$ -димеру. ГТФ-зв'язана α -субодиниця активує різні ефекторні молекули (наприклад, аденілатциклазу, що утворює цАМФ). α -Субодиниця залишається в активному стані, поки ГТФаза, що входить до її складу, не гідролізує ГТФ до ГДФ. Одразу після гідролізу ГТФ α - і $\beta\gamma$ -субодиниці з'єднуються й повертаються до рецептора. Слід зауважити, що не лише α -субодиниця, але й $\beta\gamma$ -комплекс залучений до регуляції клітинної відповіді: він здатний також активувати ефекторні молекули (наприклад, K^+ -канали при активації мускаринового ацетилхолінового рецептора).

G-білки відіграють ключову роль в активації каскаду ефекторних молекул, до яких належать аденілатциклаза, фосфоліпаза C (ФЛС), фосфоліпаза A_2 (ФЛА $_2$), фосфоінозитид-3-кіназа (ФІ $_3$ -кіназа), кіназа β -адренорецептора (β АРК).

Взаємодія G-білків з аденілатциклазою (рис. 5.8). Хоча в регуляції беруть участь і α -субодиниця, і $\beta\gamma$ -комплекс, механізм регуляції специфічний для кожного ефектора. Так, існує декілька різних форм аденілатциклази, кожна із яких активується різними субодиницями G-білка: або α -субодиницею, або $\beta\gamma$, або обома субодиницями разом.

Аденілатциклаза каталізує утворення молекули вторинного месенджера cAMP.

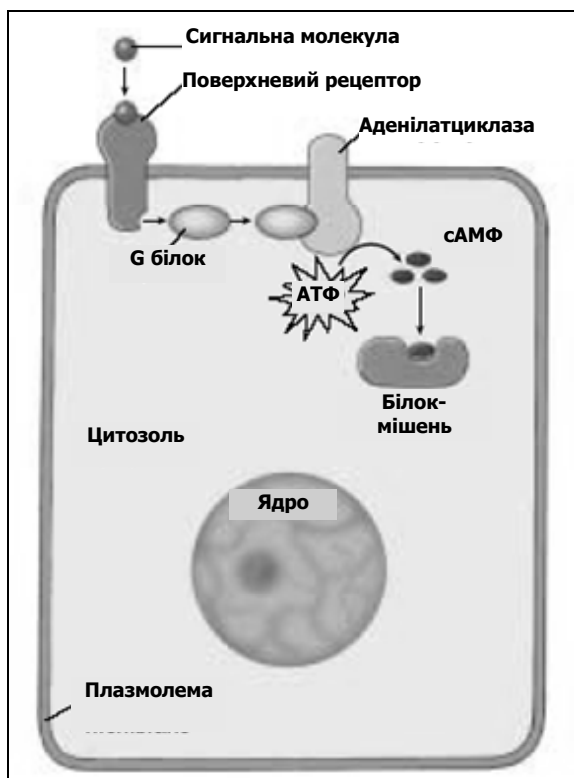


Рис. 5.8. Схема взаємодії G-білка з аденілатциклазою
(за Равеном П., Джонсоном Г., Сінгером С. та ін., 2005)

Взаємодія G-білків з фосфоліпазою C (рис. 5.9). На сьогодні виявлено вже декілька десятків рецепторів клітинної поверхні, через які відбувається передача сигналу за такою схемою: активація G-білка (G_p -білка) → активація ФЛС → швидкий гідроліз мінорних фосфоліпідів плазмолеми (інозитолфосфоліпідів. Серед них найважливішу роль у передачі сигналу грають дві фосфорильовані похідні *фосфатидилінозиту* – *фосфатидилінозитолфосфат* і *фосфатидилінозитол-4,5-біфосфат*, які містяться у внутрішньому ліпідному моношарі плазмолеми) → утворення *інозитол-1,4,5-трифосфату* й *діацилгліцеролу*.

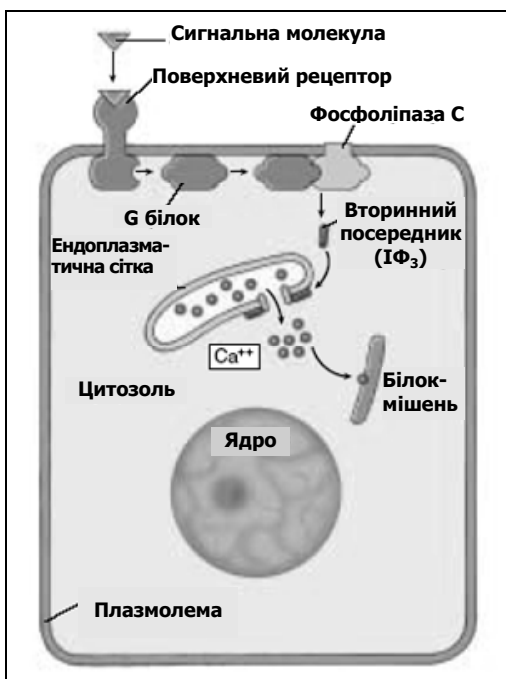


Рис. 5.9. Схема взаємодії G-білків з фосфоліпазою C (за Равеном П., Джонсоном Г., Сінгером С. та ін., 2005)

На цьому етапі шлях передачі сигналу розділяється на дві гілки.

1. Інозитол-1,4,5-трифосфат (невелика гідрофільна молекула) зв'язується з рецепторами на цитоплазматичній поверхні внутрішньоклітинних органел – Ca^{2+} -депо, що приводить до відкриття кальцієвих каналів у їхній мембрані й до викиду Ca^{2+} у цитозоль.

2. Діацилгліцерол (ліпідний компонент фосфатидилінозитолфосфату), у свою чергу, з одного боку, може розпадатися далі з вивільненням *арахідонової кислоти*, необхідної для синтезу *простагландинів* і близьких до них медіаторів ліпідної природи, а з іншого боку, що не менш важливо, разом із фосфоліпідом внутрішнього шару плазматичної мембрани – *фосфатидилсерином* – залучається до активації *протейнінази С*, посилюючи її спорідненість до Ca^{2+} настільки, що вона стає активною вже за низьких концентрацій Ca^{2+} у цитозолі.

Активована С-кіназа, у свою чергу, переносить кінцеву фосфатну групу з АТФ на специфічні серинові або треонінові залишки білків-мішеней, активуючи тим самим, наприклад, Na^+/H^+ -обмінник плазматичної мембрани та іонні канали нейронів, змінюючи їхні властивості, збудливість самої клітини, а в деяких випадках – посилюючи транскрипцію певних генів (у промоторній зоні деяких генів є енхансерна послідовність, що впізнається регуляторним білком, активність якого зростає при активації С-кінази), залучаючись тим самим до принципів внутрішньоклітинних процесів, таких як ферментативна регуляція розвитку нейронів, виділення нейротрансмітерів, активація рецепторів та іонних каналів, синаптична пластичність.

Вторинні посередники – це невеликі молекули, які швидко й у великих кількостях синтезуються в клітині у відповідь на активацію рецептора і слугують для посилення молекулярного сигналу. Вони діють, як правило, протягом дуже короткого часу, після чого інактивуються за допомогою різних механізмів.

Сьогодні виділяють п'ять типів вторинних посередників (передавачів, або *месенджерів*), які є головними у процесах між-

клітинної сигналізації: циклічний аденозинмонофосфат (цАМФ); циклічний гуанозинмонофосфат (цГМФ); діацилгліцерол (ДАГ); інозитолтрифосфат (ІФ₃); кальцій.

цАМФ регулює різні функції клітини, у тому числі експресію різних генів, шляхом активації та пригнічення специфічних клітинних білків за участю цАМФ-залежної протеїнкінази А (ПКА).

цГМФ швидко синтезується *гуанілатциклазою* й руйнується *цГМФ-фосфодіестеразою*. Він залучений до перетворення зорових сигналів у хребетних, реалізації сигналів, пов'язаних із системою оксиду азоту (NO), є регулятором каналної провідності клітини тощо.

ДАГ та інозитолтрифосфат (ІФ₃) утворюються зі "спеціалізованого" мембранного ліпиду, *інозитолфосфоліпиду (фосфатидилінозиту, ФІ)*. ДАГ є внутрішньомембранним компонентом цього ліпиду. Він зв'язується з головною клітинною серинтреонінкіназою – мембранною *протеїнкіназою С (ПКС)* і бере участь у її короточасній (декілька секунд) активації. Активація цього ферменту більш тривалий час відбувається за участю інших ліпаз, активованих агоністами. Однак ДАГ розглядається як найважливіший інгібітор такої активації ПКС.

ІФ₃ – водорозчинний компонент фосфоінозитольного ліпиду. Після відщеплення від ліпиду він надходить у цитозоль, де зв'язується з білками Ca²⁺-каналів, розташованих на внутрішньоклітинних мембранах. При цьому канали відкриваються й Ca²⁺ переходить із внутрішньоклітинних депо в цитозоль.

Кальцій – один із головних вторинних посередників, який бере участь у передачі багатьох типів сигналів у клітину. У клітині іони Ca²⁺ діють як алостеричні ефектори: вони приєднуються до специфічних кальційзв'язувальних білків, змінюючи їхню конформацію й викликаючи тим самим їхню активацію. Більшість клітин містять різні за функціональною спрямованістю цитозольні кальційзв'язувальні білки, які здатні модулювати або медіювати дію іонів Ca²⁺, акцептуючи їх із високою вибірковістю. Ці білки виявляють різноманітну активність, залучаючись до таких ключових процесів у клітині, як проліферація, організація цито-

скелета, секреторні процеси, а в нервових клітинах – регуляція швидкого транспорту речовин, синтез і вивільнення нейротрансмітерів, збудливість мембрани.

Невеликі кислі білки, які належать до родини кальційзв'язувальних, поділяють на два типи – "**тригерні**" та "**буферні**". Одним із найпоширеніших представників білків першого типу, виявленим у всіх тваринних і рослинних клітинах, є **кальмодулін** – невеликий поліпептид (14 кДа), із чотирма Ca^{2+} -зв'язувальними центрами (рис. 5.10). Комплекс Ca^{2+} -кальмодулін не виявляє власної ферментативної активності й діє лише зв'язуючись з іншими білками-мішенями (ферментами, мембранними транспортними білками) і змінюючи їхню активність. Зрозуміло, що саме ці Ca^{2+} -кальмодулінзалежні білки й зумовлюють специфічність відповіді клітини-мішені на підвищення концентрації вільного Ca^{2+} у цитозолі.

Представником кальційзв'язувальних білків "буферного" типу є, наприклад, **кальбіндин**, відкритий понад 20 років тому в нервовій і деяких інших тканинах. Він працює як дуже чутлива система контролю внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} , виконуючи роль кальцієвого буфера. Вилучаючи іони Ca^{2+} із цитозолю, він бере участь у їхньому депонуванні.

Іони Ca^{2+} депонуються в Ca^{2+} -запасальних цистернах глЕПС у стані неміцної асоціації з Ca^{2+} -зв'язувальними білками (такими як **кальсеквестрин**, **кальретікулін** тощо) і вивільнюються в цитозоль за градієнтом концентрації через Ca^{2+} -канали, які регулюються рецепторами інозитолтрифосфату й ріанодину.

Рецептори з ферментативною активністю (каталітичні рецептори)

Каталітичні рецептори – це трансмембранні білки, зовнішня частина яких містить лігандзв'язувальну ділянку, а цитоплазматична – або містить власний ферментативний домен, або тісно асоційована з молекулою ферменту. Через каталітичні рецептори на клітину діють ліганди, що керують значною кількістю процесів, пов'язаних з ростом, поділом, міграцією, виживанням клітин.

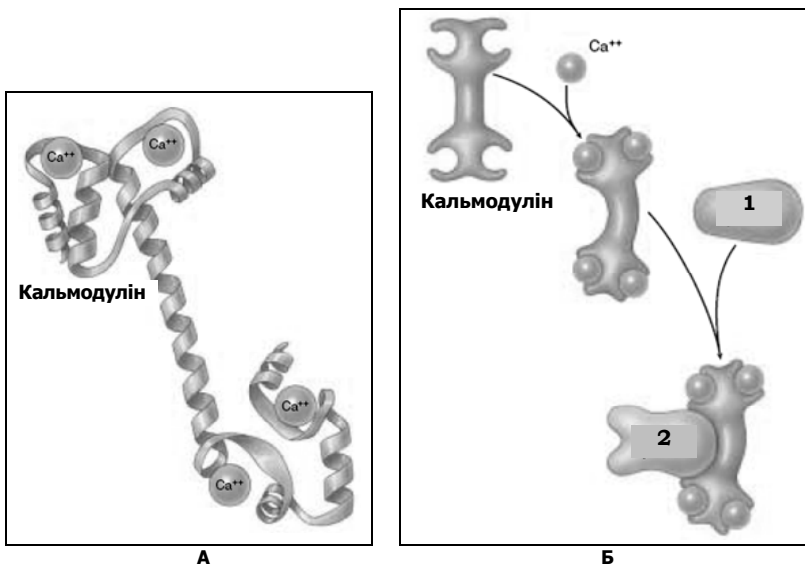


Рис. 5.10. Схема будови (А) і механізму активації (Б) кальмодуліну:

1 – неактивна молекула;

2 – активна молекула

(за Равеном П., Джонсоном Г.,
Сінгером С. та ін., 2005)

Залежно від ферментативної активності й типу ліганду такі рецептори поділяють на:

- **рецепторні тирозинкінази** (RTK), наприклад, рецептори *факторів росту* (фактор росту фібробластів – *FGF*, епідермальний фактор росту – *EGF*, фактор росту з тромбоцитів – *PDGF* та багато інших);
- **рецептори, асоційовані з тирозинкіназами**, наприклад, рецептори *цитокінів* (інтерферони, монокіни, лімфокіни, колонієстимулюючі фактори тощо);
- **рецептори із серин-треонінкіназною активністю**, прикладом яких можуть послуговуватися рецептори *трансформуючих факторів росту* (родина факторів *TGF*).

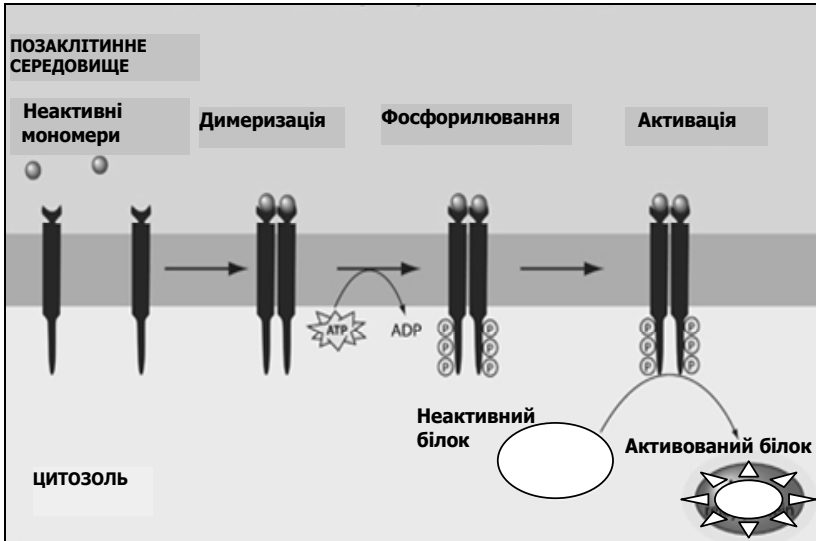


Рис. 5.11. Схема активації рецептора з тирозинкіназною активністю

Приєднання ліганду до рецептора викликає його димеризацію й наступну активацію його кінцевого каталітичного домену, який здійснює аутофосфорилування самого рецептора (це сприяє "посилненню" активності рецептора та приєднанню наступних елементів каскаду), надалі фосфорилуються і тим самим активуються специфічні цитоплазматичні субстрати (рис. 5.11). При цьому утворюються фосфатні зв'язки на тирозинових залишках субстратів (*тирозинкінази*) або на залишках серину і треоніну (*серин-треонінкінази*). При зв'язуванні ліганду з рецептором може активуватися також тирозинкіназа, яка нековалентно зв'язана з поверхневим рецептором (властиве для рецепторів цитокінів).

Зазвичай кінцевою мішенню в таких каскадах є специфічний цитоплазматичний білок, який після фосфорилування і конформаційних перебудов набуває здатності транспортуватись у ядро і виконувати там функції фактора транскрипції. У результаті активується експресія генів, що відповідають за виживання клітин, їхню проліферацію і диференціацію.

ПАТОЛОГІЯ КЛІТИННИХ РЕЦЕПТОРІВ

Оскільки рецептори та асоційовані з ними сигнальні шляхи фактично є основними інструментами керування життєдіяльністю клітини, зрозуміло, що будь-які порушення в їхніх елементах приведуть до серйозних порушень у клітині й в організмі в цілому.

У людини і тварин відома величезна низка вроджених та набутих захворювань і патологій, пов'язаних саме з аномаліями рецепторів і сигнальних каскадів. Вони обумовлені численними мутаціями, що "змінюють" кількість, структуру або функціональну активність рецепторів. Проте не кожна з таких мутацій викликає розвиток захворювання. Деякі мутації можуть проявлятися в ході фармакотерапії – змінюється "реакція" рецептора на застосовані фармпрепарати.

Дисфункції рецепторів можуть виникати на різних етапах синтезу, формування і дозрівання рецепторних молекул. Можна виділити такі етапи:

- 1) ушкодження або повна відсутність гена рецепторного білка чи його промотора;
- 2) порушення стабільності мРНК, етапів трансляції та пост-трансляційних модифікацій, транслокації рецепторного білка з ендоплазматичного ретикулуму;
- 3) порушення у формуванні адекватної структури рецептора в апараті Гольджі;
- 4) порушення процесів взаємодії ліганду і лігандзв'язувального домену.

За функціональними наслідками в генах, які кодують білки рецепторів, а також компоненти відповідних внутрішньоклітинних сигнальних каскадів, мутації поділяють на:

- мутації *посилення функції* – призводять до конститутивної, агоніст-незалежної активації рецепторів: сигнальний каскад активований постійно (незважаючи на відсутність сигналу), що імітує надлишок відповідного гормону (або іншого регулятора) в організмі; призводять до ендокринних розладів;

– мутації втрати функції – за їхньої наявності припиняється передача сигналу на дію відповідних агоністів, що проявляється у резистентності (стійкості) клітини до дії гормону, в організмі виникає стан, який імітує дефіцит даного гормону.

Запитання для самоперевірки

1. Охарактеризуйте сучасну концепцію формування відповіді клітини на позаклітинний сигнал.
2. Дайте визначення процесів фосфорилування та дефосфорилування як важливої ланки внутрішньоклітинної передачі сигналу.
3. Що таке "сигнальна молекула".
4. Які типи сигнальних молекул ви знаєте?
5. Надходження сигнальних молекул до клітини: типи й стратегія реалізації.
6. У чому полягають рецепторні функції плазмолем?
7. Що таке "вторинні посередники" (медіатори)? Які вторинні посередники ви знаєте?
8. Як побудований рецептор біологічної мембрани?
9. Яку хімічну природу має рецептор біологічної мембрани?
10. Механізми інактивації клітиною отриманого сигналу.
11. Рецептори ліпофільних сигнальних молекул: локалізація у клітині та роль у процесах формуванні клітинної відповіді.
12. Рецептори гідрофільних сигнальних молекул: типи, загальні принципи будови, роль у процесах клітинної сигналізації.
13. Дайте визначення поняття "вторинні посередники".
14. Які типи вторинних посередників ви знаєте?
15. Загальна функціональна характеристика ліганд-керованих іонних каналів.
16. Наведіть приклади лігандів рецепторів, що належать до групи ліганд-керованих іонних каналів.
17. Опишіть молекулярно-клітинні процеси, які відбуваються у клітині після зв'язування ацетилхоліну з М-холінорецептором.
18. Якими клітинними реакціями керують сигнали, що надходять через рецептори з тирозинкіназною активністю?
19. Загальна характеристика молекулярної організації рецепторів з тирозинкіназною активністю.
20. Механізм активації рецепторів з тирозинкіназною активністю.
21. Назвіть загальні функціональні властивості рецепторів факторів росту.
22. Охарактеризуйте ліганди рецепторів з тирозинкіназною активністю.

Рекомендована література

Загальна цитологія і гістологія : підручник / М. Е. Дзержинський, Н. В. Скрипник, Г. В. Островська та ін. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2010.

Клетки / под ред. Б. Льюина и др.; пер. с англ. – М. : БИНОМ, Лаборатория знаний, 2011.

Biology / P. Raven, B. Johnson, K. Mason et al. – N. Y., 2014.

Cooper G. M. The cell: a molecular approach / G. M. Cooper . – N. Y., 2000.

Gomperts B. D. Signal Transduction / B. D. Gomperts., I. M. Kramer, P. E. R. Tatham. – Elsevier, 2009.

Molecular Biology of the Cell / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis et al. – N. Y., 2013.

Molecular cell biology / H. Lodish, A. Berk, S.L. Zipursky et al. – N. Y., 2002.

Molecular cell biology. / H. Lodish, A. Berk, A. Kaiser et al. – N. Y., 2013.

Розділ 6

ЦИТОЗОЛЬ. ВКЛЮЧЕННЯ

Цитоплазмою, як уже йшлося вище, називають частину клітини, розташовану між плазмолемою та ядром. Вона може мати різний об'єм у клітинах різних типів. При цьому у функціонально однорідних клітинах об'єм цитоплазми, як правило, корелює з об'ємом ядра: при збільшенні об'єму ядра збільшується й об'єм цитоплазми.

Співвідношення між об'ємами ядра й цитоплазми називають **ядерно-цитоплазматичним співвідношенням** і визначають як

$$\text{ЯЦС} = V_{\text{я}} / (V_{\text{к}} - V_{\text{я}}),$$

де $V_{\text{я}}$ – об'єм ядра, $V_{\text{к}}$ – об'єм клітини.

Уперше існування такої залежності було виявлено в 1908 р. Р. Гертвігом. Ним же був запропонований і принцип визначення ядерно-цитоплазматичного співвідношення.

Цитоплазма є складною системою, до якої належать цитозоль, цитоскелет, органели та включення.

ЦИТОЗОЛЬ

Цитозоль, який називають також *гіалоплазмою* (від грец. *hyalos* – скло), або прозорою плазмою, клітинним матриксом, або основною речовиною, становить близько 55 % від загального об'єму клітини. Він є складною колоїдною системою клітини, її справжнім внутрішнім середовищем.

У світловому мікроскопі цитозоль має вигляд відносно безструктурної речовини, а на електронограмах – гомогенної або тонкозернистої. Тільки деякі хімічні речовини, що входять до складу клітинних включень (див. нижче), виявляються при спеціальному забарвленні.

ХІМІЧНИЙ СКЛАД ЦИТОЗОЛЮ

Для вивчення хімічного складу цитозолю застосовують біохімічні методи. Одержують гомогенат клітин, який шляхом диференційного центрифугування розділяють на фракції. Після осадження всіх важких компонентів клітини залишається рідина, яка і є рідинним компонентом цитоплазми – цитозолем.

Основною хімічною речовиною цитозолю є вода, кількість якої може змінюватись залежно від віку організму та функціонального стану клітин. Так, в ембріональних клітинах кількість води може досягати 90 %, тоді як при старінні її об'єм у клітинах може зменшуватись до 45–55 %.

У цитозолі наявні всі класи біополімерів, а також їхні номери. Близько 20 % цитозолю становлять білки. Здебільшого це ферменти, які каталізують різні реакції проміжного обміну (тому цитозоль і називають *системою проміжного обміну клітини*). Крім ферментів, він містить також білки, які зумовлюють процесинг ("дозрівання") синтезованих білків (наприклад, шаперони, фолдази), стресорні білки, білки елементів цитоскелета (актин, тубулін) тощо. Також у ньому містяться амінокислоти.

У цитозолі можуть накопичуватися ліпіди, в основному нейтральні жири, які утворюють краплиноподібні включення. Присутні також жирні кислоти і спирти.

Вуглеводи представлені моно-, ди- та полісахаридами. Основними моносахаридами є глюкоза, фруктоза, галактоза, рибоза, дезоксирибоза. Полісахариди (крохмаль у рослинних

клітинах і глікоген у тваринних), як і нейтральні жири, утворюють включення.

У цитозолі також присутні різні РНК. Матрична РНК (мРНК) "виходить" із ядра, де вона утворилася, і деякий час перебуває в цитозолі, перш ніж буде "використана" рибосо-мою як матриця для біосинтезу білка. При цьому вона часто зв'язана зі спеціальними білками і формує разом із ними не-великі гранули – *інформосоми*. Рибосомна РНК (рРНК) входить до складу субодиноць рибосом. Транспортна РНК (тРНК) також присутня в цитозолі. Саме в цитозолі до неї приєднуються амінокислоти, які потім "доставляються" в ри-босому для біосинтезу білка (питання біосинтезу білка дета-льно розглянуто в розд. 9).

На сьогоднішній день у цитозолі виявлені й невеличкі кіль-цеві молекули ДНК, так звані *еукаріотичні плазмід*. Меха-нізм їхнього утворення та роль не в кожному випадку зрозу-мілі, проте незаперечним є той факт, що у великій кількості вони присутні у клітинах злоякісних пухлин, а також у бла-стомерах на ранніх стадіях ембріогенезу.

Крім органічних сполук, у цитозолі присутні різні неорга-нічні іони: Na^+ , K^+ , H^+ , Ca^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- , HSO_4^- тощо. Найважливіші також мікроелементи, необхідні для но-рмального функціонування клітини.

Слід підкреслити, що хімічний склад цитозолу відрізня-ється в різних частинах клітини, скажімо, у ділянці розташу-вання апарату Гольджі або мітохондрій (така відмінність є специфічною і направленою на забезпечення функціонування цих органел).

ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЦИТОЗОЛЮ

Цитозоль – це *складний колоїдний розчин*, який містить *дисперсне середовище* (розчинник) і *дисперсну фазу* (дрібні час-тинки – завись у дисперсному середовищі).

Цитозоль є дуже цікавою системою клітини, він може поводитись і як тверде тіло, бо має здатність до пружної деформації, і як рідина, оскільки спроможний до плинності, тобто він може поводити себе як *тиксотропний* гель.

Агрегатний стан цитозолю може змінюватися залежно від дії факторів зовнішнього середовища або внутрішніх потреб клітини. Він може перебувати у двох агрегатних станах: *золю* (більш рідкому) і *гелю* (густішому, драглистому, желеподібному). Коли цитозоль перебуває у стані гелю, то частинки дисперсної фази з'єднані між собою у тривимірну сітку. Дисперсне ж середовище міститься в порожнинах цієї сітки. Таким чином, уся система позбавлена плинності (рис. 6.1). Коли ж цитозоль знаходиться в стані золю, то згадана тривимірна сітка частково руйнується й система в цілому стає більш плинною (рис. 6.1). Цілком зрозуміло, що від стану цитозолю залежить швидкість біохімічних реакцій, які в ньому відбуваються. Більш того, його в'язкість може змінюватися окремо (і різним чином) у різних ділянках клітини, що впливає на реакції, які в них відбуваються.

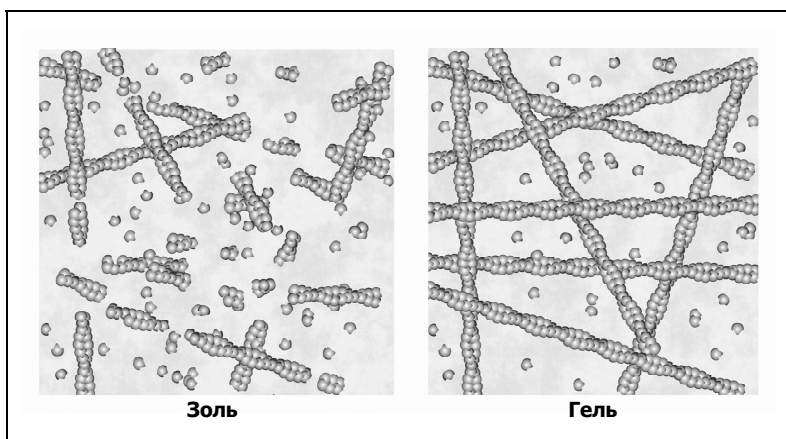


Рис. 6.1. Агрегатні стани цитозолю

Золь-гель-переходи цитозоллю залежать від багатьох факторів: тиску, температури, концентрації деяких іонів (наприклад, Ca^{2+} , Mg^{2+}). Велику роль у таких переходах відіграють цитозольні білки, особливо *актин* (білок цитоскелета, який входить до складу мікрофіламентів; будову цитоскелета детально розглянуто у розд. 7). Його в цитозолі може бути до 10 % від загальної кількості білків. Цей глобулярний білок може бути наявним у двох формах: у вигляді окремих молекул або у вигляді фібрил (зібрані в ланцюжки глобули актину). До регуляції збирання та розбирання актинових мікрофіламентів залучені певні цитоплазматичні білки. Зокрема, білок *фібрин* стабілізує фібрилярну форму актину, а *гельзолін* – глобулярну. У процесі переходу цитозоллю в стан гелю актин полімеризується й утворює тривимірну мережу фібрил, яка є каркасом гелю, що формується (рис. 6.1). Білки, які зв'язують актин, виконують роль зшивок між ланцюгами актину. Крім полімеризації-деполімеризації актину зміни агрегатного стану цитозоллю, імовірно, залежать і від полімеризації-деполімеризації білка *тубуліну*. Він також існує у вигляді окремих молекул, які при полімеризації утворюють мікротрубочки.

Важливим показником цитозоллю є його рН, який у нормі становить близько 6,8. Значення рН у різних його ділянках визначають уведенням у клітину барвників-індикаторів, які змінюють свій колір залежно від концентрації іонів H^+ у середовищі. Цитозоль може виконувати роль буфера. Так, якщо додавати кислоти або луги в міжклітинне середовище або вводити їх мікропіпеткою у клітину, то, за умови її нормального функціонування, рН цитозоллю спочатку змінюється, проте достатньо швидко відновлюється до властивого йому рівня. Підтримка сталого рН є необхідною для нормального перебігу ферментативних реакцій у клітині.

ФУНКЦІОНАЛЬНЕ ЗНАЧЕННЯ ЦИТОЗОЛЮ

Функціональне значення цитозоллю полягає насамперед у тому, що він об'єднує всі клітинні структури й забезпечує їхню хімічну взаємодію. Через цитозоль відбуваються майже всі транспортні процеси та процеси дифузії різних речовин.

Осмотичні й буферні властивості цитоплазми також в основному забезпечуються цитозолем.

У цитозолі локалізовані ферменти, залучені до синтезу й розщеплення амінокислот, нуклеотидів, жирних кислот і вуглеводів, тобто в ньому проходять *реакції проміжного обміну*.

Саме в цитозолі відбувається анаеробне розщеплення глюкози (також фруктози або галактози) – *гліколіз*, унаслідок якого глюкоза розпадається на дві трикарбонові сполуки, а вивільнена енергія "запасується" у двох молекулах АТФ. Трикарбонові сполуки далі можуть переміщуватися в мітохондрії, де відбувається їхнє остаточне окиснення у циклі Кребса до CO_2 і H_2O з "запасанням" вивільненої енергії в 36 молекулах АТФ.

У цитозолі на вільних рибосомах або полісомах (*полірибосомах*, структурах, які складаються з декількох рибосом, з'єднаних з однією молекулою мРНК) відбувається біосинтез (*трансляція*) так званих *білків "домашнього господарства"*, тобто білків для власних потреб цитозолу (ферментів синтезу й розщеплення амінокислот, нуклеотидів, вуглеводів, шаперонів тощо), білків ядра, цитоскелета, пероксисом, певної частини мітохондріальних білків і білків пластид. Біосинтез так званих *білків "на експорт"*, тобто власне секреторних білків і білків, призначених для позаклітинного матриксу, плазматичної мембрани, елементів вакуолярної системи також починається в цитозолі на вільних полісомах. Проте далі біосинтез цієї групи білків переноситься до грЕПС, де й завершується на її цитозольному боці (про що детально йтиметься у розділі "Вакуолярна система"). Слід підкреслити, що в цитозолі відбуваються також реакції активації та приєднання амінокислот до тРНК (які потім "доставляються" в рибосому), без чого біосинтез білка неможливий.

Білки у процесі трансляції або одразу по її закінченні повинні набути правильної вторинної, третинної та четвертинної структури. Від правильної просторової організації (конформації) білка залежить його здатність "нормально" функціонувати. Білки, які мають неправильно згорнутий поліпептидний ланцюг, функціонально неактивні. Процес набуття

поліпептидним ланцюгом "правильної" конформації називається *фолдингом*. Фолдинг білків "домашнього господарства" відбувається у цитозолі. Крім того, цитозоль є місцем, де здійснюються специфічні посттрансляційні модифікації цих білків і за певних умов – їхній специфічний розпад у *протеосомах* (детальніше – у розд. 9).

Також через цитозоль білки "домашнього господарства" доставляються до місць свого функціонування. При цьому білки ядра, пероксисом, мітохондрій та інших органел мають специфічні *сигнальні послідовності* амінокислот, які впізнаються, відповідно, ядерними порами або мембранами згаданих вище органел, що дозволяє цим білкам потрапляти до їхніх порожнин.

ВКЛЮЧЕННЯ

Поряд з органелами та цитозолем ще одним компонентом цитоплазми є включення. Однак вони, на відміну від органел і цитозолу, є непостійними структурами цитоплазми. Виявлені на сьогодні включення різноманітні як за хімічною природою, так і за своєю функцією у клітинах (особливо в рослинних). Існує декілька їхніх класифікацій.

КЛАСИФІКАЦІЯ ВКЛЮЧЕНЬ ЗА ХІМІЧНОЮ ПРИРОДОЮ

За *хімічною природою* включення можуть бути: *білковими* (наприклад, алейронові зерна в рослинних клітинах), *вуглеводними* (крохмальні зерна у клітинах рослин чи глікогенові включення у клітинах тварин), *ліпідними* (жирові краплини в цитоплазмі деяких клітин), *терпеноїдної природи* (включення ефірних олій, смол, каучуку в клітинах ряду рослин), *глікозидами*, *алкалоїдами*, *мінеральними* (кристали оксалату або карбонату кальцію у клітинах деяких рослин).

КЛАСИФІКАЦІЯ ВКЛЮЧЕНЬ ЗА ФУНКЦІОНАЛЬНИМ ПРИЗНАЧЕННЯМ

За *функціональним призначенням* включення бувають трофічними, секреторними, екскреторними, пігментними й захисними.

Трофічні включення

Такими включеннями є різного роду запасні поживні речовини. Живі організми, як відомо, періодично потрапляють в умови, коли вони не можуть отримувати необхідну їм кількість поживних речовин. Тому в ході еволюції вони пристосувалися накопичувати їх про запас, тобто в сприятливий для годівлі сезон живі організми споживають поживних речовин більше, ніж їм потрібно для життєдіяльності. У цьому випадку надлишкові поживні речовини відкладаються у клітинах у вигляді включень, які й називають трофічними.

Деякі органи або частини тіла рослин і тварин спеціально призначені для запасання поживних речовин. У тварин це жирова тканина, у рослин – бульби, потовщені кореневища, ендосперм насіння.

Запасатися можуть різні за хімічною природою речовини: ліпіді, вуглеводи, білки. Так, до трофічних включень належать жирові краплини, крохмальні та алейронові зерна, включення глікогену, жовткові включення тощо.

Пізніше, коли організм опиняється у несприятливих умовах, ці запасені речовини використовуються. Багато трофічних включень містять також яйцеклітини тварин і клітини насіння у рослин. Ці речовини використовуються, відповідно, під час ембріонального розвитку та при проростанні насіння.

Секреторні включення

Це різні за хімічною природою речовини (білки, вуглеводи, глікопротеїни тощо), які, синтезуючись клітиною, виводяться із неї та функціонують поза її межами. До таких включень належать секреторні гранули з травними ферментами у клітинах під-

шлункової залози, а також з гормонами, які "очікують" відповідного сигналу для виведення з клітини.

Найчастіше ці включення існують у вигляді секреторних везикул чи пухирців, оточених однією мембраною. Як правило, такі пухирці відокремлюються від апарату Гольджі, перебувають деякий час у клітині, потім шляхом екзоцитозу виводять свій вміст за її межі.

Екскреторні включення

Різноманітні продукти метаболізму, які залишились на певний час у клітині, є екскреторними включеннями. Приклад – включення смол у клітинах хвойних рослин. У клітинах тварин до екскреторних включень можна віднести постлізосоми (залишкові тільця), які можуть накопичуватися в цитоплазмі. Наприклад, клітина, поглинувши шляхом фагоцитозу якийсь субстрат, перетравлює його в лізосомах. Однак найчастіше субстрат перетравлюється не повністю. Його рештки залишаються в лізосомі, яка тепер називатиметься постлізосомаю, або залишковим тільцем. Ці неперетравлені рештки постлізосома може викинути за межі клітини шляхом екзоцитозу, а може й залишити. В останньому випадку вони стають екскреторними включеннями. Деякі дослідники вважають, що саме в такий спосіб накопичуються включення ліпофусцину в нейронах і деяких інших клітинах при старінні (детальніше ці питання розглянуто в розділі "Вакуолярна система").

Пігментні включення

Різні забарвлені речовини (пігменти), які зустрічаються в цитоплазмі й надають клітині певного кольору є пігментними включеннями. Пігменти можуть бути *ендогенного походження*, тобто утворюватися в самій клітині, або *екзогенного* – надходити до неї ззовні. Відповідно, і пігментні включення поділяють на ендогенні та екзогенні. До пігментних включень відносять зерна меланіну в меланоцитах шкіри, включення ліпофусцину в нейронах, а також інколи гемоглобін, міоглобін, хлорофіл, каротиноїди тощо.

Захисні включення

Утворюються вони у клітинах рослин і тварин і слугують для захисту організму. У деяких рослин накопичуються включення глікозидів або алкалоїдів, які є отруйними для тварин: у такий спосіб ці рослини захищають себе від поїдання тваринами. До захисних можна також віднести включення пігменту меланіну, який міститься у клітинах шкіри й захищає організм від дії ультрафіолетових променів. За допомогою меланінових і деяких інших включень створюється забарвлення поверхні тіла тварини, що допомагає у створенні маскувального забарвлення. Деякі тварини, для прикладу візьмемо восьминога чи хамелеона, мають здатність швидко змінювати інтенсивність і відтінок свого забарвлення саме за рахунок перерозподілу пігментів у клітинах шкіри.

НАЙПОШИРЕНІШІ РІЗНОВИДИ ВКЛЮЧЕНЬ

Охарактеризуємо детальніше включення, які найчастіше зустрічаються у клітинах живих організмів (рис. 6.2).

Алейронові зерна належать до трофічних білкових включень. Це запасні поживні речовини білкової природи. Вони є в клітинах багатьох рослин, та найбільше їх у клітинах насінин.

Білок у таких включеннях може міститися або у вигляді аморфної маси, або мати форму кристалоподібних утворень – *кристалоїдів*. Білкові кристалоїди локалізуються в цитоплазмі або в клітинному соку, інколи – у ядрі, пероксисомах і пластидах. До складу алейронових зерен, окрім білкових кристалоїдів, можуть входити кристали оксалату кальцію, а також *глобоїди* – структури сферичної форми, побудовані з кальцієво-магнієвої солі інозиттрифосфornoї кислоти. Вважають, що глобоїди є джерелом кальцію, магнію й фосфору та сприяють розчиненню запасних білків алейронових зерен під час проростання насіння.

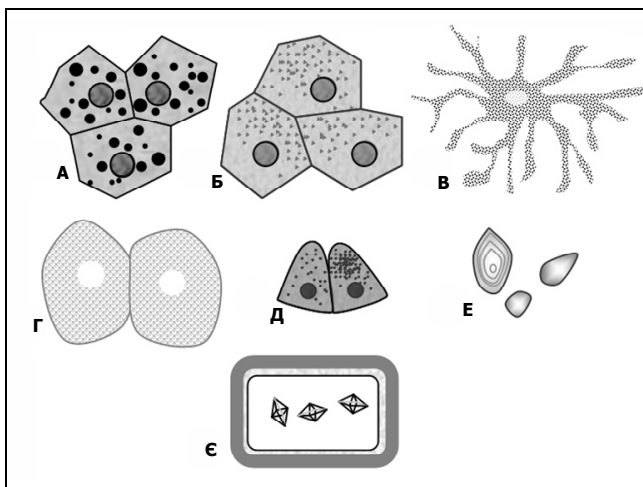


Рис. 6.2. Включення рослинних і тваринних клітин:

- А – жирові краплини у клітинах печінки; Б – включення глікогену у клітинах печінки; В – включення меланіну в меланоцитах шкіри;
 Г – жовткові включення у бластомерах амфібії; Д – секреторні включення у клітинах підшлункової залози; Е – крохмальні зерна картоплі;
 Є – включення оксалату кальцію в рослинній клітині

Алейронові зерна часто є видоспецифічними, що може бути використано для визначення видової належності таких рослин.

Жовткові включення належать до трофічних включень. За хімічною природою вони є змішаними білково-ліпідними. Містяться в яйцеклітинах майже всіх тварин. Вони синтезуються в ендоплазматичній сітці, після чого модифікуються та сегрегуються в апараті Гольджі. Жовток, синтезований власне яйцеклітиною, називають *ендогенним*. Проте у більшості живих організмів жовток синтезується не лише яйцеклітиною, а й клітинами інших органів тварин, наприклад печінки, а потім надходить до яйцеклітини. Такий жовток названо *екзогенним*. Жовткові включення використовуються як енергетичний і пластичний матеріал при розвитку зародка.

У яйцеклітинах різних тварин міститься неоднкова кількість жовткових включень. За цією ознакою яйцеклітини поділяють на

алецитальні (без жовтка), *оліголецитальні* (жовткових включень мало), *мезолецитальні* (мають середню кількість включень), *полілецитальні* (включень багато).

Жовткові включення, крім того, можуть мати в яйцеклітинах різних тварин різну локалізацію. Якщо вони розподілені в цитоплазмі рівномірно, то таку яйцеклітину називають *ізолецитальною*, якщо містяться лише біля одного (вегетативного) полюса яйцеклітини – *телолецитальною*. А якщо включення є скрізь у цитоплазмі, окрім центральної навколоядерної та периферійної кортикальної зон цитоплазми, то така яйцеклітина носить назву *центролецитальної*. Кількість і характер розташування жовткових включень у яйцеклітині має велике значення, оскільки і перше, і друге впливає на особливості її подальшого розвитку, наприклад, на тип дроблення зиготи.

Крохмальні зерна. Це вуглеводні трофічні включення рослинних клітин. За хімічною природою крохмаль є полісахаридом, мономерами якого виступають молекули глюкози.

Розрізняють крохмаль асиміляційний (первинний), транзиторний і запасний. *Асиміляційний крохмаль* у вигляді дрібних зерен накопичується у хлоропластах листків та інших фотосинтезуючих частин рослинного організму. *Транзиторний крохмаль* утворюється тимчасово в ході переміщення вуглеводів від місць синтезу до місць споживання чи відкладання про запас. *Запасний крохмаль* у вигляді зерен різного розміру й форми відкладається у спеціалізованих запасуючих тканинах і органах рослинного організму (в ендоспермі, бульбах, кореневищах тощо). Звідти він мобілізується в міру потреби. Форма й розміри крохмальних зерен є ознаками цих включень, специфічними для певних рослин.

При утворенні крохмального зерна спочатку формується його ядро. Потім навколо нього концентричними шарами відкладається крохмаль – формується просте крохмальне зерно. Декілька таких зерен можуть з'єднуватися між собою, утворюючи складне крохмальне зерно.

Крохмальні зерна є практично в усіх рослин, особливо багаті на них клітини бульб картоплі, зернівки злаків, сім'ядолі бобових. Виявити їх можна під звичайним або поляризаційним мік-

роскопом без будь-якого спеціального забарвлення (або з використанням звичайного йоду, який забарвлює ці зерна в синьо-фіолетовий колір).

Окрім крохмалю, у рослинах може відкладатися про запас інший полісахарид – *инулін*, виявлений, наприклад, у айстрових.

Включення глікогену. Такі включення належать до вуглеводних трофічних включень клітин тварин. Глікоген за своєю хімічною природою є полісахаридом, побудованим з мономерів глюкози. Ці включення зустрічаються у клітинах печінки, м'язів. У разі недостатнього надходження поживних речовин глікоген розпадається до молекул глюкози, які потім включаються у процес гліколізу. При цьому вивільнюється енергія, яка запасється у вигляді АТФ і використовується для енергетичних потреб клітини. Виявити глікогенові включення можна забарвленням за методом Беста.

Жирові краплини є трофічними ліпідними включеннями. Вони у вигляді краплин різних розмірів зустрічаються як у рослинних, так і у тваринних клітинах. У тварин вони містяться у клітинах білої та бурої жирової тканини, а також у клітинах печінки. У рослин багатими на ліпідні включення є клітини насіння, особливо у таких культур, як соняшник, льон, конопля, ріпак, кокосова пальма, олива тощо.

Як правило, запасуються жири у вигляді триацилгліцеролів, молекули яких складаються з одного залишку гліцеролу та приєднаних до нього трьох залишків жирних кислот. Останні у тварин є здебільшого насиченими, а в рослин, навпаки, ненасиченими. Тому рослинні жири (їх називають оліями) порівняно з тваринними є рідкими.

Жирові включення – основні запасні речовини, які використовуються у процесах енергетичного обміну. При голодуванні вони розщеплюються, при цьому вивільнюється велика кількість енергії, котра запасється у вигляді АТФ і використовується для енергетичних потреб клітини. У клітинах бурої жирової тканини при розпаді жирів вивільнюється енергія, яка розсіюється у вигляді тепла і в холодну пору року йде на зігрів тіла тварини. Тому бура

жирова тканина найчастіше зустрічається у тварин, які впадають у зимову сплячку. При розпаді жирів утворюється також вода, тому в деяких тварин, наприклад у верблюдів, біла жирова тканина відіграє роль депо води.

Ліпідні включення можна виявити за допомогою ліпофільних барвників (осмієвої кислоти, судану тощо).

Включення меланіну належать до пігментних включень. У хребетних вони містяться у спеціальних клітинах шкіри – *пігментоцитах*, мають вигляд дрібних коричневих зерняток і забезпечують колір шкіри. Вважають, що вони захищають організм від шкідливої дії ультрафіолетових променів, тому їх можна віднести й до захисних включень.

Включення ліпофусцину також відносять до пігментних включень. Вони наявні в багатьох клітинах тваринного організму, особливо їх багато у нервових клітинах. Виявлено, що їхня кількість зростає при старінні, тому ліпофусцин часто називають *пігментом старіння*.

Функціональне призначення ліпофусцинових включень, як і процес їхнього утворення, до кінця не з'ясоване. Найпоширенішою є думка, що ліпофусцинові гранули є неперетравленими рештками, які накопичуються в постлізосомах, а отже, вони є баластним матеріалом. Тому ці включення можна також зарахувати до групи екскреторних. Проте виявлення в ліпофусцині міоглобіноподібних речовин і каротиноїдів дало можливість пов'язати його зі створенням внутрішньоклітинного депо кисню, що дозволяє клітинам теплокровних тварин компенсувати малу швидкість надходження останнього в умовах гіпоксії, викликаній старінням.

Включення ефірних олій спостерігаються в ефіроолійних рослин, у яких вони зазвичай скупчуються у спеціальних клітинах. Найчастіше ці включення рідкі, хоча можуть бути і твердими (такою, наприклад, є камфора). Ефірні олії є терпеноїдними сполуками; в основі їхньої структури лежить молекула ізопрену. Функціональну роль цих включень до кінця не з'ясовано.

Включення смол існують у клітинах ряду рослин. Особливо багатими на них є рослини хвойні. Смоли мають високу в'язкість, не розчиняються у воді. За хімічною природою вони є терпеноїдними сполуками. Вважають, що смоли – це кінцеві продукти життєдіяльності, які не відіграють суттєвої ролі в метаболізмі рослин.

Включення каучуку. Такі включення притаманні каучуконосним рослинам: гевої, кок-сагізу, тау-сагізу. Каучук – високополімерна сполука терпеноїдної природи. Ці включення містяться у спеціальних секреторних клітинах – молочниках.

Включення глікозидів зустрічаються у клітинах майже всіх рослин. Це органічні сполуки, які складаються з моносахаридів (глюкози, рамнози, арабінози), сполучених із молекулами спиртів, альдегідів чи фенолів. Вони є водорозчинними й містяться в центральній вакуолі клітини.

Переважає більшість рослин має незначну кількість глікозидів, проте існують і такі, що багаті на ці сполуки. Серед включень, які належать до цієї групи, є отруйні: соланін у картоплі, амігдалін у насінні слив тощо. Функціональне значення глікозидів ще не повністю з'ясоване. Вважають, що ті, які мають токсичні властивості, послуговуються рослинам для захисту від поїдання їх тваринами. Тому ці включення можна віднести до захисних.

Визначити глікозиди у клітині можна за допомогою специфічних цитохімічних реакцій.

Включення алкалоїдів наявні у клітинах деяких рослин – це азотовмісні органічні гетероциклічні сполуки. Переважає більшість алкалоїдів токсична для людини і тварин. Вони бувають розчинні й нерозчинні. У різних рослинах містяться різні алкалоїди: нікотин – у тютюні, морфін – у маку, хінін – у хінному дереві, атропін – у беладоні, кофеїн – у кавовому дереві та в чайному кущі, теобромін – у какао.

Функціональне значення алкалоїдів остаточно не з'ясоване. Припускають, що ці речовини, маючи токсичні властивості, слугують для захисту рослин від поїдання їх тваринами. Можливо

також, що вони беруть участь у процесах обміну деяких азотомісних речовин.

Визначити алкалоїди у клітині можна, застосовуючи специфічні цитохімічні реакції.

Включення оксалату кальцію. Це найпоширеніший тип мінеральних включень. Вони зустрічаються в різних формах і в багатьох рослин. Мають вигляд кристалів призматичної, октаедричної, голчастої або іншої форми. Найчастіше містяться в центральній вакуолі, але можуть локалізуватися і в цитоплазмі. Оксалат кальцію утворюється внаслідок взаємодії щавлевої кислоти з іонами Ca^{2+} .

Сьогодні не існує одностайної думки щодо ролі кристалів оксалату кальцію у клітинах рослин. Одні фахівці вважають, що утворення цього включення нейтралізує токсичну дію щавлевої кислоти, інші стверджують, що дію не щавлевої кислоти, а навпаки – іонів кальцію, висока концентрація яких є шкідливою для рослинних клітин. Деякі дослідники припускають, що оксалат кальцію відкладається про запас і є депо іонів кальцію.

Крім оксалату кальцію у клітинах рослин можна виявити й інші мінеральні включення, зокрема, карбонату кальцію (мають вигляд гроноподібних утворень), сульфату кальцію, виннокислого кальцію, діоксиду кремнію.

Запитання для самоперевірки

1. Який хімічний склад цитозолі?
2. Назвіть фізико-хімічні властивості цитозолі.
3. Від чого залежить в'язкість цитозолі?
4. Які механізми забезпечують переходи золь-гель?
5. Які метаболічні процеси відбуваються в цитозолі?
6. Назвіть хімічні реакції, які проходять у цитозолі.
7. Чи відбуваються в цитозолі реакції проміжного обміну? Наведіть приклади.
8. Як зміниться швидкість біохімічних реакцій, котрі проходять у гіалоплазмі при полімеризації білка актину?
9. Назвіть функції цитозолі.

10. У чому полягає буферна функція цитозолі?
11. Чим зумовлена гетерогенність цитозолі?
12. Типи включень за функціональним призначенням.
13. Охарактеризуйте трофічні включення.
14. Що таке секреторні включення? Наведіть приклади.
15. Які включення можуть виконувати захисну функцію?
16. Яка роль пігментних включень? Наведіть приклади.
17. Типи включень за хімічною природою.
18. Охарактеризуйте жирові включення.
19. Дайте визначення білкових включень.
20. Що таке вуглеводні включення.
21. Які ви знаєте мінеральні включення?

Рекомендована література

Загальна цитологія і гістологія : підручник / М. Е. Держинський, Н. В. Скрипник, Г. В. Островська та ін. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2010.

Фаллер Д. М. Молекулярная биология клетки / Д. М. Фаллер, Д. Шилдс. – М. : Бином-Пресс, 2003.

Molecular Biology of the Cell / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis et al. – N. Y., 2013.

Розділ 7

ЦИТОСКЕЛЕТ

Цитоскелет є опорно-руховою системою клітини, основними функціями якої є підтримка клітинної форми та забезпечення переміщення як самої клітини, так і її внутрішньоклітинних структур. Цитоскелет складається із трьох основних компонентів: *мікрофіламентів, мікротрубочок і проміжних філаментів*.

МІКРОФІЛАМЕНТИ

Мікрофіламенти – це довгі нитчасті утворення діаметром приблизно 7 нм, наявні по всій цитоплазмі клітини. Але особливо багатий на них її кортикальний (периферійний, поверхневий) шар.

Мікрофіламенти побудовані з білка *актину*, молекула якого є глобулярним поліпептидом, який складається із 375 амінокислот і має молекулярну масу близько 42 кДа. При формуванні мікрофіламента молекули актину об'єднуються одна з одною "голова у хвіст" у волокнисту структуру (рис. 7.1). При цьому молекули упаковуються в ній у щільну спіраль, у якій на один її виток припадає приблизно два мономеру актину. Така будова мікрофіламента нагадує два взаємно скручені ланцюжки з кроком 37 нм (проте ця подібність помилкова; див. нижче).

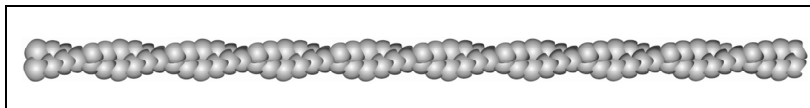


Рис. 7.1. Будова мікрофіламента

Процес об'єднання окремих молекул (мономерів) актину в мікрофіламент називається *полімеризацією* актину. Однак полімеризується не весь актин, наявний у клітині. Певна частина його молекул завжди перебуває у вільному *деполімеризованому* стані. Полімеризовану частину актину інколи називають *F-актином*, або *фібрилярним актином*, а деполімеризовану (вільну) – *G-актином*, або *глобулярним актином*.

Два кінці мікрофіламента є неоднаковими. Розрізняють плюс-кінець ("+"-кінець), до якого молекули актину здебільшого приєднуються, і мінус-кінець ("-"-кінець), від якого найчастіше від'єднуються. А отже, на "+"-кінці переважно здійснюється збирання мікрофіламента, а на "-"-кінці – розбирання. Завдяки цьому, за певних обставин (про що йтиметься нижче), мікрофіламенти, не змінюючи своєї довжини, можуть переміщуватись (рис. 7.2, А). Це явище називають *тредмілінгом*. Мікрофіламентам властива також *динамічна нестабільність*: вони можуть почергово то швидко розбиратись, то повільніше рости. Вважається, що в мікрофіламентів домінує тредмілінг (тоді як у мікротрубочок – динамічна нестабільність, див. далі). Завдяки тредмілінгу та динамічній нестабільності процес збирання й розбирання мікрофіламентів відбувається безперервно. Це необхідно для постійної перестройки цитоскелета в міру потреб клітини.

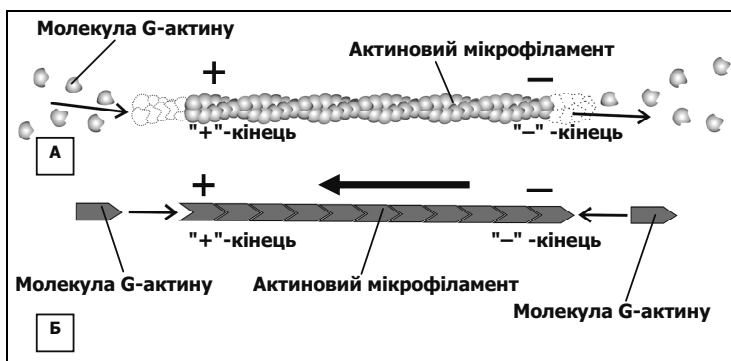


Рис. 7.2. Схема тредмілінгу актинового мікрофіламента

Мономери актину в мікрофіламенті поєднані між собою слабкими нековалентними зв'язками. Ці зв'язки самовільно створюються (молекули актину поєднуються) і самовільно розриваються (молекули актину роз'єднуються) із приблизно однаковою ймовірністю. А значить, якби мікрофіламент являв собою один ланцюжок поєднаних одна за одною молекул актину, то він, очевидно, був би нестабільним. І справді, розрив зв'язку між мономерами актину в будь-якому місці призвів би до розпаду мікрофіламента на два і більше фрагментів. За цих обставин у клітині реально існували б окремі молекули актину, а також ланцюжки із двох, трьох, чотирьох, п'яти і т. д. актинових мономерів, причому чим довший ланцюжок, тим менш імовірним було б його існування. Насправді ж молекули актину упаковані в мікрофіламенті так, що він є немов би двома ланцюжками, взаємно закрученими один відносно одного. Кожна молекула актину в мікрофіламенті поєднана поздовжніми зв'язками з попередньою і наступною та поперечним зв'язком з молекулою актину із сусіднього ланцюжка. А тому, щоб такий мікрофіламент розпався на два фрагменти, потрібно "розірвати" поздовжні зв'язки між молекулами актину одразу в обох сусідніх ланцюжках, причому точно один навпроти одного, а це є менш імовірним. Крім того, щоб якась молекула актину вищепилась із середини мікрофіламента, потрібно щоб розірвались одразу три зв'язки (два поздовжні з попередньою і наступною молекулою актину та один поперечний з молекулою актину із сусіднього ланцюжка), а це значно менш імовірно, ніж розрив одного якогось зв'язку.

Описані вище особливості структурної організації мікрофіламентів вочевидь направлені на забезпечення та підтримання їхньої стабільності й зумовлюють приєднання і від'єднання молекул актину майже виключно лише на їхніх кінцях. Ці кінці, як уже зазначалося, є неоднаковими: "+"-кінець і "-"-кінець, і молекули актину можуть приєднуватись і від'єднуватись на обох кінцях. Проте на "+"-кінці вони швидко приєднуються і швидко від'єднуються, а на "-"-кінці – повільно приєднуються і повільно від'єднуються. Можливе пояснення такої різниці полягає в наступному. Як видно з рисунка 7.2, Б, молекули актину приєднуються до "+"-кінця і після цього змінюють свою конформацію, що відбувається швидко

й порівняно легко. А щоб приєднатись до "-"-кінця, молекулі актину потрібно змінювати свою конформацію ще до приєднання або в процесі самого приєднання, а це потребує додаткового часу.

Швидкість приєднання нових молекул актину до мікрофіламента, зрозуміло, буде тим вищою, чим більше мономерів актину є навколо, тобто чим вищою є концентрація мономерної форми актину в цитозолі клітини. (Крім того, вона залежить також від так званої *константи приєднання*.) Очевидним є і те, що швидкість від'єднання мономерів актину залежить від сили зв'язку між ними в мікрофіламенті, тобто від *константи від'єднання*, і не залежить від їхньої концентрації в цитозолі. Тому за високої концентрації мономерів актину швидкість приєднання нових мономерів до мікрофіламента випереджає швидкість їхнього від'єднання, тобто мікрофіламент росте на обох кінцях. Проте, при приєднанні нових мономерів актину до мікрофіламента їхні запаси поступово вичерпуються (концентрація падає), і за цих обставин швидкість полімеризації буде уповільнюватися. За певної концентрації мономерів актину (її називають *критичною*, або *рівноважною*) швидкість приєднання і від'єднання стають рівними, і тоді мікрофіламент перебуває в *динамічній рівновазі*. За низької ж концентрації мономерів актину, навпаки, швидкість від'єднання нових мономерів від мікрофіламента випереджає швидкість їхнього приєднання, тобто мікрофіламент на обох кінцях буде розбиратися.

Кожна молекула актину зв'язана з однією молекулою АТФ. Після приєднання до мікрофіламента вона змінює свою конформацію і стає здатною відщепити від АТФ один фосфатний залишок, перетворюючи її на АДФ, що супроводжується вивільненням енергії (яка "запасується" у структурі мікрофіламента). Вивільнивши частину енергії та змінивши свою конформацію, молекули актин-АДФ стають менш сильно зв'язаними в мікрофіламенті, ніж молекули актин-АТФ, а отже, будуть легше від'єднуватися від нього, порівняно з молекулами актин-АТФ. Оскільки мономер актин-АДФ легше, а значить, і швидше від'єднуються, ніж мономер актин-АТФ, то вищеописана ситуація, коли швидкість приєднання стає рівною швидкості від'єднання, для актин-АДФ настане за більш високої концентрації мономерів актину, тобто критична концентрація для актин-АДФ є вищою, ніж для актин-АТФ.

Реакція розщеплення АТФ на АДФ і фосфат, яка каталізується актином, також має певну швидкість. Вона може бути як більшою, так і меншою від швидкості приєднання мономерів актину до мікрофіламента. Якщо таке приєднання йде швидко, то "новоприєднані" мономери, які розташовані на кінці мікрофіламента, не встигатимуть перетворити АТФ на АДФ раніше приєднання наступного мономера. У результаті на цьому кінці мікрофіламента мономери актину існуватимуть у вигляді актин-АТФ – виникає так званий АТФ-"кеп" (АТФ-"шапочка"). Якщо ж приєднання відбувається повільно, то "новоприєднані" молекули, розташовані на кінці мікрофіламента, встигатимуть перетворити АТФ на АДФ, перш ніж сюди приєднаються наступні мономери. У результаті на цьому кінці мікрофіламента мономери актину існуватимуть у вигляді актин-АДФ.

Оскільки швидкість приєднання мономерів актину до "+"-кінця мікрофіламента є суттєво вищою, то за певної їхньої проміжної концентрації можливо стає ситуація, коли на цьому кінці мономери будуть приєднуватись швидше, ніж у них відбуватиметься розщеплення АТФ, тоді як на "-"-кінці, унаслідок повільного приєднання нових молекул актину, навіть самі крайні з них встигатимуть розщепити АТФ. У результаті на "+"-кінці мономери актину перебуватимуть у вигляді актин-АТФ, а на "-"-кінці – у вигляді актин-АДФ. А оскільки швидкість від'єднання актин-АДФ є вищою, ніж актин-АТФ, то за цієї концентрації (вона має бути вищою за критичну концентрацію для актин-АТФ, але нижчою за таку для актин-АДФ) на "+"-кінці буде відбуватися приєднання нових мономерів актину, а на "-"-кінці – від'єднання. Унаслідок цього мікрофіламент буде рости на "+"-кінці й укорочуватися на "-"-кінці, тобто буде здійснюватися тредмілінг.

І хоча за достатньої швидкості приєднання мономерів актину на "+"-кінці, вони, як правило, не встигають розщепити АТФ, існує деяка ймовірність того, що крайні мономери актину таки встигнуть розщепити АТФ раніше, ніж сюди приєднаються нові мономери актину. У цьому випадку АТФ-"кеп" на "+"-кінці зникне: мономери актину перетворяться з актин-АТФ на актин-АДФ. У результаті при концентрації актину, вищій за критичну концентрацію для актин-АТФ, але нижчій за критичну концентрацію для

актин-АДФ, цей "+"-кінець почне розбиратися. У подальшому АТФ-"кеп" може відновитися; унаслідок чого "+"-кінець знову почне рости. Такий почерговий ріст і вкорочення мікрофіламентів називається *динамічною нестабільністю*.

Як уже йшлося вище, структура мікрофіламента, яка нагадує два взаємозакручені ланцюжки, робить його більш стабільним. Проте щоб такий більш-менш стабільний мікрофіламент почав утворюватися, потрібно, щоб дві молекули актину з'єдналися між собою; потім, ще до того як зв'язок між ними розірветься, до них має встигнути приєднатися третя молекула; далі, поки ще не розірвався жоден із двох попередніх зв'язків, має приєднатись четверта молекула, започаткувавши два взаємно закручені ланцюжки. І лише після цього новостворений мікрофіламент стає стабільним, оскільки кожний із його мономерів поєднаний двома-трьома зв'язками із сусідніми мономерами. Ці перші, початкові етапи (їх називають *ініціацією*, або *нуклеацією*) є найважчими і найдовшими у процесі формування нового мікрофіламента при його спонтанному утворенні в клітині.

Важливо підкреслити, що для оптимізації початкових етапів полімеризації в клітині існують спеціальні білки, які ініціюють утворення фрагментів із 3–4 мономерів актину, що стають затравками для формування нових мікрофіламентів. Більш того, регулюючи місце розташування та концентрацію таких затравочних білків, клітина може визначати кількість та місце розташування своїх мікрофіламентів.

Ініціюють процес утворення нового мікрофіламента білки *форми* та білковий *комплекс ARP (actin related proteins)*, складається із двох актиноподібних білків). Функція останнього полягає в ініціації росту актинових мікрофіламентів, що веде до швидкого нарощування філамента на "+"-кінці (рис. 7.3). Сам комплекс при цьому певний час залишається зв'язаним з "-"-кінцем новоствореного мікрофіламента. Крім того, комплекс *ARP* може приєднуватися збоку до вже існуючого мікрофіламента й ініціювати утворення нового філамента як відгалуження від попереднього. У такий спосіб під впливом комплексу *ARP* формується деревоподібна сітка мікрофіламентів (рис. 7.3).

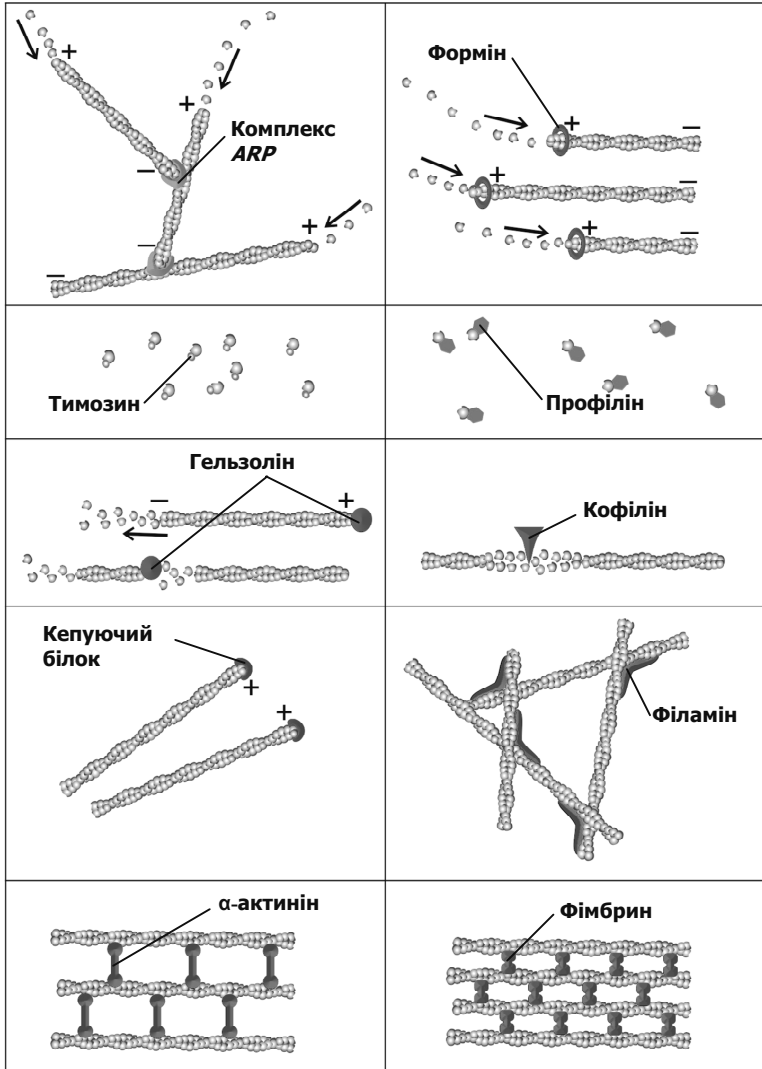


Рис. 7.3. Схема взаємодії актинзв'язувальних білків з мікрофіламентами

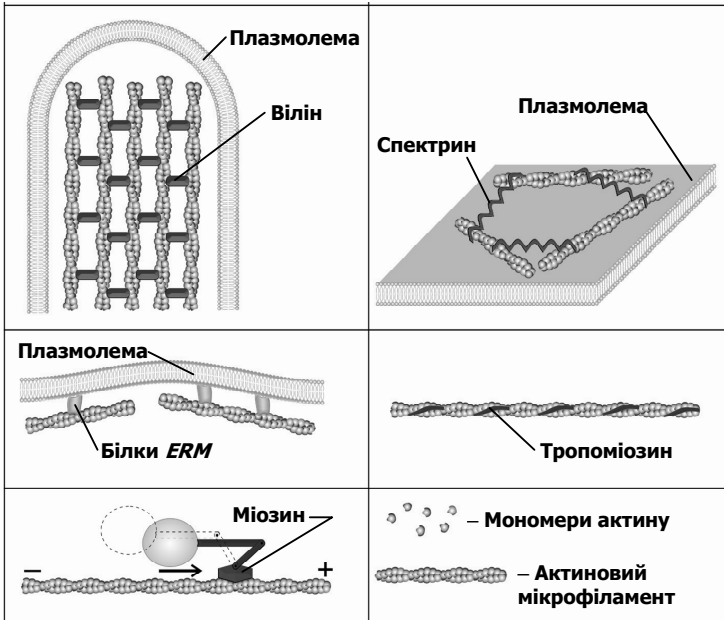


Рис. 7.3. (закінчення рис. 7.3)
 Схема взаємодії актинзв'язувальних білків
 з мікрофіламентами

Білки форміни, які є димерами (складаються із двох субодиниць), ініціюють утворення нових мікрофіламентів у вигляді паралельного пучка. У цьому випадку створення нового мікрофіламента також починається від "-"-кінця до "+"-кінця, проте формін залишається зв'язаним не з "-"-кінцем, а з "+"-кінцем, не заважаючи при цьому приєднанню нових мономерів актину (рис. 7.3).

Згадані білки є далеко не єдиними пов'язаними з мікрофіламентами білками. На сьогодні виявлено понад 100 білків, асоційованих із мікрофіламентами, які допомагають мікрофіламентам виконувати їхні функції. Найголовніші з таких **актинзв'язувальних білків** наведено в табл. 7.1, а схема їхньої взаємодії з актиновими мікрофіламентами – на рис. 7.3.

Таблиця 7.1.

Активні зв'язувальні білки

Назва білка	Функція
Комплекс ARP	Ініціює збирання нових мікрофіламентів; формує бокові відгалуження мікрофіламентів; формує угруповання мікрофіламентів у вигляді деревоподібної сітки; зв'язаний з "-"-кінцем мікрофіламента
Формін	Ініціює збирання нових мікрофіламентів у вигляді паралельного пучка
Тимозин	Зв'язується з мономерами актину, запобігаючи їхній полімеризації
Профілін	Зв'язується з мономерами актину, сприяючи їхній полімеризації (добудовуванню до "+"-кінця мікрофіламента); регулює зв'язування мономерів актину з тимозином
Гельзолін	Розрізає мікрофіламенти на фрагменти, сприяючи їхньому розбиранню; зв'язується з "+"-кінцем мікрофіламента, сприяючи його розбиранню з "-"-кінця
Кофілін	Приєднується вздовж мікрофіламентів і прискорює їхнє розбирання
Кепуючий білок	Закриває "+"-кінці мікрофіламентів, захищаючи їх від деполімеризації та подальшої полімеризації
Тропомодулін	Закриває "-"-кінці мікрофіламентів, захищаючи їх від деполімеризації
Філамін	Зв'язує мікрофіламенти у тривимірну сітку
Фімбрин	Зв'язує мікрофіламенти в пучки
α -актинін	Зв'язує мікрофіламенти в пучки; бере участь в утворенні фокальних контактів
Вілін	Зв'язує мікрофіламенти в паралельні пучки у мікворосинках
Спектрин	Приєднує мікрофіламенти до плазмолемі або до проміжних філаментів
Білки ERM	Приєднують мікрофіламенти до плазмолемі
Тропоміозин	Стабілізує мікрофіламенти, прикріплюючись до них по довжині
Міозини	Моторні білки, які можуть переміщуватись по мікрофіламенту від "-"-кінця до "+"-кінця, пересуваючи за собою ті чи інші внутрішньоклітинні структури

Актинзв'язувальні білки мають достатньо широкий функціональний спектр: вони ініціюють утворення нових мікрофіламентів, регулюють процеси збирання-розбирання мікрофіламентів, зв'язують їх у паралельні пучки або в тривимірну сітку, прикріплюють мікрофіламенти до плазмолем та інших компонентів цитоскелета, є моторними білками, передають дію регуляторних факторів на цитоскелет.

За механізмом дії такі білки можуть:

- взаємодіяти з кінцями мікрофіламента, впливаючи на приєднання та від'єднання мономерів актину;
- прикріплюватись посередині мікрофіламента, укріплюючи його або навпаки – дестабілізуючи;
- розрізати мікрофіламент на фрагменти;
- формувати поперечні зшивки між мікрофіламентами;
- переміщуватись уздовж мікрофіламентів.

Велика група актинзв'язувальних білків регулює процес полімеризації-деполімеризації, тобто збирання-розбирання, мікрофіламентів. Ця регуляція може здійснюватись декількома способами.

Перший із них зводиться до регуляції концентрації мономерів актину, "здатних" брати участь у полімеризації. Так, білок *тимозин*, зв'язуючись з мономерами актину, "робить" їх неспроможними приєднуватись ані до "+", ані до "-"-кінця мікрофіламента. Як наслідок, концентрація вільних мономерів падає, що запобігає полімеризації мікрофіламентів. Білок *профілін*, навпаки, сприяє полімеризації актину (він конкурує з тимозином за мономер актину). Зв'язавшись із молекулою актину, профілін закриває лише ту її частину, яка може зв'язуватися з "-"-кінцем мікрофіламента, і залишає незаблокованою ту, яка може зв'язуватися з "+"-кінцем. У результаті профілін сприяє приєднанню мономерів актину до "+"-кінця мікрофіламента.

Другий спосіб регуляції полімеризації-деполімеризації мікрофіламентів здійснюється шляхом прямого впливу на процеси приєднання та від'єднання мономерів актину: регуляторний білок зв'язується з "+"-кінцем мікрофіламента і не дає новим молекулам приєднуватись до цього кінця. А оскільки мономер продовжать від'єднуватись від "-"-кінця, то це при-

водить до розбирання мікрофіламентів. У такий спосіб діє, скажімо, білок *гельзолін*: зв'язуючись із "+"-кінцями мікрофіламентів він сприяє їхній деполімеризації. Якщо ж регуляторний білок приєднується до "-"-кінця мікрофіламента й не даватиме мономерам актину від'єднуватись від нього, то це посприяє збиранню мікрофіламентів (оскільки мономери актину будуть продовжувати приєднуватися до "+"-кінця мікрофіламента). Так працює, наприклад, комплекс *ARP*.

Третій спосіб регуляції збирання-розбирання мікрофіламентів – це розрізання останніх на фрагменти, які можуть або швидко розбиратися, або послужити затравками для росту цілої групи нових мікрофіламентів. У такий спосіб діє білок *гельзолін*: розрізаючи мікрофіламент на фрагменти, він викликає їхню швидку деполімеризацію. Білок *кофілін* діє інакше: він приєднується вздовж мікрофіламента й ослаблює зв'язки між молекулами актину, що входять до його складу. Як наслідок, такий мікрофіламент може легко розпастися.

Заблокувати процес збирання або розбирання мікрофіламентів можна також шляхом уведення у клітину деяких речовин природного або штучного походження. Так, *цитохалазини*, приєднуючись до "+"-кінців мікрофіламентів, викликають їхнє розбирання. *Фалойдини*, навпаки, приєднуючись до "-"-кінців мікрофіламентів, не дають їм розбиратись.

Існує ряд актинзв'язувальних білків, які прикріплюються вздовж мікрофіламентів, сприяючи їхньому "укріпленню". Прикладом може слугувати *тропоміозин* - видовжена молекула, яка зв'язується приблизно із сімома мономерами актину в мікрофіламенті. Коли вздовж останнього розміщується достатньо багато молекул тропоміозину, то вони, "скріплюючи" молекули актину, роблять мікрофіламент стійкішим до розпаду на фрагменти.

Ряд актинзв'язувальних білків, взаємодіючи з кінцем мікрофіламента, не дають мономерам актину ані приєднуватися, ані від'єднуватися. Це веде до стабілізації цього кінця і захищає його від розбирання або подальшого росту. Наприклад, "+"-кінець мікрофіламента закривають *катуючі білки* (наприклад, *CapZ* у м'язових клітинах). "-"-Кінець мікрофіламента може закриватись *комплексом ARP*, а у м'язових клітинах, де мікрофіламенти мають існувати дуже довго, їхні "-"-кінці закриває *тропомодулін*.

На особливу увагу заслуговує родина актинзв'язувальних білків *міозинів*, здатних переміщуватись по мікрофіламентах як по рейках (детальніше див. нижче).

Інші актинзв'язувальні білки "об'єднують" мікрофіламенти у групи. Так, білок *філамін* зв'язує мікрофіламенти у тривимірну сітку, а білки *фімбрин* та α -*актинін* – у паралельні пучки. Згадані білки є мономерами або димерами і мають дві ділянки зв'язування з актиновими мікрофіламентами. Проте у філаміні ці ділянки розташовані під кутом одна до одної, а у фімбрину та α -актиніну – прямо. У фімбрину ці ділянки розташовані на відстані 14 нм, а в α -актиніну – на відстані 30 нм. Тому мікрофіламенти, зшиті фімбрином, розташовані дуже близько один від одного, що відбивається на функціонуванні утвореного ними пучка: щільність їхньої "упаковки", зокрема, не дає змоги молекулам білка-мотора міозину вклинитись між ними. Тоді як мікрофіламенти, зшиті в пучок α -актиніном, розташовані не так щільно, і молекули міозину можуть вбудовуватись між ними. Як побачимо далі, це вплине на здатність таких пучків ковзати один відносно одного, забезпечуючи скорочення, скажімо, м'язових клітин.

Представники ще однієї групи білків, до якої належать, наприклад, *спектрин* і білки родини *ERM*, беруть участь у прикріпленні мікрофіламентів до інших елементів цитоскелета або до плазмолем. Так, *спектрин* приєднує мікрофіламенти до розташованих з цитозольного боку периферійних білків плазмолем. Останні, у свою чергу, з'єднані з інтегральними білками плазмолем. Крім того, *спектрин* може приєднувати мікрофіламенти до проміжних філаментів (скажімо, у ворсинках). *Білки родини ERM* здатні приєднувати актинові мікрофіламенти, розташовані у цитоплазматичному кортексі, до інтегральних глікопротеїнів плазмолем. Білки цієї родини можуть існувати в активній конформації, коли вони здатні зв'язуватися з актиновими мікрофіламентами та глікопротеїнами, та в неактивній, коли вони не можуть зв'язатися з мікрофіламентами. "Перемикання" в активну конформацію може бути ініційовано позаклітинними сигнальними молекулами, що робить поверхневий цитоскелет здатним відповідати на сигнали з позаклітинного простору.

І нарешті, існують білки та деякі інші речовини, які можуть регулювати просторовий розподіл мікрофіламентів, визначати місця зборки нових мікрофіламентів, залучатися до передачі регуляторних сигналів на цитоскелет (наприклад, *білки-ГТФази родин Rac та Rho*). Останнє дозволяє клітині у відповідь на дію різних позаклітинних та внутрішньоклітинних регуляторних факторів перебудовувати свій цитоскелет відповідно до потреб у даний момент часу.

Основними функціями мікрофіламентів на сьогодні вважають наступні:

- участь у гель-золь-переходах цитозолю;
- участь у підтриманні форми клітини;
- участь у переміщенні внутрішньоклітинних компонентів:
 - а) за рахунок збирання-розбирання (тримілінгу);
 - б) за рахунок транспорту по них, як "по рейках";
- утворення мікроворсинок;
- утворення псевдоподій, ламелоподій та філоподій;
- участь у забезпеченні полярності клітини;
- участь в утворенні міжклітинних контактів: адгезивного поясу та фокального контакту;
- формування скоротливого кільця при цитотомії (поділі цитоплазми) у ході мітозу тваринної клітини;
- забезпечення скорочення м'язових клітин (разом з міозином).

Зупинимось на окремих функціях мікрофіламентів більш детально. Так, їхня роль у *гель-золь-переходах цитозолю* полягає у наступному. Коли більшість молекул актину полімеризується, то цитозоль переходить у стан гелю. При цьому утворені мікрофіламенти формують тривимірну сітку фібрил, яка є каркасом гелю, що формується. Білки, які зв'язують актин (філамін, фімбрин), виконують при цьому роль зшивок між ланцюгами актину. Коли ж більшість актину деполімеризується, то цитозоль переходить у стан золю.

Велика кількість мікрофіламентів розташована в кортикальному шарі цитоплазми, де вони формують *поверхневий*

цитоскелет клітини, утворюючи тривимірну або двовимірну сітку одразу під плазмолемою клітини (рис. 7.4). Така актинова сітка бере участь у стабілізації форми клітини. Так, в еритроцитах (які мають двовимірну актинову кортикальну сітку) форма двояковгнутого диска повністю забезпечується таким поверхневим цитоскелетом. Якщо його зруйнувати, то еритроцит набуває сферичної форми. Актинові мікрофіламенти в кортикальному шарі цитоплазми зв'язані з білком *спектрином* (рис. 7.4). Він, у свою чергу, за допомогою *анкірину* пов'язаний з білком *смуги 3* (інтегральним білком плазмолеми) і за допомогою білка *смуги 4.1* – з *глікофорином* (ще одним інтегральним білком плазмолеми).

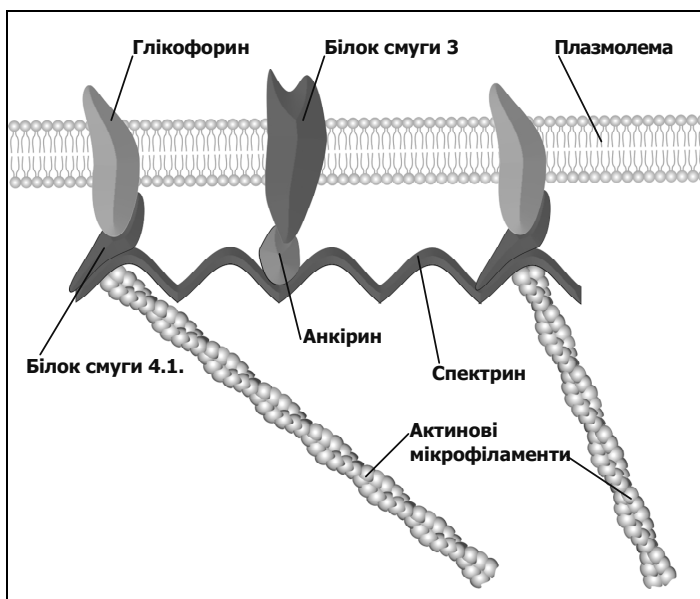


Рис. 7.4. Схема будови кортикального цитоскелета

Мікрофіламенти також беруть **участь у внутрішньоклітинному транспорті**, забезпечуючи переміщення внутрішньоклітинних структур двома способами. Раніше вже йшлося, що за

рахунок збирання на "+"-кінці й розбирання на "-"-кінці мікрофіламенти можуть переміщуватися по клітині (тредмілінг). Якщо ж до такого мікрофіламента буде прикріплено якусь внутрішньоклітинну структуру, то вона також переміститься разом із ним.

Однак, із зрозумілих причин, основним є інший вид транспорту за участю мікрофіламентів: вони є "рейками", по яких переміщуються внутрішньоклітинні компоненти. Роль "локомотивів" при цьому грають так звані "білки-мотори".

Актин-асоційованими білками-моторами є велика родина **міозинів**. Кожна молекула міозину містить глобулярний "голівковий" домен, шийку (шарнірні ділянки, які можуть згинатися) і фібрилярний хвостовий домен (рис. 7.5). "Голівковий" домен, досить подібний у різних міозинів, має АТФазну активність (здатність розщеплювати АТФ) і відповідальний за зв'язування з мікрофіламентом. Хвостовий домен, різний у кожного типу міозину, здатний зв'язуватися з різним "вантажем" у клітині. Саме він і визначає специфічність функції даного типу міозину. Найбільш поширеними і вивченими є міозин II (димерний білок, існує переважно в м'язових клітинах і забезпечує їхнє скорочення, а також бере участь у формуванні борозни поділу наприкінці мітозу), міозин I (мономерний білок з коротким хвостовим доменом, забезпечує перенесення різних внутрішньоклітинних структур уздовж мікрофіламентів) і міозин V (димер, з великою фібрилярною частиною, залучений до транспорту органел).

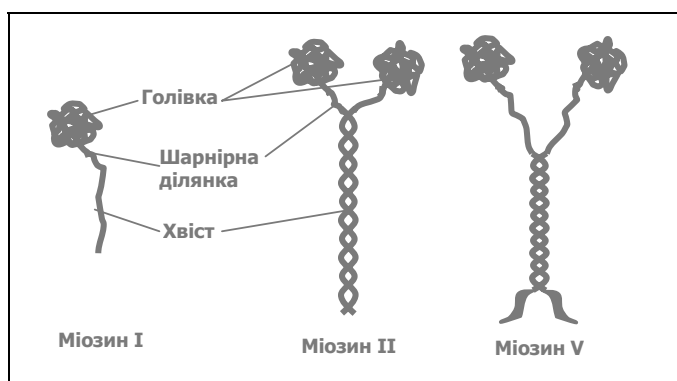


Рис. 7.5. Будова молекули міозину

Отже, своїм хвостовим кінцем міозини прикріплюються до внутрішньоклітинної структури, котру слід перемістити (до "вантажу"), а "голівковим" кінцем – до мікрофіламента. Завдяки енергії розщеплення АТФ "голівковим" доменом вони переміщуються по мікрофіламенту від його "-"-кінця до "+"-кінця й тягнуть "вантаж" у потрібне місце (рис. 7.6). При цьому переміщення відбувається за рахунок попереминого зв'язування двох голівок міозину, які ніби "крокують" по мікрофіламенту. Спочатку одна з голівок зв'язується з мікрофіламентом, а друга в цей час від'єднується від нього; далі молекула міозину згинається у шарнірних ділянках і підтягує свою хвостову частину разом з "вантажем"; потім з мікрофіламентом зв'язується друга голівка, а перша від'єднується від нього, повертаючись до попередньої форми і прикріплюючись у новому місці мікрофіламента на відстані 5–25 нм далі у напрямку до "+"-кінця; після цього вона знову згинається у шарнірних ділянках і знову підтягує "вантаж" – і цикл повторюється (рис. 7.6).

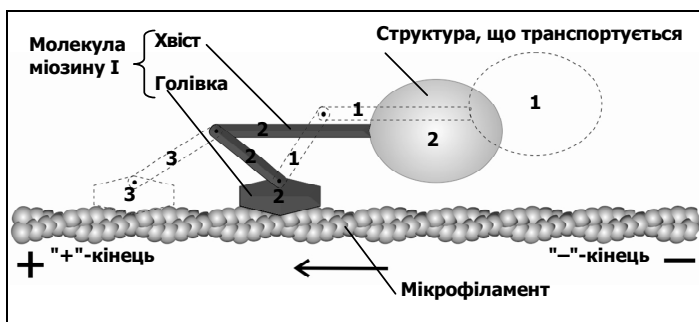


Рис. 7.6. Схема транспорту по мікрофіламенту за допомогою моторного міозину I
 (Можливий механізм транспорту: 1 – вихідний стан;
 2 – зміна конформації міозину й підтягування органели;
 3 – переміщення голівки міозину по мікротрубочці.
 Для спрощення одна з двох голівок міозину не показана)

Крім того дві молекули міозину можуть зв'язатись між собою своїми хвостовими доменами, а "голівковими" – прикріпитись до двох сусідніх мікрофіламентів, розміщених антипаралельно (так, як показано на рис. 7.7). У цьому випадку рух голівок міозину по мікрофіламентах у протилежних напрямках зумовить ковзання цих двох мікрофіламентів один відносно одного. Якщо ж ці мікрофіламенти будуть прикріплені до плазмолеми, то це призведе або до її впинання в цьому місці, або до зміни форми самої клітини (рис. 7.8). Подібний механізм лежить в основі скорочення у м'язових волокнах, роботи актиноміозинового скоротливого кільця (яке формується при поділі цитоплазми під час мітозу тваринної клітини), амебоїдного руху клітин, впинання плазматичної мембрани під час фагоцитозу та інших подібних рухів.

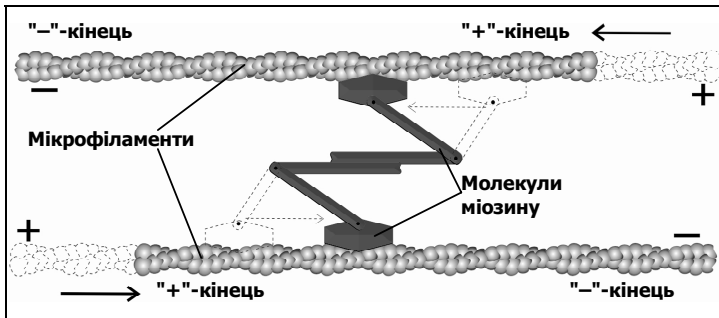


Рис. 7.7. Схема ковзання актинових мікрофіламентів один відносно одного

За допомогою мікрофіламентів формуються *мікрворсинки* – тонкі пальцеподібні вирости плазмолеми, які збільшують площу її контакту з міжклітинним простором. Так, наявність численних мікрворсинок в епітеліальних клітинах кишечника суттєво збільшує площу їхньої всисної поверхні. Усередині кожної мікрворсинки наявний пучок із 20–30 паралельних мікрофіламентів, які беруть початок від її основи й простягаються до верхівки, при цьому, усі їхні "+"-кінці спрямовані до

верхівки мікворосинки (рис. 7.9). Ці мікрофіламенти підтримують форму останньої (підтримують випинання плазмолеми в цьому місці).

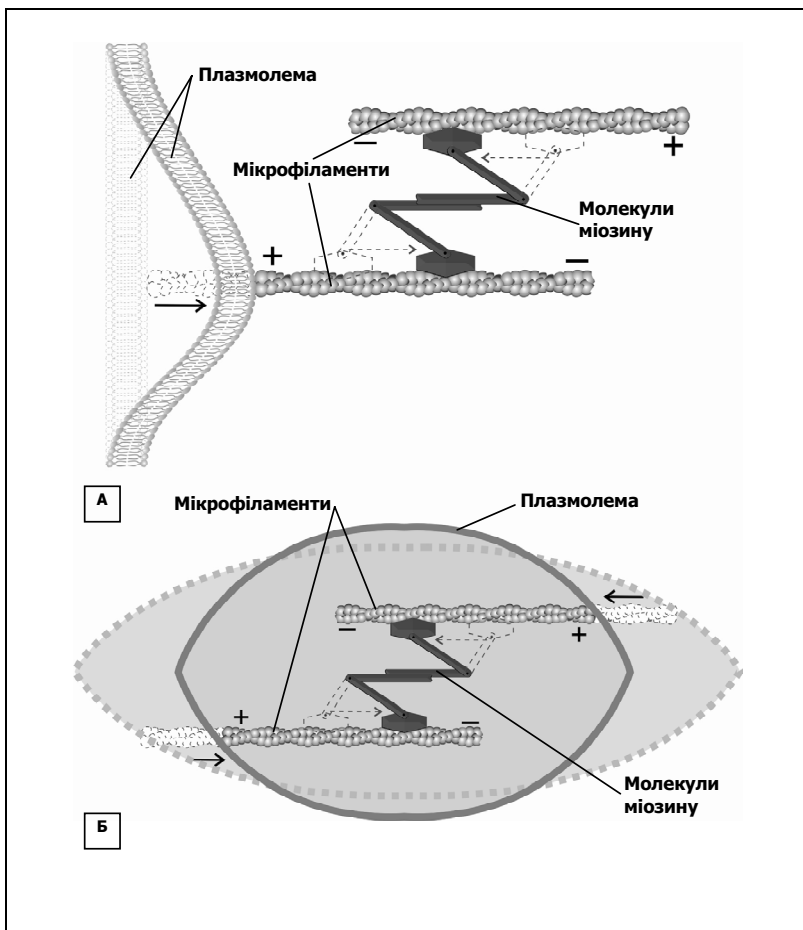


Рис. 7.8. Впинання плазмолеми (А) і зміна форми клітини (Б) за допомогою ковзання прикріплених до плазмолеми актинових мікрофіламентів один відносно одного за допомогою міозину. Схема

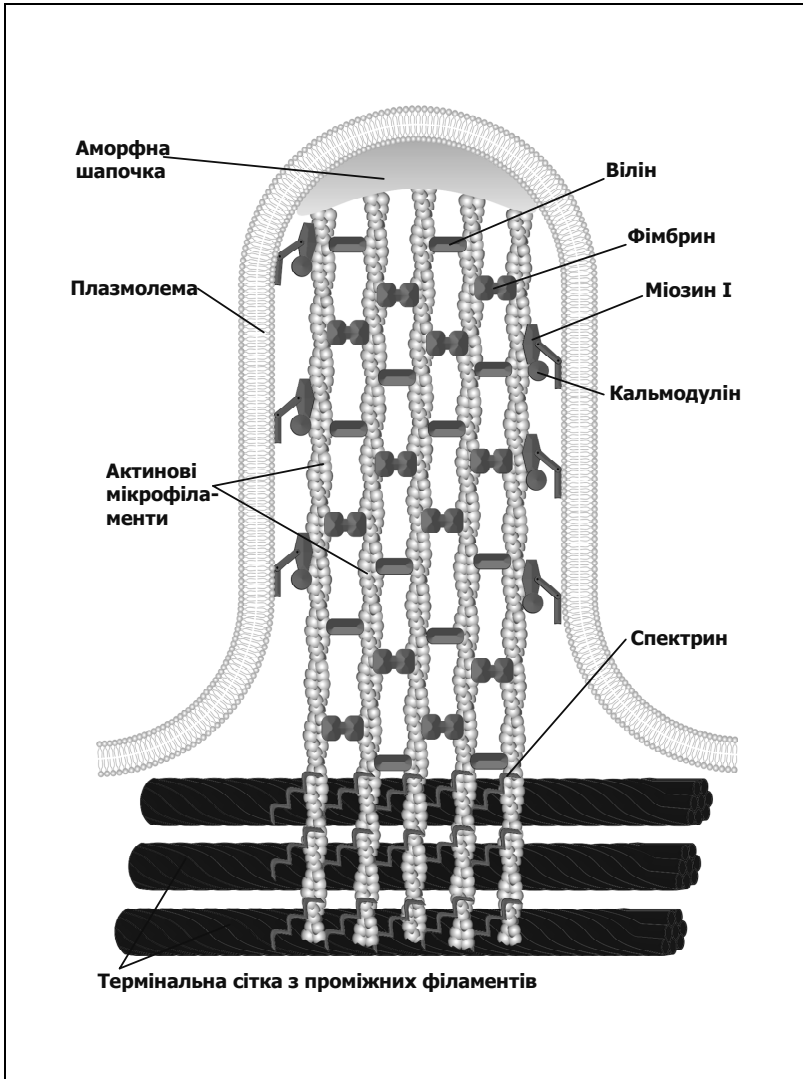


Рис. 7.9. Схема будови мікрворсинки

Мікрофіламенти також виявлені в адгезивному поясі, який відносять до групи механічних міжклітинних контактів (детальніше – у розділі "Загальні принципи міжклітинних взаємодій").

Актинові мікрофіламенти беруть участь в утворенні *псевдоподій* (рис. 7.10), за участю яких відбувається переміщення цілого ряду клітин. Так, скажімо, переміщуються амеби (тому цей спосіб переміщення клітин ще називають *амебоїдним* рухом), макрофаги та нейтрофіли (клітини, які виконують функцію поглинання (фагоцитозу) мікроорганізмів і сторонніх часток, що потрапили в організм). У цілому механізм амебоїдного руху виглядає наступним чином. Клітина "викидає" в різні боки декілька псевдоподій, деякі з яких прикріплюються до поверхні, по якій переміщується клітина, а деякі не можуть цього зробити й втягуються назад. Після прикріплення однієї якоїсь псевдоподії до поверхні всі інші втягуються, а сама клітина немов би "підтягується" за допомогою прикріпленої псевдоподії. У такий спосіб клітина переміщується на певну відстань у тому напрямку, де відбулося прикріплення псевдоподії.

І хоча на сьогодні ще не з'ясовані всі деталі руху клітин за допомогою псевдоподій, виявлено, що до цитоплазматичного боку плазмолемі в місці, де "викидається" псевдоподія, підходять мікрофіламенти. Останні розміщуються тут або паралельним пучком, або формують розгалужені структури (своїми "+"-кінцями мікрофіламенти обернені до плазмолемі) (рис. 7.10, А, Б). У міру зростання вони стають довшими, формуються нові відгалуження, що веде до випинання плазмолемі в цьому місці. У формуванні нових відгалужень задіяний білковий комплекс *Arp2/3*. Цей білковий комплекс приєднується до бічної поверхні вже існуючого актинового мікрофіламента й ініціює полімеризацію нового мікрофіламента, який починає "відростати" під кутом до попереднього. При цьому комплекс *Arp2/3* закриває "-"-кінець мікрофіламента і не дає йому розбитись.

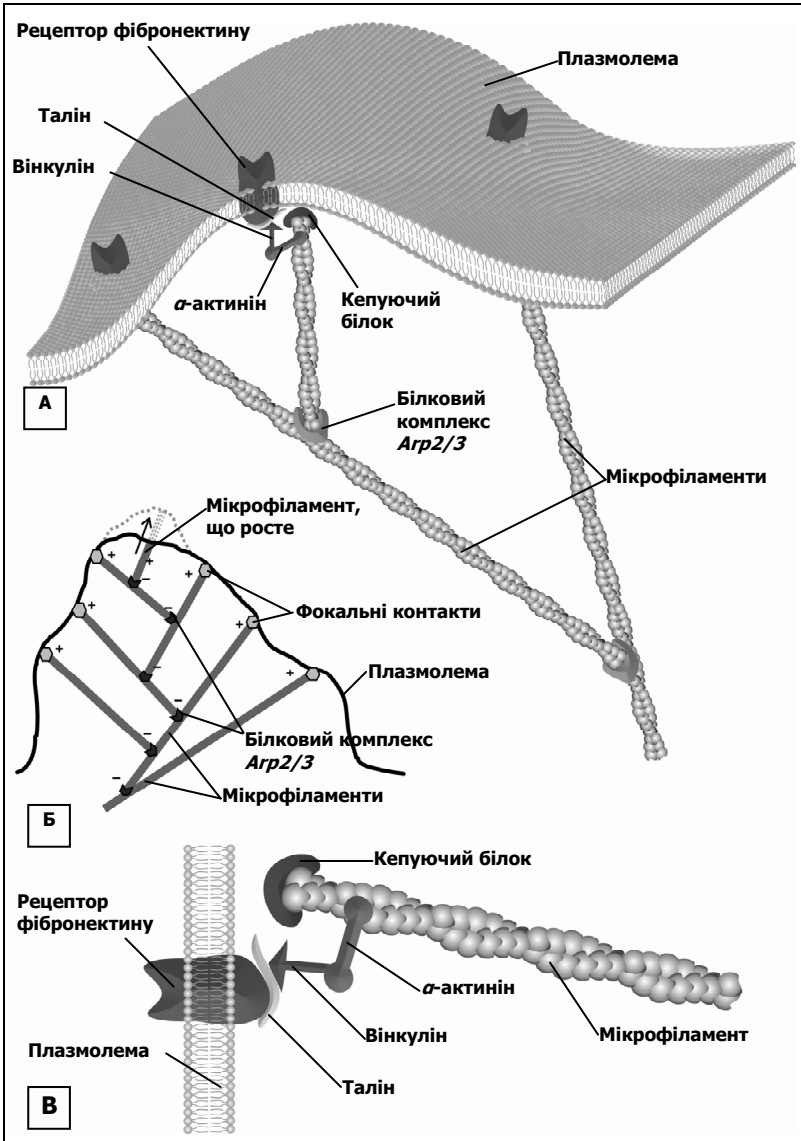


Рис. 7.10. Будова псевподій: А – об'ємний вигляд;
 Б – можливий механізм утворення псевподії;
 В – схема будови фокального контакту у фібробласта. Схема

У прикріпленні мікрофіламентів до плазмолемі беруть участь білки *WASP / Scar*. Крім того, за участю додаткових білків може утворюватися **фокальний контакт** (рис. 7.10, В). При його формуванні безпосередньо до актинового філамента приєднується α -актинін і *кепуочий білок*, який закриває "+"-кінець мікрофіламента. Із цими білками зв'язаний *вінкулін*, своїм іншим кінцем він приєднується до білка *таліну*, який може взаємодіяти з рецептором *фібронектину*. Останній є трансмембранним білком, що повністю пронизує плазмолему і з протилежного боку взаємодіє з фібронектиновим пучком. А отже, за допомогою фокального контакту фібробласт фактично прикріплюється до волокон позаклітинного матриксу й може по них переміщуватись, що здійснюється за рахунок взаємного ковзання мікрофіламентів за участю міозину.

Під час мітотичного поділу тваринної клітини мікрофіламенти забезпечують розподіл цитоплазми (**цитотомію**) *материнської клітини*. На початку цього процесу актинові мікрофіламенти вишиковуються паралельними пучками під плазмолемою (прикріплюючись до неї) в екваторіальній площині клітини. Між ними при цьому вбудовується міозин II. Завдяки ковзанню мікрофіламентів один відносно одного за участю міозину утворене ними *скоротливе кільце* стягується, тягнучи за собою плазмолему, і в такий спосіб розділяє материнську клітину на дві дочірні.

МІКРОТРУБОЧКИ

Ще одним компонентом цитоскелета є мікротрубочки – довгі трубчасті утворення. У цитоплазмі інтерфазної клітини вони, як правило, радіально розходяться від клітинного центра, розміщеного поблизу ядра. Деяка кількість мікротрубочок лишається не зв'язаною з клітинним центром і локалізована вільно в цитоплазмі.

Мікротрубочки складаються з білка *тубуліну*. Існують α - та β -тубуліни. Це глобулярні поліпептиди з молекулярною масою близько 54 кДа. Одна молекула α -тубуліну та одна молекула β -тубуліну утворюють димер. Тубулінові димери

з'єднуються один з одним "голова у хвіст" і формують *протофібрилу* (*протофіламент*). Тринадцять таких протофібрил розміщуються по колу й утворюють стінку мікротрубочки (рис. 7.11), порожню всередині. Зовнішній її діаметр становить ~25 нм, внутрішній - ~15 нм, а товщина стінки - ~5 нм.

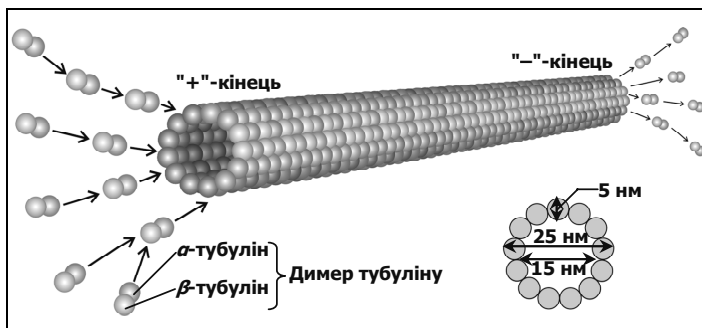


Рис. 7.11. Схема будови мікротрубочки

Коли димери тубуліну об'єднуються у протофіламент "голова у хвіст", то кожен наступний димер приєднується своїм α -тубуліном до β -тубуліну попереднього димеру. У результаті на одному кінці мікротрубочки будуть локалізовані α -тубуліни перших димерів, а на протилежному – β -тубуліни останніх (рис. 7.11). Тому, подібно до актинових мікрофіламентів, у мікротрубочці також розрізняють "+"- (із кінцевим β -тубуліном) і "-"- (із кінцевим α -тубуліном) кінці. До "+"-кінця молекули тубуліну в основному приєднуються, а від "-"-кінця – в основному від'єднуються. А отже, на "+"-кінці переважно йде збирання мікротрубочки, а на "-"-кінці – переважно її розбирання, завдяки цьому мікротрубочки, як і мікрофіламенти, можуть переміщуватись, тобто також здатні до *трєдмілінгу*. Проте трєдмілінг, про що вже згадувалося вище, для мікротрубочок менш характерний, ніж для мікрофіламентів. У мікротрубочок домінує *динамічна нестабільність*, яка полягає в чергуванні стадій швидкого розбирання і більш повільного росту (див. нижче).

Процес збирання та розбирання мікротрубочок відбувається безперервно. Це необхідно для постійної перебудови цито-

скелета в міру потреб клітини. Середній час життя мікротрубочок становить приблизно 5 хв, і лише невелика їхня частина існує у клітині до кількох годин. На процес збирання та розбирання мікротрубочок впливає температура, концентрація іонів Ca^{2+} (підвищення концентрації іонів Ca^{2+} сприяє розбиранню мікротрубочок), деякі модифікації тубуліну (наприклад, ацетилювання лізину або видалення кінцевого тирозину в молекулі тубуліну стабілізує мікротрубочки). Проте основна регуляція здійснюється спеціальними білками (див. нижче). Уведенням ряду речовин можна заблокувати процес збирання мікротрубочок (наприклад, колхіцином, вінбластином) або їхнє розбирання (скажімо, таксолем).

Поведінка мікротрубочок багато в чому подібна до поведінки мікрофіламентів, хоча і має певні відмінності. Димери тубуліну у мікротрубочках також об'єднані слабкими нековалентними зв'язками. Як уже йшлося вище, у протофіламенті вони розташовані "голова у хвіст" і поєднані за рахунок формування зв'язку між β -тубуліном попереднього димеру і α -тубуліном наступного. Коли ж протофіламенти збираються у мікротрубочку, то поперечні зв'язки формуються в основному між α -тубуліном одного протофіламента і α -тубуліном сусіднього, а також між β -тубуліном одного протофіламента і β -тубуліном сусіднього (рис. 7.12). Поздовжні α - β зв'язки є сильнішими, ніж поперечні зв'язки типу α - α і β - β . Тому димери тубуліну у протофіламенті поєднані сильніше, ніж протофіламенти, поєднані між собою.

Щоб мікротрубочка "розпалася" на фрагменти, необхідно щоб розірвалися поздовжні зв'язки між димерами тубуліну одразу в 13 протофіламентах, причому строго один навпроти одного (рис. 7.12). Оскільки ймовірність такої події значно менша, ніж ймовірність розриву двох поздовжніх зв'язків у актинових мікрофіламентах, то, на відміну від них, фрагментація мікротрубочки є вкрай рідкісною подією.

Щоб димер тубуліну, розміщений всередині мікротрубочки, міг від'єднатися, потрібно щоб зруйнувалося одразу 6 зв'язків (2 поздовжні зв'язки із сусідніми димерами у протофіламенті та 4 поперечні – з α - і β -тубулінами димерів сусідніх протофіламентів) (рис. 7.12). Ймовірність цього невисока, тому приєднання

і від'єднання димерів тубуліну зазвичай відбуваються лише на кінцях мікротрубочки (рис. 7.12). Теоретично димери тубуліну можуть приєднуватися і від'єднуватися і на "+"-кінці, і на "-"-кінці мікротрубочки (залежно від концентрації вільних димерів), однак на "+"-кінці це відбувається набагато швидше.

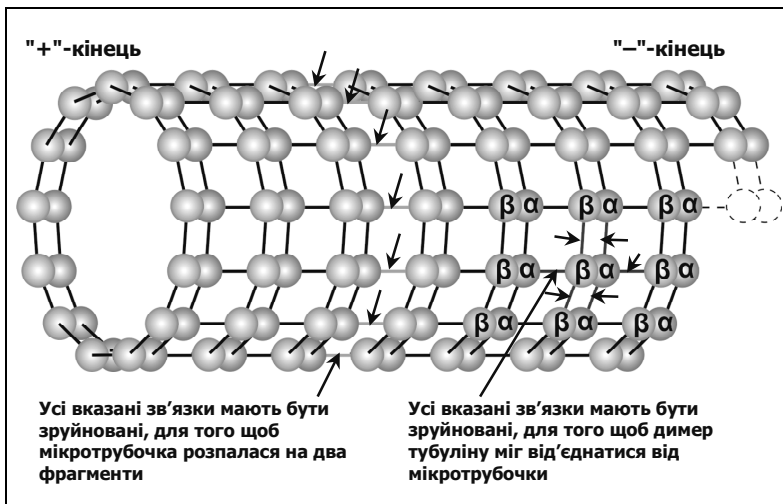


Рис. 7.12. Схема зв'язків димерів тубуліну у мікротрубочці

Протофіламенти в мікротрубочці вишикувані по колу і формують стінку трубочки досить великого діаметра (~25 нм, що в 3,5 рази більше за діаметр мікрофіламента і у 2,5 рази – за діаметр проміжного філамента). Із курсу фізики відомо, що міцність трубки на згин залежить від її діаметра, і наявність всередині порожнин при цьому не знижує її міцності. Тому мікротрубочки є жорсткими, прямими і майже не гнучкими.

Щоб нова мікротрубочка почала формуватися, необхідно щоб утворилися затравки для 13 протофіламентів, більш того, щоб вони вишикувалися по колу. Імовірність спонтанного формування такої складної за будовою затравки є вкрай низькою. Тому у клітині існують спеціальні *центри організації*

мікротрубочок (ЦОМТ), у яких саме й відбувається їхнє закладання. У ролі таких ЦОМТ у тваринних клітинах виступають голівки сателітів *центріолей* (під час інтерфази) і *фібрилярне гало* центріолей (під час мітозу) (див. нижче). Мікротрубочки при цьому закріплюються своїми "-"-кінцями на голівці сателіта, де, як вважають, наявні білки, які блокують або сповільнюють розбирання мікротрубочок із цього кінця. Ініціює закладання нової мікротрубочки γ -тубулін разом з додатковими білками. Вони формують кільцеподібні структури (*γ -tubulin ring complex, γ -TuRC*), що є шаблоном для росту нових мікротрубочок, які через деякий час можуть відриватись від голівок сателітів і перебувати самостійно в цитоплазмі (від'єднавшись, вони можуть також розібратися з "-"-кінця). У клітин вищих рослин, грибів та деяких найпростіших, у яких не виявлені центріолі, у ролі ЦОМТ виступають інші структури. Так, у грибів і діатомових водоростей роль ЦОМТ грають структури, вбудовані в ядерну оболонку у вигляді невеликої пляшки. У рослин мікротрубочки починають збиратися у наволоядерних ділянках, а під час мітозу – у так званих полярних шапочках. Проте і в цих "інакших" ЦОМТ закладання нових мікротрубочок також ініціює кільцевий комплекс γ -тубуліну.

Як і α -, так і β -тубулін у димері зв'язані з молекулою гуанозинтрифосфату (ГТФ). При цьому ГТФ у молекулі α -тубуліну ніколи не розщеплюється, а в молекулі β -тубуліну розщеплюється на ГДФ і фосфат після приєднання цього димеру до мікротрубочки. Як і у випадку гідролізу АТФ активом, гідроліз ГТФ β -тубуліном веде до зміни конформації димеру, послаблює зв'язок останнього із сусідніми димерами і вивільняє енергію, яка "запасується" у структурі мікротрубочки. Тому критична концентрація для β -тубулін-ГДФ є вищою, за критичну концентрацію для β -тубулін-ГТФ. Оскільки димери тубуліну на "+"-кінці швидко приєднуються, то самі крайні з них не встигають розщепити ГТФ. Тому на "+"-кінці у деякої кількості димерів β -тубулін зв'язаний із ГТФ, тобто виникає так званий ГТФ-"кеп". Тоді як на "-"-кінці димери

тубуліну приєднуються повільно, тому навіть крайні з них встигають розщепити ГТФ на ГДФ і фосфат. У результаті за високої концентрації димерів тубуліну мікротрубочка буде здатна рости з обох кінців; за низької – укорочуватися з обох кінців; а за концентрації, вищої за критичну для β -тубулін-ГТФ, але нижчої за критичну для β -тубулін-ГДФ – рости на "+"-кінці і вкорочуватися на "-"-кінці, тобто буде відбуватися тредмілінг. Проте мікротрубочки утворюються в ЦОМТ і, як правило, закріплені там своїми "-"-кінцями; тому тредмілінг для них є явищем нечастим, на відміну від активних мікрофіламентів.

Як зрозуміло з викладеного вище, "+"-кінець мікротрубочки залишається вільним. Наявний тут ГТФ-"кеп" може зникнути (крайні димери тубуліну можуть "встигнути" розщепити ГТФ на ГДФ і фосфат), і тоді мікротрубочка почне швидко розбиратися (за тим самим механізмом, за яким відбувається розбирання актинових мікрофіламентів). Потім ГТФ-"кеп" може відновитися, і мікротрубочка знову почне рости. Як уже зазначалося, таке почергове зростання та розбирання на "+"-кінцях (*динамічна нестабільність*) є більш характерним для мікротрубочок, ніж для мікрофіламентів. Як побачимо далі, у клітині існує цілий ряд білків, які можуть впливати на цей процес, що дає їй можливість регулювати ріст та розбирання своїх мікротрубочок.

Під час виконання своїх функцій тубулінові мікротрубочки взаємодіють з *MAP-*, або *БAM-білками* (білки, асоційовані з мікротрубочками; *microtubule-associated proteins*) (табл. 7.2; рис. 7.13). Ці білки ініціюють збирання нових мікротрубочок (γ -тубулін), регулюють процеси їхнього збирання-розбирання (статмін, катанін) і закривають кінці (γ -тубулін), впливають на динамічну нестабільність "+"-кінця мікротрубочки (білок *XMAP215*, кінезин-13), направляють і приєднують мікротрубочки до різних внутрішньоклітинних структур або до плазмолемі (+*TIP*-білки), формують пучки мікротрубочок (таубілок, білок *MAP2*), є білками-моторами (динеїн, кінезин).

БАМ-білки

Назва білка	Функція
γ -тубулін	Ініціює зборку нових мікротрубочок у ЦОМТ
Статмін	Зв'язується з димерами тубуліну, запобігаючи їхній полімеризації
Катанін	Розщеплює мікротрубочки на фрагменти; від'єднує "-"-кінці мікротрубочок від ЦОМТ
+ <i>TIP</i> -білки	Зв'язані з "+"-кінцем мікротрубочки, приєднують її до різних структур клітини
Кінезин -13	Посилює швидке розбирання мікротрубочки на "+"-кінці під час динамічної нестабільності
Білок <i>XMAP215</i>	Стабілізує "+"-кінець мікротрубочки і прискорює її збирання
Тау-білок	Поперечно зшиває мікротрубочки в пучок
Білок <i>MAP2</i>	Поперечно зшиває мікротрубочки в пучок
Плектин	Приєднує мікротрубочки до проміжних філаментів
Динеїн	Білок-мотор, переміщується по мікротрубочці від "+"-кінця до "-"-кінця
Кінезин	Білок-мотор, переміщується по мікротрубочці від "-"-кінця до "+"-кінця

Так, білок *статмін* регулює концентрацію тубуліну, "спроможного" до полімеризації: кожна його молекула зв'язується з двома димерами тубуліну і не дає їм приєднуватись до кінців уже існуючих мікротрубочок. При зростанні концентрації та активності цього білка концентрація вільного тубуліну падає, і, як наслідок, мікротрубочки не здатні продовжувати свій ріст. Якщо ж активність статміну падає, то концентрація вільного тубуліну зростає і мікротрубочки можуть швидко рости.

Інший БАМ-білок *катанін* розрізає мікротрубочку, розриваючи поздовжні зв'язки між димерами тубуліну в ній (рис. 7.13). Крім того, він здатний від'єднувати "-"-кінці мікротрубочок від γ -тубуліну в ЦОМТ, спричиняючи їхньою швидку деполімеризацію.

Існує ряд БАМ-білків, які закривають (кепують) кінці мікротрубочок. Уже згадуваний γ -тубулін, ініціювавши формування нової мікротрубочки, деякий час залишається зв'язаним з її "-"-кінцем, по-суті кепаючи його (рис. 7.13). Виявлені також спеціальні БАМ-білки, які кепають "+"-кінці мікротрубочок у війках та джгутиках, регулюючи у такий спосіб їхню довжину.

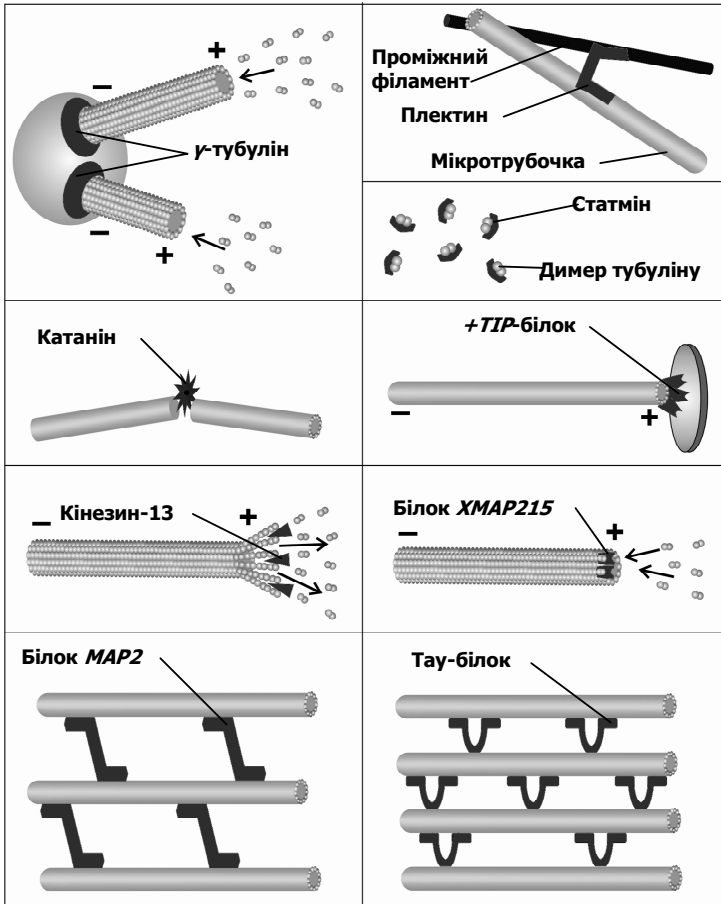


Рис. 7.13. Схема взаємодії БАМ-білків з мікротрубочками

Вище вже йшлося про те, що мікротрубочки, як правило, радіально розходяться від центральної частини клітини, де розміщені ЦОМТ. При цьому їхні "-"-кінці закріплені в центрі клітини на ЦОМТ, а "+"-кінці спрямовані до периферії клітини. Ці "+"-кінці можуть то рости, то швидко вкорочуватися, тобто, їм властива динамічна нестабільність.

Існує декілька груп БАМ-білків, які, зв'язуючись з "+"-кінцем мікротрубочки, впливають на його поведінку. Так, білок *кінезин-13* при з'єднанні трохи розтягує протофіламенти мікротрубочки (рис. 7.13), різко посилюючи ймовірність переходу її "+"-кінця до швидкого розбирання. Білок *XMAP215*, навпаки, при зв'язуванні з "+"-кінцем сприяє його стабілізації, різко зменшуючи ймовірність переходу до де полімеризації ("+"-кінець мікротрубочки буде продовжувати рости).

Представники іншої групи БАМ-білків, так звані *+TIP-білки* (*plus-end tracking proteins*), приєднуються до "+"-кінця мікротрубочки і "подорожують" з ним, направляючи його і приєднуючи до певних мішеней (рис. 7.13). Так, один із таких білків направляє "+"-кінці мікротрубочок веретена поділу під час мітозу до хромосом, закріплюючи їх на певних ділянках останніх. Завдяки цим двом згаданим групам БАМ-білків клітина може регулювати довжину й напрямок росту мікротрубочок та прикріплювати їх до певних внутрішньоклітинних структур або до плазмолем.

Ще одна група БАМ-білків, представниками якої є *таубілок* і білок *MAP2*, формує поперечні зшивки між мікротрубочками, з'єднуючи їх у пучки (рис. 7.13). Кожен із цих білків має ділянку зв'язування з мікротрубочкою, і плече, яке виступає назовні від неї і може взаємодіяти з іншою мікротрубочкою. Таубілок має більш коротке плече; тому в пучку, сформованому ним, мікротрубочки лежать дуже близько одна до одної. Білок *MAP2* плече має довге; тому в пучку, до формування якого залучений цей білок, мікротрубочки лежать відносно далеко одна від одної.

Основними функціями мікротрубочок є:

- участь у гелі-золь-переходах цитозолу;
- участь у підтриманні форми клітини;
- участь у переміщенні внутрішньоклітинних компонентів:
 - а) за рахунок збирання-розбирання (трєдмїлінгу);
 - б) за рахунок транспортування по них, як по рейках;

- закріплення органел та інших внутрішньоклітинних структур у певних місцях клітини;
- участь у забезпеченні полярності клітини;
- участь в утворенні центріолей;
- утворення війок і джгутиків;
- утворення веретена поділу в ході мітозу.

Участь мікротрубочок у гелі-золь-переходах цитозолу, так само як і мікрофіламентів, зумовлена їхньою здатністю до збирання й розбирання. За умови, коли більшість молекул тубуліну зібрані в мікротрубочки (полімеризовані), цитозоль перебуває у стані гелю, якщо ж у вільному (деполімеризованому) – у стані золю.

Мікротрубочки беруть **участь у підтриманні форми клітини**. Як уже зазначалося вище, мікротрубочки в клітині під час інтерфази радіально розходяться від клітинного центра (а саме, від голівок сателітів центріолей, які є центрами організації мікротрубочок). Своїми "-"-кінцями вони закріплені на голівці сателіта, тоді як їхні "+"-кінці спрямовані до периферії клітини. Регулюючи довжину мікротрубочок, що йдуть у різних напрямках, клітина може підтримувати свою форму, змінюючи її (до певної міри) за потреби (рис. 7.14). Крім того, створюючи такий внутрішньоклітинний скелет, мікротрубочки своїм розміщенням можуть задавати напрямки для цілеспрямованого переміщення різних речовин і компонентів усередині клітини та формувати своєрідний каркас для закріплення певних структур (скажімо, органел) у відповідних її місцях.

Роль мікротрубочок у процесах внутрішньоклітинного транспорту є дещо подібною до такої мікрофіламентів. Вони можуть сприяти переміщенню внутрішньоклітинних компонентів або за рахунок білків-моторів, які рухаються по мікротрубочках, як по рейках, або за рахунок одночасної дії білків-моторів і процесів збирання – розбирання мікротрубочок.

До моторних білків мікротрубочок належать **динейни** (вони рухаються по мікротрубочці від її "+"-кінця до "-"-кінця)

і **кінезини** (рухаються від "-"-кінця до "+"-кінця). Кінезини є великою родиною білків. Більшість їхніх різновидів мають дві голівки й довгу хвостову частину і за своєю будовою схожі на міозин II. Цитоплазматичні динеїни структурно подібні до них, вони також мають два "голівкові" домени. Проте і динеїни, і кінезини, подібно до міозинів, своїми "голівковими" кінцями прикріплюються до мікротрубочки, а хвостовою частиною – до внутрішньоклітинної структури, яку слід перемістити (наприклад, до органели чи секреторного пухирця). Використовуючи енергію гідролізу АТФ, ці білки-мотори "крокують" по мікротрубочці та, будучи зв'язаними іншим кінцем з "вантажем", фактично "тягнуть" його за собою (рис. 7.15).

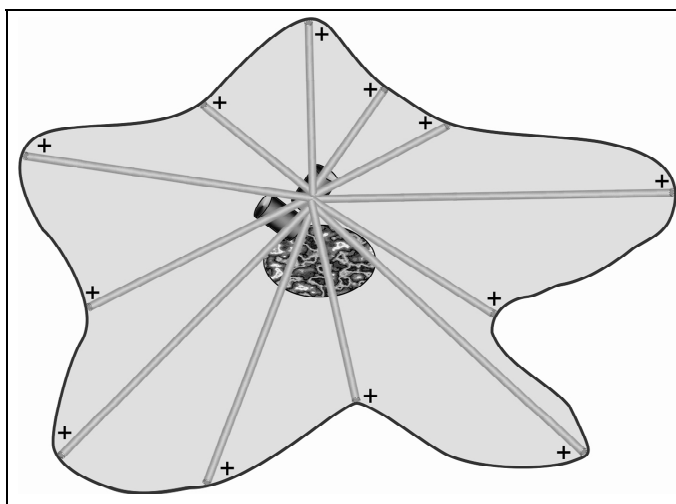


Рис. 7.14. Підтримка форми клітини за допомогою цитоскелету з мікротрубочок. Схема

Для кінезинів показано, що під час кожного "кроку" їхня задня голівка від'єднується від мікротрубочки, проходить мимо передньої голівки і зв'язується попереду неї із мікротрубочкою (рис. 7.15). При цьому, на початку кожного "кроку" зад-

ня голівка кінезину зв'язана з АТФ і міцно прикріплена до мікротрубочки, а передня зв'язана з АДФ і до мікротрубочки прикріплена слабо. Далі, на задній голівці АТФ розщеплюється на АДФ і фосфат, що веде до послаблення її з'єднання. У цей час на передній голівці відбувається заміна АДФ на АТФ, що призводить до зміцнення її приєднання до мікротрубочки й викликає зміну конформації кінезину таким чином, що це спричинює "перекидання" задньої голівки в переднє положення. Тепер задня голівка (зв'язана з АДФ) стала передньою, а передня (зв'язана з АТФ) – задньою. Кінезин готовий зробити наступний "крок". Подібним чином, але в протилежному напрямку, переміщується і динеїн.

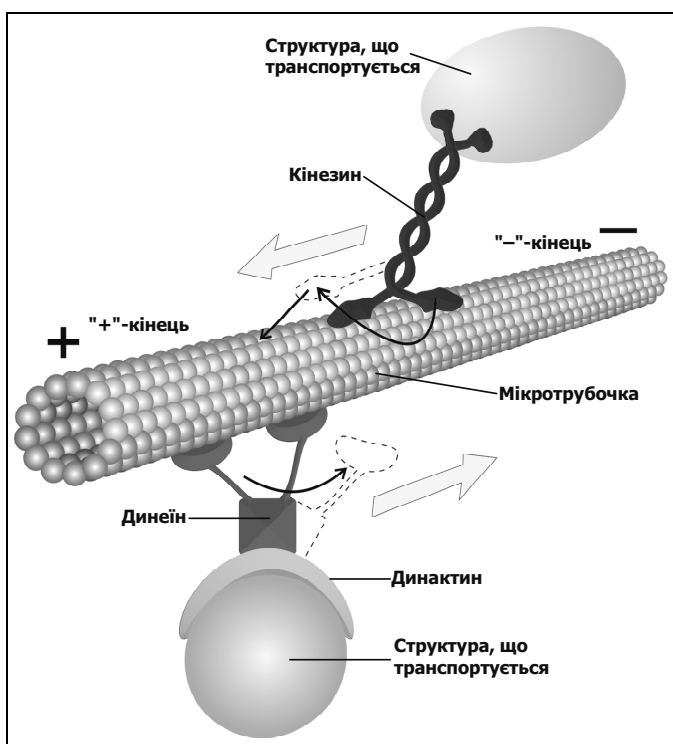


Рис. 7.15. Схема транспорту по мікротрубочці за допомогою білків-моторів динеїну та кінезину

Для з'єднання з кінезінами в мембранах органел і везикул наявні спеціальні, здатні зв'язуватися з їхніми хвостовими частинами, інтегральні білки. Слід відмітити, що кожний різновид кінезину має "свою" хвостову частину, яка з'єднується лише зі "своїми" мембранними білками, а отже, забезпечує транспортування тільки певної структури.

За зв'язування мембранних органел і везикул з динеїном відповідальний так званий *динактиновий комплекс* (рис. 7.16). До його складу (крім динактину) входить короткий актиноподібний філамент із білка *Arp1*, зв'язаний зі спектрином, який, у свою чергу, поєднаний з анкірином. Останній зв'язується з інтегральними глікопротеїнами мембрани органели чи везикули, що транспортується. Як бачимо, динактиновий комплекс досить схожий за будовою на поверхневий актиновий цитоскелет, який підтримує форму клітини. Тому вважають, що він бере участь не лише у приєднанні мембрани "вантажу" до динеїну, а й стабілізує її.

Коли "вмикається" моторний білок динеїн, утворюється функціональний зв'язок динеїн – динактин – актиноподібний філамент. Однак існують дані, що динеїн може приєднуватись до "вантажу" (структури, яку слід перемістити) не тільки через динактиновий комплекс, а й напряму.

І нарешті, у клітині виявлені БАМ-білки, які одним своїм кінцем прикріплюються до певної органели, а іншим – до мікротрубочки, не переміщуючись при цьому по ній. У результаті ***органела закріплюється в певному місці клітини***. Ймовірно, що саме в такий спосіб відбувається закріплення у клітині апарату Гольджі, цистерн ендоплазматичної сітки та мітохондрій. Щоправда, останнім часом з'явилися дані, що в закріпленні апарату Гольджі бере участь динеїн, а ендоплазматичної сітки – кінезин.

Мікротрубочки також ***входять до складу центріолей, війок та джгутиків***. Крім того, мікротрубочки під час мітозу або мейозу ***утворюють веретено поділу*** – структуру, яка забезпечує розходження хромосом до дочірніх клітин (див. розд. "Відтворення клітин. Клітинний цикл").

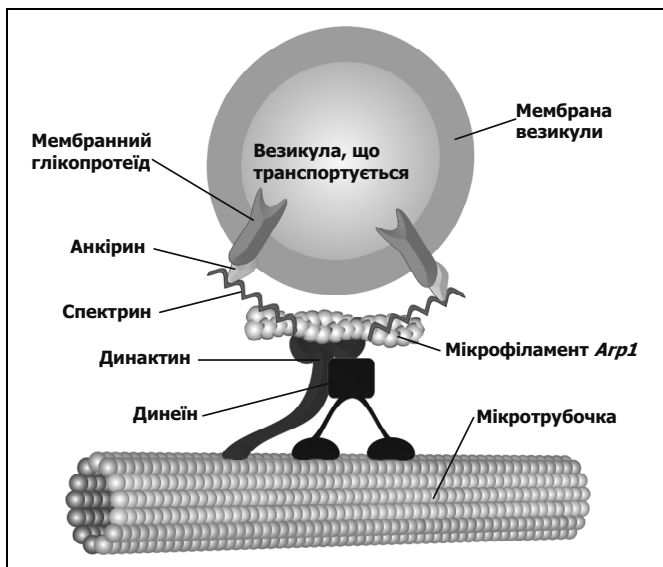


Рис. 7.16. Будова динактинового комплексу. Схема

ЦЕНТРІОЛІ

Центріоль має циліндричну форму. Діаметр її становить близько 0,15 мкм, а висота 0,3–0,5 мкм.

Стінка центріолярного циліндра побудована із дев'яти триплетів мікротрубочок (рис. 7.17, 7.18). Кожний **триплет** розміщений під кутом 40° щодо радіуса центріолі й складається із трьох мікротрубочок, які позначаються літерами А, В і С. В-мікротрубочка прилягає до А-мікротрубочки, а С-мікротрубочка – до В-мікротрубочки.

А-мікротрубочка кожного триплету має типову будову – вона містить 13 протофібрил. В-мікротрубочка складається з 11 власних протофібрил, ще 2 її протофібрили є спільними з А-мікротрубочкою. С-мікротрубочка також складається із 11 власних протофібрил і має ще 2 протофібрили, спільні з В-мікротрубочкою

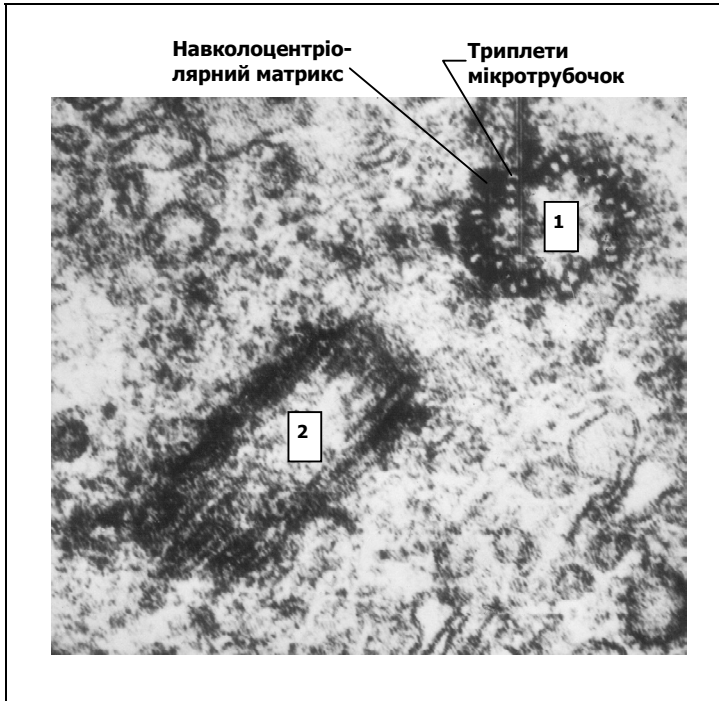


Рис. 7.17. Електронограма диплосоми (пари центріолей):
 1 – поперечний зріз центріолі;
 2 – поздовжній зріз центріолі.
 Контрастування ураніл ацетатом і осміевою кислотою. $\times 9000$

Від А-мікротрубочки кожного триплету відходять по два вирости (зовнішній і внутрішній), які називають *ручками*. Зовнішній виріст направлений до С-мікротрубочки сусіднього триплету, внутрішній – до центра центріолярного циліндра. Обидва вирости складаються з білка динеїну.

Усі триплети занурені в електроннощільний дрібнозернистий матрикс. У центрі центріолі мікротрубочок немає (рис. 7.18). Тому систему мікротрубочок центріолі описують формулою $(9 \times 3) + 0$.

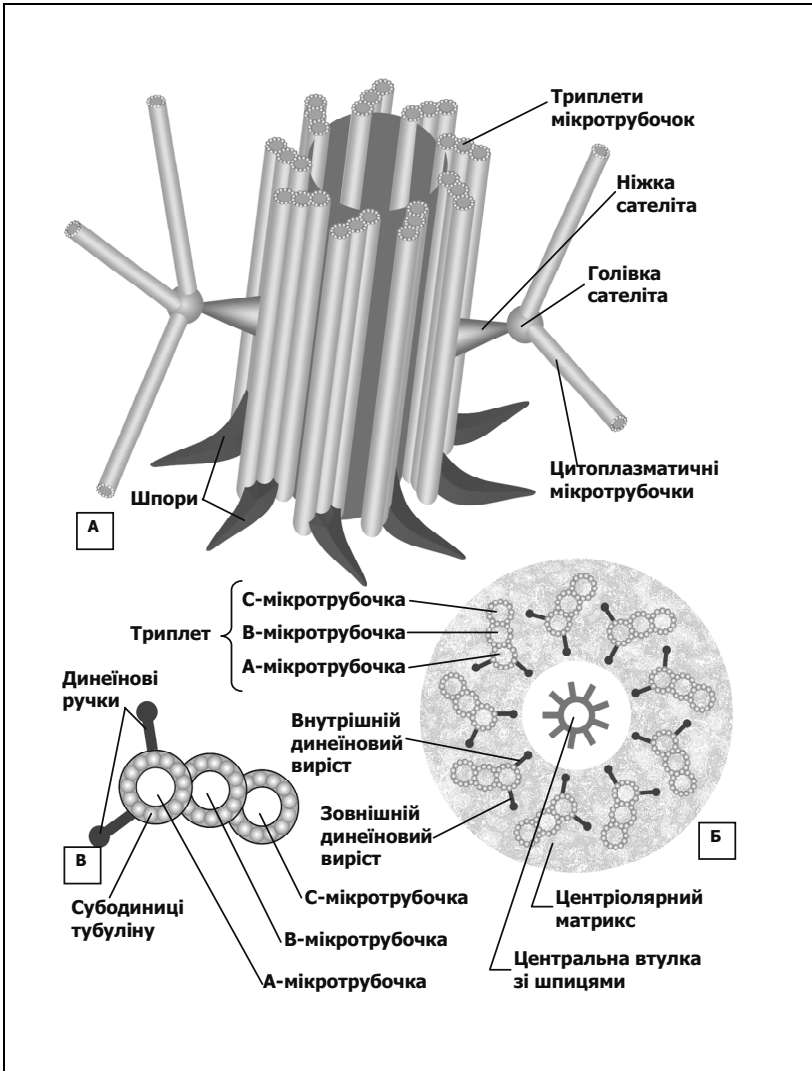


Рис. 7.18. Схема будови центріолі: А – об'ємний вигляд центріолі (центрілярний матрикс і динеїнові ручки не показані);
 Б – зріз через проксимальну частину центріолі;
 В – будова триплету центріолі

Центральна частина самої центріолі на одному з кінців – *дистальному* – не містить ніяких структур (хоча на дистальній ділянці кожного триплету можуть бути *шпори*), тоді як на іншому – проксимальному – наявна *центральна втулка зі спицями*. Спиць дев'ять, вони відходять від центральної втулки по одній до кожного триплету. Центральна втулка зі спицями займає приблизно від 3/4 до 1/5 висоти центріолярного циліндра.

Центріоль може мати додаткові структури – *фібрилярне гало* або *сателіти*. Останні складаються з конусоподібної ніжки та округлої голівки. Голівки сателітів є центрами організації мікротрубочок (ЦОМТ) під час інтерфази, саме від них починається формування нових мікротрубочок цитоплазми. Фібрилярне гало виконує роль ЦОМТ під час мітозу, від нього відходять мікротрубочки веретена поділу (рис. 7.18).

Як кількість центріолей, так і наявність або відсутність сателітів чи фібрилярного гало закономірно змінюються протягом клітинного циклу (рис. 7.19). На G0- і G1-стадіях інтерфази в клітині містяться дві центріолі: материнська й дочірня (рис. 7.19). Таку пару центріолей називають *диплосомою*, або *клітинним центром*. Розміщені вони під прямим кутом одна до одної. При цьому дочірня центріоль повернута до материнської своїм проксимальним кінцем. На материнській центріолі є сателіти (від яких відходять мікротрубочки) і шпори на дистальній ділянці кожного з її триплетів. На дочірній центріолі сателітів та інших додаткових структур немає, вона "гола".

На S-стадії інтерфази центріолі подвоюються (рис. 7.19). Для цього материнська й дочірня центріолі розходяться. Перпендикулярно до кожної з них закладаються нові центріолі. По закінченні S-фази та протягом усієї G2-фази в клітині присутні чотири центріолі, при цьому лише на одній із них (найстаршій) розміщені сателіти, інші три центріолі – "голі".

На початку мітозу сателіти з найстаршої центріолі зникають, мікротрубочки в цитоплазмі розбираються (рис. 7.19). Одна пара центріолей (диплосома) відходить до одного полюса клітини, а інша – до протилежного. Навколо материнської

центріолі в кожній диплосомі утворюється фібрилярне гало, від якого формуються мікротрубочки веретена поділу. Дочірні центріолі в складі кожної диплосоми залишаються "голими". Після цитотомії (поділу цитоплазми) у складі кожної із двох новоутворених клітин залишається по одній диплосомі.

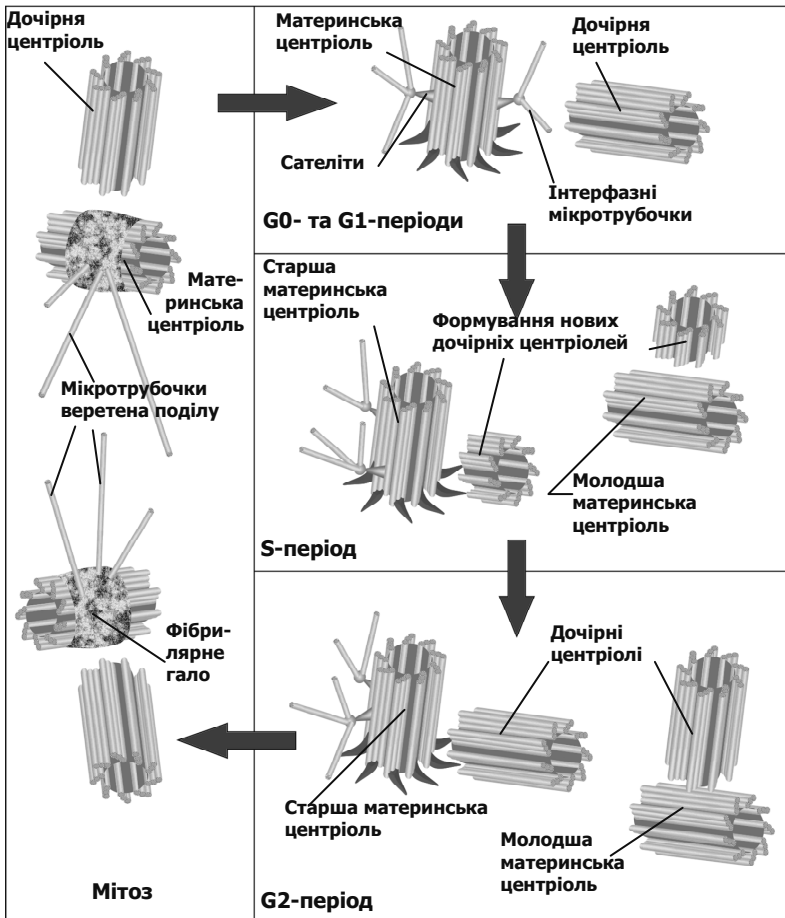


Рис. 7.19. Зміна будови та кількості центріолей протягом клітинного циклу (центріольярний цикл). Схема

По закінченні мітозу мікротрубочки веретена поділу розбираються, на материнській центріолі зникає фібрилярне гало й формуються сателіти (рис. 7.19). Від них починається утворення мікротрубочок, які функціонуватимуть в інтерфазі. Настає новий G1-період.

ВІЙКИ І ДЖГУТИКИ

Мікротрубочки є основними компонентами **війок** і **джгутіків** – органів руху в деяких найпростіших, а також у деяких клітин багатоклітинних організмів (скажімо, у сперматозоїдів наявний джгутик; у клітин слизової оболонки носа – війки, за допомогою яких переміщується слиз разом із частинками пилу).

В основі кожного джгутика та кожної війки міститься структура, яку має назву **базальне тільце** (рис. 7.20,Б), вона дуже подібна за будовою до центріолі (і, мабуть, з неї утворюється). Стінка базального тільця побудована з дев'яти триплетів мікротрубочок, у центральній частині мікротрубочки відсутні. Через це систему мікротрубочок базального тільця описують формулою $(9 \times 3) + 0$.

Кожен джгутик або війка ззовні вкриті плазмолемою, під якою міститься **аксонома** – структура діаметром близько 200 нм, утворена з мікротрубочок. Аксонома у війки та джгутика побудована з дев'яти пар мікротрубочок – **дуплетів**, кожен із яких складається з А- і В-мікротрубочок.

Як і у центріолі й базального тільця, А-мікротрубочка утворена із 13 протофібрил, В-мікротрубочка прилягає до А-мікротрубочки й має 11 власних протофібрил і 2 – спільні з А-мікротрубочкою. А- і В-мікротрубочки аксонами продовжуються від відповідних мікротрубочок базального тільця. Від А-мікротрубочки відходить два **динейнові вирости**: внутрішній спрямований до В-мікротрубочки сусіднього дуплету, а зовнішній – до центра аксономи. Між собою дуплети мікротрубочок скріплені білком **нексином**. У центрі аксономи є ще одна пара мікротрубочок, кожна з яких сформована з 13 протофібрил.

Систему мікротрубочок аксонемі війок і джгутиків зображують у вигляді формули $(9 \times 2) + 2$ (рис. 7.20,А).

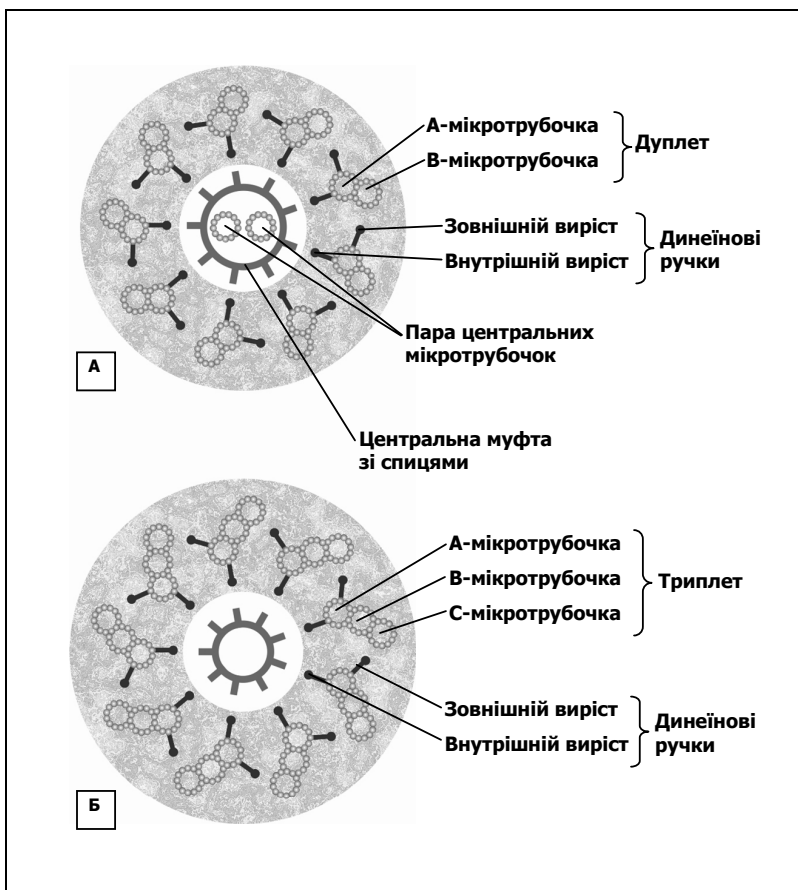


Рис. 7.20. Схема будови:
 А – аксонемі джгутика й війки;
 Б – базального тільця

Також у центрі аксонемі міститься *муфта*, яка оточує дві центральні мікротрубочки. Вона зв'язана спицями з А-мікротрубочкою кожного дуплету.

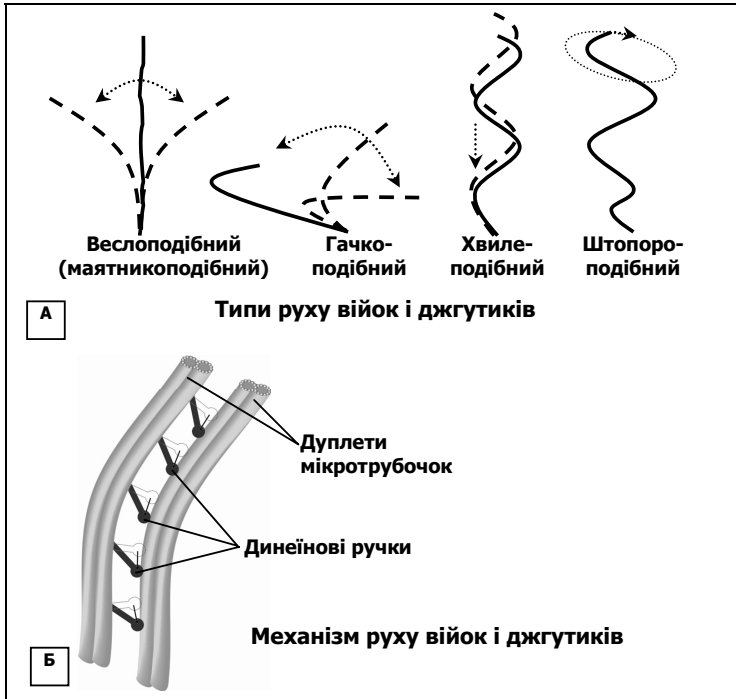


Рис. 7.21. Типи і механізм руху війок і джгутиків. Схема

Будучи подібними за будовою та механізмом руху, війки і джгутики відрізняються кількістю, довжиною та характером руху. Джгутики довгі, їх в одній клітині може бути один або два. Війки коротші, як правило, їх досить багато (до кількох сотень і навіть тисяч) на одну клітину. Характер руху цих органів може бути штопороподібний, хвилеподібний, гачкоподібний, веслоподібний (рис. 7.21,А). Як правило, характер руху джгутиків штопороподібний, а війок – веслоподібний.

Механізм руху війок та джгутиків подібний. У русі задіяні динеїнові ручки. Молекули динеїну, які відходять від А-мікротрубочки, своїми голівками переміщуються по В-мікротрубочці сусіднього дуплету. Це веде до зміщення дуплетів один відносно одного. У результаті війка або джгутик згина-

ється (рис. 7.21,Б), проте як саме координується узгоджена робота динеїнових ручок із різних дуплетів, невідомо ще й досі. Так само залишається незрозумілим, як синхронізується рух багатьох війок.

ПРОМІЖНІ ФІЛАМЕНТИ

Проміжні філаменти є третім компонентом цитоскелета. Це довгі нитчасті утворення діаметром близько 10 нм, які пронизують цитоплазму в різних напрямках. Вони можуть формувати термінальну сітку по периферії клітини й "корзинку" навколо ядра. Крім того, проміжні філаменти формують ядерну *ламіну* (ядерна ламіна – компонент ядерного скелета; детальніше див. розд. "Принципи структурно-функціональної організації еукаріотичного ядра").

Проміжні філаменти в клітинах різних тканин тваринного організму складаються з різних білків (табл. 7.3), які можна поділити на 4 типи. До першого типу належать *білки ядерної ламіни*, до другого – *кератини (цитокератини)*, із яких побудовані проміжні філаменти в епітеліальних клітинах. До третього типу належить три різновиди білків, котрі формують проміжні філаменти у клітинах різних тканин: *віментин* – у клітинах сполучної тканини, *десмін* – м'язових клітинах, *гліальний фібрилярний кислий білок* – у клітинах нейроглії. Четвертий тип – це *білки нейрофіламентів*, із яких побудовані проміжні філаменти в нейронах. У клітинах рослин зазначені філаменти не виявлені.

Усі білки проміжних філаментів у центральній частині мають подібну послідовність із 130 амінокислотних залишків, які закручені в α -спіраль. Краї молекули кожного різновиду білка відрізняються за амінокислотою послідовністю. Наявність довгих α -спіральних ділянок дозволяє двом молекулам білка сплестися у подвійну спіраль з утворенням димеру видовженої форми.

Білки проміжних філаментів

Назва білка	Молекулярна маса, кДа	Розміщення
Ламіни А, В, С	65–75	Ядерна ламіна
Кератини (кислі й основні)	40–70	Епітеліальні клітини
Віментин	54	Клітини сполучних тканин
Десмін	53	М'язові клітини
Гліальний фібрилярний кислий білок	50	Клітини нейроглії
Білок нейрофіламентів	60–130	Нейрони

Усі проміжні філаменти, що розташовані в цитоплазмі, побудовані за єдиним планом. Спочатку дві молекули відповідного білка (кератину, якщо проміжний філамент міститься в епітеліальній клітині; віментину – якщо в сполучній; десміну – якщо в м'язовій і т. д.) об'єднуються в димер видовженої форми довжиною близько 48 нм (рис. 7.22). С-кінці обох білкових молекул розташовуються на одному кінці димеру, а N-кінці – на іншому. Потім два димери об'єднуються в антипаралельний тетрамер товщиною приблизно 3 нм : на кожному його кінці знаходяться С-кінці молекул одного димеру та N-кінці молекул іншого. Саме через те, що на обох кінцях проміжного волокна частина молекул розташована С-кінцем, а частина – N-кінцем, проміжні філаменти, на відміну від мікрофіламентів і мікротрубочок, не мають "+"- і "-"-кінців, а обидва їхні кінці рівнозначні.

Димери в тетрамері зміщені один відносно одного, що дозволяє їм зв'язуватися з іншим тетрамером. Останні у подальшому складаються "голова у хвіст" і формують протофіламент. Вісім таких протофіламентів розміщуються паралельним пучком і спіральньо скручуються один навколо одного (подібно до того, як скручені окремі нитки в канаті чи мотузці), утворюючи проміжне волокно (рис. 7.22). Сформоване у такий спосіб волокно є досить гнучким і міцним (його дуже важко "зламати").

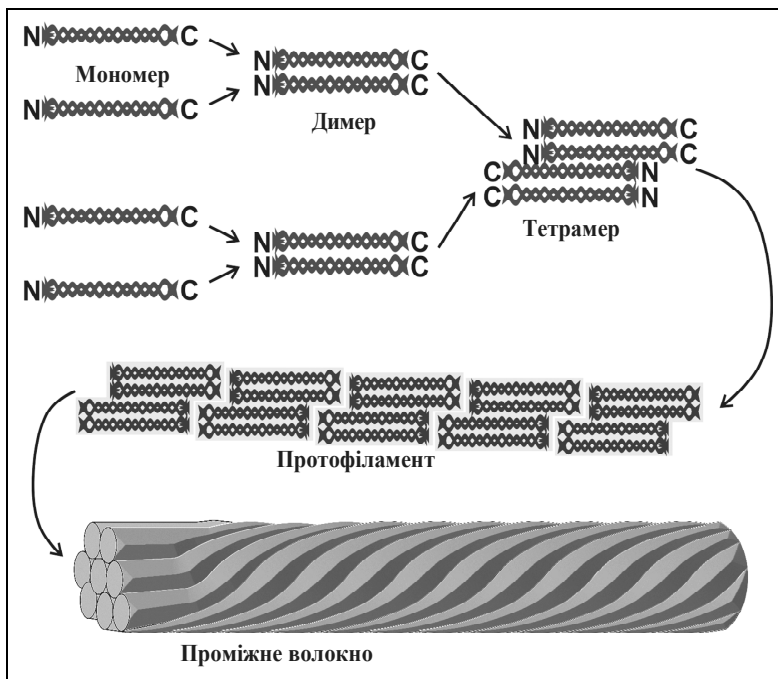


Рис. 7.22. Схема будови проміжного філамента

Проміжні філаменти можуть бути зібрані в пучки завдяки додатковим білкам, які формують між ними поперечні зшивки. Якщо в епітеліальних клітинах проміжні філаменти, побудовані тут із цитокератину, зшиваються білком *філагрином*, то білки проміжних філаментів у нейронах самі мають ділянку, яка, виступаючи вбік з поверхні зібраного проміжного філамента, забезпечує зв'язування із сусідніми проміжними волокнами. А виявлений білок *плектин* здатен не тільки зв'язувати проміжні філаменти у пучки, а й приєднувати їх до мікротрубочок, мікрофіламентів та до білків механічних (адгезивних) міжклітинних контактів.

Оскільки, як зазначено вище, проміжні філаменти не мають "+"- і "-"-кінців, то вони не здатні до тредмілінгу. Більш того, на відміну від мікрофіламентів і мікротрубочок, вони не зазнають постійного збирання-розбирання, будучи найстабільнішими ком-

понентами цитоскелета. Саме тому *основною функцією проміжних філаментів є механічна, каркасна*. Цю їхню функцію можуть проілюструвати добре розвинені проміжні філаменти в нейронах, які підтримують аксони та дендрити указаних клітин. Ці філаменти *входять до складу десмосом і напівдесмосом* – механічних міжклітинних контактів (детальніше див. у розд. 4). Крім того, вони є в ядрі, де *формують ядерну ламіну*, яка підтримує цілісність і форму ядра, служить для прикріплення хромосом до його поверхневого апарату.

ВЗАЄМОДІЯ ЕЛЕМЕНТІВ ЦИТОСКЕЛЕТА

Узагальнюючи викладене вище, слід підкреслити, що мікрофіламенти, мікротрубочки та проміжні філаменти функціонують не ізольовано, а взаємодіють між собою.

Так, усі ці елементи беруть участь у підтриманні форми клітини. Мікротрубочки радіально розходяться від клітинного центра до периферії клітини. Додатково форма клітини стабілізується завдяки кортикальному шарові цитоплазми, збагаченому мікрофіламентами. Проміжні філаменти створюють механічний каркас у цитоплазмі та в ядрі клітини. Особливо велика роль проміжних філаментів у підтриманні структури клітинних відростків (наприклад, аксонів і дендритів у нервових клітинах). Структура мікрворсинок підтримується завдяки актиновим мікрофіламентам, розташованим паралельним пучком уздовж мікрворсинки. Своїми кінцями біля її основи мікрофіламенти приєднуються до сітки з проміжних філаментів.

Мікротрубочки слугують рейками, уздовж яких за допомогою моторних білків динеїну й кінезину здійснюється транспорт внутрішньоклітинних структур. Вважається, що в такий спосіб мікротрубочки забезпечують перебіг процесів екзоцитозу та ендоцитозу. Проте внутрішньоклітинні структури можуть рухатися й уздовж мікрофіламентів. Таке переміщення відбувається завдяки іншому білку-мотору – міозину. Мікротрубочки є осно-

вним компонентом аксонемами джгутиків і війок. Ці структури здійснюють рух клітин у просторі або якихось рідин відносно самих клітин. Мікрофіламенти ж забезпечують переміщення клітин за допомогою псевдоподій, тобто завдяки узгодженій роботі мікротрубочок і мікрофіламентів здійснюються різні внутрішньоклітинні рухи та переміщення самих клітин у просторі.

Під час поділу клітини мікротрубочки утворюють веретено поділу. За його допомогою відбувається розходження хромосом до полюсів. Актинові філаменти у тваринних клітинах у цей час разом із білком-мотором міозином формують актиноміозинове скоротливе кільце по екватору клітини. Воно забезпечує поділ клітини на дві дочірні.

Клітини у складі багатоклітинного організму можуть бути з'єднаними між собою міжклітинними контактами. В утворенні деяких механічних міжклітинних контактів беруть участь мікрофіламенти та проміжні філаменти. Так, у десмосомі до плазмолем двох контактуючих клітин підходять проміжні філаменти. Тут ці філаменти взаємодіють з білками десмоплакінами, а останні – з десмогліїнами – інтегральними глікопротеїнами плазмолемі. Десмогліїни цих двох клітин з'єднуються між собою, забезпечуючи, по-суті, об'єднання проміжних філаментів двох сусідніх клітин між собою, що дозволяє клітинам міцніше прикріпитись одна до одної. Подібну структуру має й так званий адгезивний пояс, в якому контактують мікрофіламенти двох сусідніх клітин.

Скоординована взаємодія мікротрубочок та мікрофіламентів вносить свій вклад у поляризацію цілої клітини. Так, мікрофіламенти часто орієнтуються "+"-кінцями в напрямку переміщення клітини, де формуються псевдоподії. А мікротрубочки, про що вже йшлося вище, відходячи від центріолей, спрямовані своїми "+"-кінцями до периферії клітини. В епітеліальних клітинах мікротрубочки можуть також орієнтуватися в напрямку від базальної до апікальної частини клітини, їхні "+"-кінці при цьому спрямовані до апікальної частини. Функціонально мотивована орієнтація розташування в клітині мікротрубочок і мікрофіламентів та узгодженість їхньої взаємодії дозволяє за участю моторних білків (кінезину, динеїну, міозину) направлено перемі-

щувати певні речовини та органели, а також закріплювати їх у певних місцях клітини, підтримуючи таким чином відмінності між різними її частинами. Крім того, закріплення в певних місцях клітини різних білків та мРНК може призвести до того, що після її поділу в різних дочірніх клітинах опиняться різні білки та мРНК. А це, у свою чергу, може вплинути на процеси диференціювання клітин.

Під час ембріонального та постембріонального розвитку здійснюється переміщення клітин і цілих клітинних пластів, зміна їхньої форми тощо. Усі ці процеси також забезпечуються узгодженою роботою елементів цитоскелета. Так, під час закладання нервової трубки (цей процес називається нейруляцією) клітини ектодерми на спинній частині зародка (клітини так званої нервової пластинки) спочатку стають вищими, а потім замикаються у трубку (рис. 7.23). Показано, що збільшення висоти клітин відбувається через видовження мікротрубочок, які розміщуються паралельно апікально-базальній осі клітини. Потім в апікальній частині клітини формується актиноміозинове скоротливе кільце, подібне до скоротливого кільця, що формується під час поділу клітини. Завдяки його скороченню апікальна частина звужується, що надає клітинам трапецієподібної форми. Оскільки ж цей процес відбувається узгоджено в усіх клітинах нервової пластинки, то це веде до замикання пласта клітин у нервову трубку (рис. 7.23).

Отже, елементи цитоскелета формують єдину опорно-рухову систему клітини.

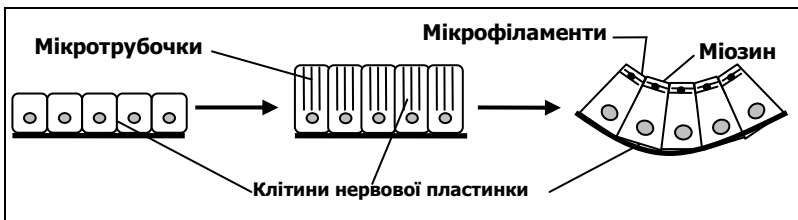


Рис. 7.23. Участь цитоскелета в нейруляції. Схема

ПАТОЛОГІЯ ЦИТОСКЕЛЕТА

Елементи цитоскелета, як і сам він у цілому, зазнають різноманітних змін при розвитку багатьох хвороб і патологічних станів. Це певним чином відбивається на тих чи інших функціях клітини.

Патологія мікрофіламентів є достатньо різноманітною. З порушенням їхньої функції пов'язують, наприклад, деякі види *холестази* – застою жовчі. Показано, що пригнічення скоротливої здатності мікрофіламентів гепатоцитів спричинює зменшення розміру просвіту жовчних каналців, результатом чого є застій жовчі.

Збільшення кількості мікрофіламентів описано в клітинах злоякісних пухлин, особливо в зонах пухлинної інвазії. Аналогічне зростання є характерним і для деяких репаративних процесів, скажімо, воно спостерігається при загоюванні ран.

Патологія проміжних філаментів пов'язана переважно з їхнім накопиченням у клітині, що спостерігається, наприклад, при утворенні алкогольного гіаліну (тілець Меллорі), хворобі Альцгеймера та деяких формах кардіоміопатій.

Відомий американський патолог Меллорі на початку ХХ ст. описав у клітинах печінки (гепатоцитах) при алкоголізмі гіалінові включення неправильної форми (*алкогольний гіалін*, фібрилярний білок, що синтезується гепатоцитами під впливом етанолу), які назвали на його честь тільцями Меллорі. Вважається, що алкогольний гіалін утворюється при агрегації проміжних філаментів, що визнається, однак, не всіма дослідниками.

Алкольний гіалін Меллорі має характерну ультраструктуру і виявляється не лише в гепатоцитах, а також у ацинусах підшлункової залози та нейронах головного мозку. Нині накопичення проміжних філаментів у клітинах епітеліального та мезенхімного походження вважається морфологічною ознакою хронічного алкоголізму. *Гіалін Меллорі*, хоча найчастіше й виникає при алкогольному цирозі, проте утворюється також і при розвитку інших хвороб, таких як індійський дитячий цироз, гепатоцеребральна дистрофія (хвороба Вільсона – Коновалова), первинний біліарний цироз тощо.

Хвороба Альцгеймера, або "пресенільна" деменція, супроводжується утворенням фібрилярних мас у нейронах кори головного мозку літніх людей. Утворені фібрилярні маси є патологічно зміненими нейрофіламентами, які формують сплетення. Клінічними проявами даної патології є недоумство.

Спадкова нейропатія гігантських аксонів пов'язана з утворенням сплетень нейрофіламентів уздовж аксонів периферійних нервів і в нервових сплетеннях.

Кардіоміопатії зумовлені порушенням метаболізму десміну проміжних філаментів. Їхня клініка виявляється прогресуючою недостатністю міокарда й характеризується масивними відкладеннями в кардіоміоцитах матеріалу, який складається із проміжних філаментів.

Патологія мікротрубочок також може бути основою деяких хвороб. Як приклад можна навести *синдром нерухомих війок (уроджений синдром Картагенера)*. При цьому захворюванні війки епітелію дихальних шляхів і слизової оболонки середнього вуха стають малорухливими. У результаті різко знижується, аж до його повного припинення, транспорт слизу. Це, у свою чергу, приводить до хронічного запалення дихальних шляхів і середнього вуха. У таких хворих розвивається також безпліддя, бо джгутики сперматозоїдів втрачають здатність рухатися. Мала рухливість війок і джгутиків при цій хворобі виникає через дефект або повну відсутність білка динеїну (у нормі війки рухаються в результаті переміщення дуплетів мікротрубочок саме завдяки наявності в ручках цього білка). Причиною дефекту динеїну є мутація гена, котрий кодує цей білок.

Відсутність зв'язку між периферійними та центральними дуплетами у війках також спричинює їхню малорухливість, унаслідок чого розвиваються найрізноманітніші патології. Так, при інфекційних бронхітах через малорухливість війок відсутній рух слизу в бронхах. Патологічна зміна війок часто виявляється в курців, при цьому відмічають появу безлічі дуплетів і відзначають їхню малорухливість. Розмноження центріолей з утворенням "кист війок" часто спостерігається в генітальному тракті жінок при хронічних запаленнях (гонорея, хламідіоз, уреоплазмоз тощо).

Запитання для самоперевірки

1. Ультраструктурна будова мікротрубочки.
2. Ультраструктурна будова мікрофіламентів.
3. Що таке тредмілінг?
4. Ультраструктурна будова проміжних філаментів.
5. Які функції виконують проміжні філаменти?
6. Як відрізняються за хімічним складом проміжні філаменти у клітинах різних тканин?
7. Якщо обробили клітину антитілами до тубуліну, де вони будуть локалізовані? Чому?
8. Якщо обробити клітину антитілами до актину, де вони будуть локалізовані? Чому?
9. Яким чином мікрофіламенти можуть зумовлювати рух внутрішньоклітинних компонентів?
10. Як саме мікротрубочки можуть зумовлювати рух внутрішньоклітинних компонентів?
11. Назвіть функції білків динеїнів і кінезінів?
12. Які типи руху клітин зумовлюють мікротрубочки?
13. Які типи руху клітин зумовлюють мікрофіламенти?
14. У клітині зруйновано мікрофіламенти та мікротрубочки. У результаті припинився процес виведення секрету. Чому?
15. Які функції клітини порушуються, якщо в ній викликати деполімеризацію актинових філаментів?
16. Які особливості будови кортикального шару цитоплазми?
17. Чим відрізняється кортикальна цитоплазма від внутрішніх ділянок цитоплазми?
18. Як впливає концентрація іонів Ca^{2+} на цитоскелет?
19. Як впливає колхіцин на цитоскелет?
20. Характер дії цитохалазинів на цитоскелет.
21. Опишіть будову центріолі.
22. Чи всі еукаріотичні клітини мають центріолі? Відповідь поясніть.
23. За допомогою мікроманіпулятора із клітини видалили центріолі клітинного центру. Як це відобразиться на життєдіяльності клітини?
24. Опишіть будову базального тільця.
25. Яка структура та функції війок?
26. Опишіть структуру й функції джгутиків.
27. Охарактеризуйте структуру й функції мікроворсинок.
28. Чим відрізняється будова центріолі та джгутика?

Рекомендована література

Загальна цитологія і гістологія : підручник / М. Е. Держинський, Н. В. Скрипник, Г. В. Островська та ін. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2010.

Фаллер Д. М. Молекулярная биология клетки / Д. М. Фаллер, Д. Шилдс. – Москва : Бином-Пресс, 2003.

Molecular Biology of the Cell / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis et al. – N. Y., 2013.

Molecular cell biology / H. Lodish, A. Berk, A. Kaiser et al. – N. Y., 2013.

Розділ 8

ПРИНЦИПИ СТРУКТУРНО- ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ ЕУКАРІОТИЧНОГО ЯДРА

ФУНКЦІЇ ЕУКАРІОТИЧНОГО ЯДРА

Оскільки ядро містить геном клітини, воно відповідає за більшість процесів, які визначають її життєдіяльність – керує білковим синтезом, клітинними фізіологічними і морфологічними процесами. У ядрі відбувається більшість етапів реалізації генетичної інформації еукаріотичної клітини – *реплікація ДНК, транскрипція генів та процесинг* ("дозрівання") усіх видів РНК, у тому числі формування рибосомних субодиниць. Лише кінцева стадія генної експресії – *трансляція* (біосинтез білка) – локалізується в цитоплазмі. Отже, ядро є не лише місцем збереження генетичного матеріалу, але й місцем, де цей матеріал функціонує і відновлюється.

Усі функції ядра можна поділити на дві основні групи.

I. *Збереження генетичної інформації в ряді поколінь клітин і організмів:*

- 1) репарація ДНК;
- 2) реплікація ДНК;
- 3) регуляція процесів точного розподілу молекул ДНК при поділі клітини.

II. *Реалізація генетичної інформації (у ряду ДНК→РНК→білок), створення апарату білкового синтезу:*

- 1) транскрипція генів – процеси синтезу усіх видів РНК;
- 2) процесинг (дозрівання, сортування) усіх видів РНК;
- 3) утворення субодиниць рибосом;
- 4) регуляція синтетичних процесів.

Можна виділити також третю групу функцій ядра – *забезпечення рекомбінації генетичного матеріалу* (при кросингові під час мейозу), що є основою комбінативної мінливості.

ЗАГАЛЬНОМОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ЯДРА

Ядра всіх клітин одного організму в нормі містять однакову кількість генетичного матеріалу і мають обов'язкові основні структурні компоненти (рис. 8.1):

- ядерна оболонка (*каріолема*);
- ядерний сік (*каріоплазма*);
- *хроматин* (*хромосоми*);
- *ядерце*.

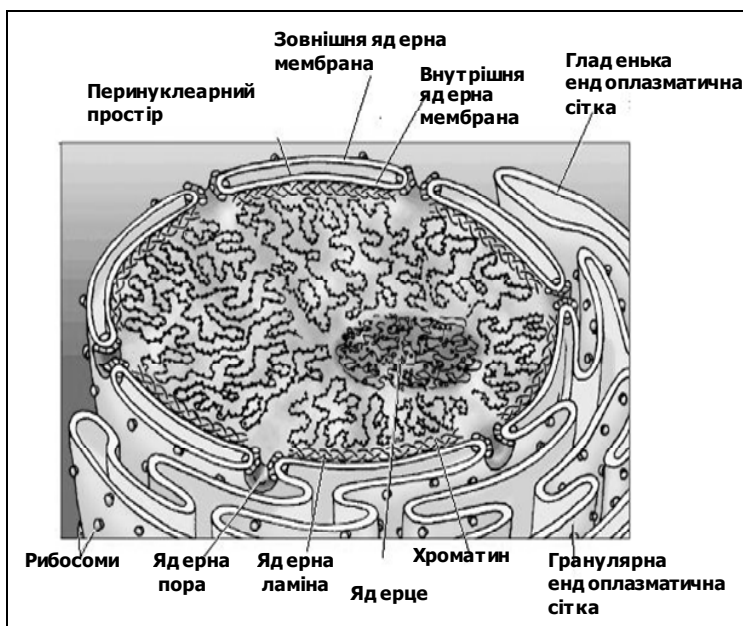


Рис. 8.1. Загальна схема будови ядра
(за Купером Дж., 2000 зі змінами)

Ядро відокремлене від цитоплазми ядерною оболонкою. Внутрішній його вміст, який називається *каріоплазмою*, або *каріолімфою*, включає більш або менш щільну сітку хроматину та ядерця. У світловому мікроскопі ядра виглядають як однорідні структури з ділянками більшої щільності, які і є гранулами хроматину або зоною ядерця. Після фіксації та забарвлення тканини кислий (через збагаченість нуклеїновими кислотами) хроматин проявляє свою базофільність (здатність забарвлюватися основними барвниками). У багатьох випадках ядра забарвлюються більш інтенсивно, ніж цитоплазма. Хроматин може виявлятися у вигляді тонких волокон світлішого (диспергованого) *еухроматину* або як грудки щільніше упакованого (конденсованого) *гетерохроматину*. Ці дві форми хроматину краще видимі в електронному мікроскопі. У деяких клітинах у організмів жіночої статі ссавців виявляються невеликі щільніші агрегати гетерохроматину, який прилягає до ядерної мембрани – це Х-хроматин, або тільце Барра, що містить одну інактивовану Х-хромосому (статеву). У сегментованих ядрах поліморфоядерних лейкоцитів тільця Барра утворюють випинання в бік цитоплазми, яке часто має форму "барабанної палички".

Під час поділу клітини (мітоз або мейоз) у ядрі відбуваються характерні каскади значних морфологічних змін, пов'язаних із процесом розподілу хромосом.

При цитологічному дослідженні препаратів опис морфології ядра має велике значення як у фундаментальних, так і в клінічних діагностичних дослідженнях. При цьому враховують форму й розмір ядра, його розташування та інтенсивність забарвлення; ядерно-цитоплазматичне співвідношення; характер будови хроматину; кількість, форму й розміри ядерць, чіткість їхніх меж; стан ядерної мембрани (чіткість її контурів, присутність "розривів", інвагінацій), наявність багатоядерних клітин, клітин у стані мітозу і, зокрема, з атиповими мітозами; можливу наявність ядерних включень.

У різних типах клітин спостерігаються значні відмінності в розмірі, формі та локалізації ядра, що пов'язано як з різним функціональним навантаженням ядра й самої клітини, так і з різною структурною організацією клітин загалом.

ФОРМА ЯДРА

Ядра більшості клітин або круглі, або овальні (рис. 8.2). Досить часто форма ядра адаптована до форми всієї клітини – у циліндричних чи веретеноподібних клітинах ядро також циліндричне або овальне з поздовжньою віссю, паралельною осі клітини (рис. 8.3,А). У клітинах пласкої форми воно може бути дископодібним (рис. 8.3,Б).

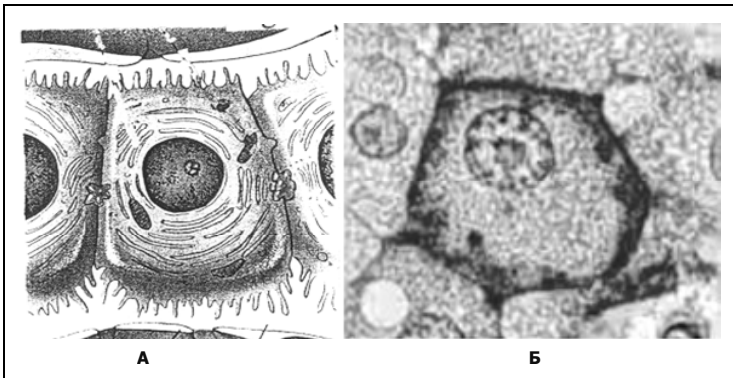


Рис. 8.2. Клітина печінки (гепатоцит) зі сферичним ядром:
А – схематичне зображення; Б – світлова мікрофотографія

Форма ядра може бути також неправильна, у тому числі лопатєва, витягнута, веретеноподібна, бобоподібна, ниркоподібна, підковоподібна, у вигляді перекрученого джгута, булавоподібна тощо.

У клітинах гладеньких м'язів форма ядра динамічна, у них виявляється пряме видовжене ядро в стадії спокою і скручене (штопороподібне) – під час скорочення. Деякі клітини, наприклад мегакаріюцити (попередники тромбоцитів), мають великі часточкові ядра. У ядрах інших клітин зустрічаються інвагінації (впинання) ядерної оболонки з боку цитоплазми, скажімо, у клітинах епіфіза (пінеалоцитах) або клітинах перехідного епітелію сечового міхура.

Незвичайні форми ядер виявлені у клітинах крові – лейкоцитах, особливо серед гранулоцитів. Їхні ядра мають неправильну часточкову структуру (сегментоване ядро), характерну для того чи іншого типу лейкоцита (рис. 8.4), яка, до того ж, змінюється у процесі формування клітин, тому такі клітини називають також поліморфноядерними лейкоцитами. Змінена форма ядра є важливою для функціонування клітин.

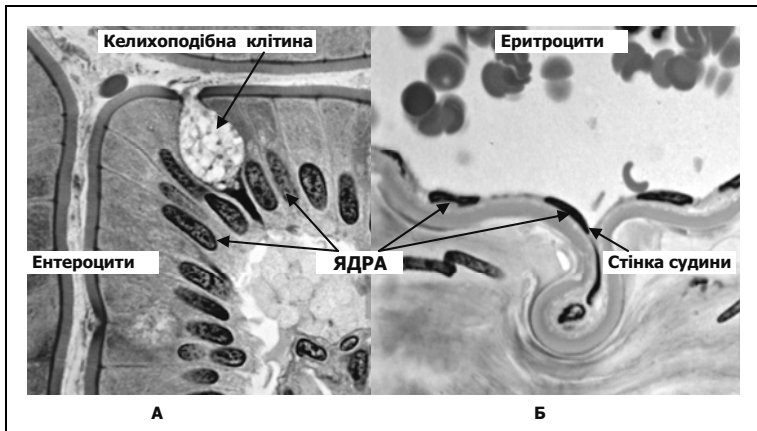


Рис. 8.3. Видовжена форма ядер в ентероцитах призматичного епітелію тонкого кишечника (А) та дископодібна (сплюснена) в ендотелії (плаский епітелій стінки судини; Б)
(за матеріалами фотобанку EdReschke Photography)

У деяких випадках форма ядра може змінюватися при старінні і при деяких захворюваннях. Зокрема, аномальні зміни форми ядра спостерігаються у клітинах багатьох пухлин і є одним із ключових діагностичних інструментів при виявленні ракових клітин.

У багатьох типах клітин (у нормі та при патології) зміна форми ядра відбувається через зміни в ядерній ламіні (структурі, що підтримує ядерну оболонку з боку нуклеоплазми). У деяких випадках, однак, форма ядра та її зміни залежать від сил, що діють з боку цитоплазми, зокрема – від цитоскелета. Щодо взаємовпливу форми і функцій ядра, існують дві осно-

вні гіпотези. Перша стверджує, що зміни в ядерній формі змінюють жорсткість ядра; це може бути корисно для клітин, які повинні протиснутися у важкодоступних місцях (клітини крові, клітини пухлин при метастазуванні), але шкідливим для клітин в умовах механічного тиску (наприклад, в епітеліальних тканинах). Друга гіпотеза припускає, що зміни ядерної форми відображаються на реорганізації хроматину і тим самим впливають на експресію генів. Важливо відзначити, що ці дві гіпотези не є взаємовиключними.

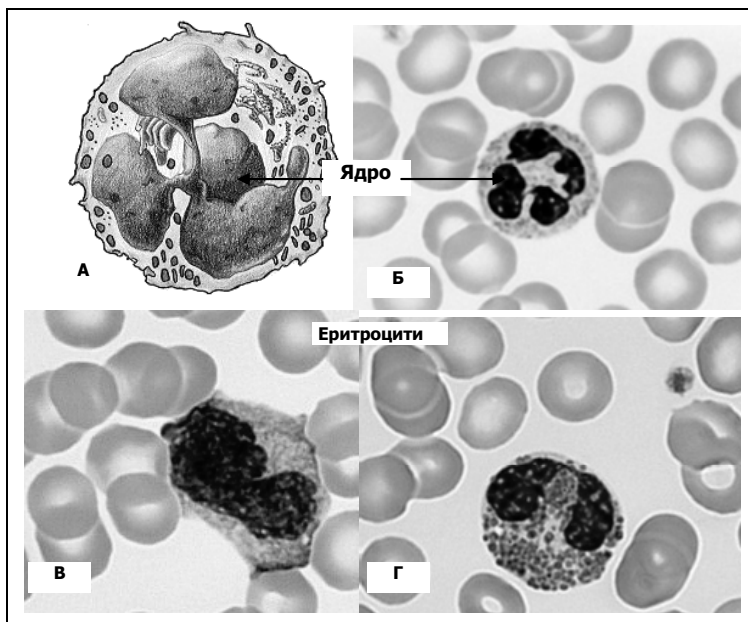


Рис. 8.4. Зрілий сегментоядерний нейтрофіл:
схематичне зображення (А),
світлова мікрофотографія (Б)
(ядро розділене на 2–5 часток,
з'єднаних тонкими ядерними філаментами.
В – моноцит (найбільший із лейкоцитів,
має нирко- або підковоподібне ядро, іноді – двочасточкове).
Г – еозинофіл з дволопатеvim ядром.
(за матеріалами фотобанку EdReschke Photography)

РОЗТАШУВАННЯ ЯДРА

У більшості клітин ядро займає центральну частину клітини, тоді як інші органели розташовані навколо нього випадковим чином. У деяких клітинах зі спеціалізованими функціями органели мають певну просторову організацію. У таких випадках ядро у них може бути зафіксоване в іншій частині клітини (ексцентрично) або на її периферії, прилягаючи до клітинної мембрани, як у випадку багатоядерної клітини скелетного м'яза (рис. 8.5, А).

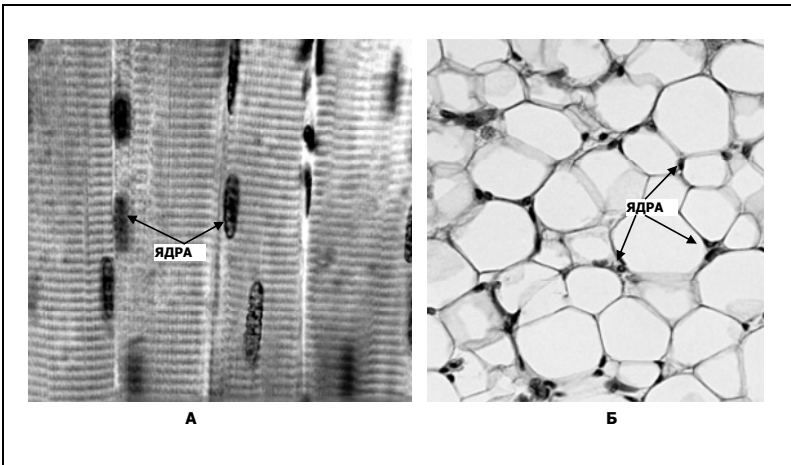


Рис. 8.5. Периферійне розташування ядер у спеціалізованих клітинах:

А – поздовжній зріз декількох м'язових волокон – багатоядерних клітин скелетної м'язової тканини;

Б – унілокулярні адипоцити – клітини білої жирової тканини

(за матеріалами – фотобанку?

EdReschke Photography)

В унілокулярних адипоцитах (клітинах білої жирової тканини) велика ліпідна крапля, яка займає більшу частину цитоплазми, також відсуває дископодібне ядро від центра клітини (рис. 8.5, Б).

КІЛЬКІСТЬ ЯДЕР

Більшість клітин містить лише одне ядро. Проте можуть зустрічатися і два ядра – у клітинах печінки (гепатоцитах), поверхневих клітинах перехідного епітелію (сечової системи) (рис. 8.6, А), парієтальних клітинах (шлунка), хондроцитах, клітинах серцевого м'язу. Клітини з багатьма ядрами часто походять від клітин, які зливаються під час розвитку, формуючи синцитій: синцитіотрофобласт (поверхневий епітелій плаценти), остеокласти (резорбтивні клітини кісткової тканини), хондрокласти (резорбтивні клітини хряща) і волокна скелетних м'язів (рис. 8.5, А). Перші три типи клітин містять близько 3–8 ядер, тоді як у волокнах скелетного м'язу їх нараховують від кількох сотень до декількох тисяч.

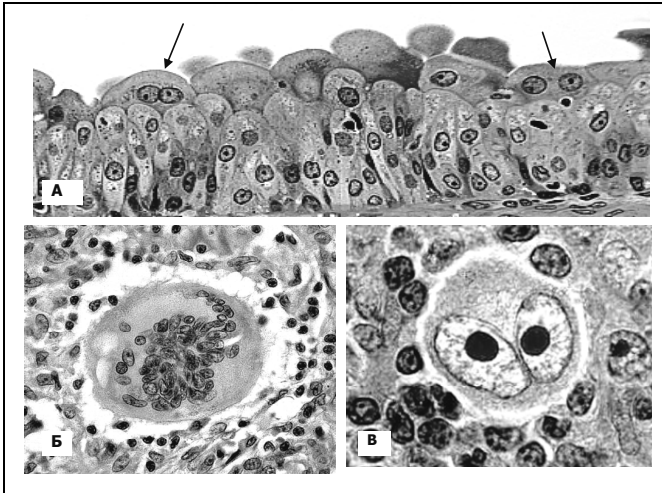


Рис. 8.6. Приклади багатоядерних клітин:

- А – двоядерні поверхневі клітини перехідного епітелію сечового міхура;
- Б – велетенська багатоядерна клітина чужорідних тіл у легенях;
- В – двоядерна клітина Рід – Штернберга,
- типова злюквісна клітина при лімфомі Ходжкіна

Багатоядерними часто є також різні форми активних макрофагів (так звані велетенські клітини чужорідних тіл, клітини Пирогова – Лангханса та інші (рис. 8.6, Б)), у яких, залежно від їхнього різновиду, багатоядерність може виникати як унаслідок злиття клітин, так і за рахунок поділу ядер (*каріокінезу*) без поділу цитоплазми (*цитокінезу*) за дії інфекційних або інших чужорідних агентів. Багатоядерні клітини можуть зустрічатись і в пухлинах (рис. 8.6, В), як результат порушення процесів клітинного поділу.

В інфузорій клітини мають ядра двох різних типів, з різними функціями – *макронуклеус* (поліплоїдне) і *мікронуклеус* (диплоїдне). Для деяких клітин вузької спеціалізації (еритроцити, тромбоцити) характерна *вторинна відсутність* ядра.

РОЗМІРИ ЯДЕР

Розміри ядер коливаються від 1 мкм (у деяких найпростіших) до 1 мм (у яйцеклітинах деяких риб і амфібій). Середній діаметр ядра – від 5 до 10 мкм. Його об'єм становить у середньому 5–10 % від усього клітинного об'єму, із значними коливаннями залежно від типу клітини. Він може змінюватись залежно від функціональної активності клітини й самого ядра. Співвідношення об'ємів ядра та клітини (*ядерно-цитоплазматичне співвідношення*) також залежить від функцій останньої. У дуже малих клітинах, наприклад лімфоцитах або клітинах мікроглії, співвідношення ядро / цитоплазма становить понад 50 %, у жирових клітинах (рис. 8.5, Б) при високому вмісті ліпідів воно може бути менше 1 %. Метаболічно неактивні клітини мають менше ядро, ніж активні. Об'єм ядра збільшується із збільшенням активності клітини, при цьому в ньому зростає ступінь деконденсації активного хроматину, який бере участь у процесі *транскрипції* – копіюванні генетичної інформації на матричну рибонуклеїнову кислоту (мРНК), яка надалі транспортується в цитоплазму для біосинтезу білка (*трансляції*).

Більшість клітин є *диплоїдними*, тобто мають у ядрі два хромосомні набори, кожний із яких отриманий від одного з батьків. Такий хромосомний набір позначається **2n**. Деякі клітини,

наприклад клітини печінки або клітини серцевого м'яза, можуть бути *поліплоїдними* й містити більше хромосомних наборів, що теж відбивається на розмірах ядра. Збільшення співвідношення ядро / цитоплазма може бути важливим для вирішення питання про належність клітини до злоякісного стану, за якого клітини набувають збільшеного хромосомного набору.

Розмір генома сам по собі не є визначальним фактором ядерного розміру. Той факт, що різні типи клітин одного й того ж організму можуть мати різні за розмірами і формою ядра, незважаючи на однакову кількість ДНК у них, а також експерименти з пересадки ядер між різними клітинами свідчать, що у визначенні розмірів ядра задіяні й деякі цитоплазматичні фактори, зокрема особливості функціонування ендоплазматичного ретикулу, який постачає білки для ядерної оболонки.

Незважаючи на те, що механізми контролю над розміром ядра залишаються неясними, існування досить стабільного цитоплазматичного співвідношення дозволяє припускати, що розмір ядра має важливе значення для функції клітин. Порушення цього співвідношення пов'язане з певними видами раку і має вирішальне значення для цілісності клітин. Крім того, припускається, що від розміру ядра залежить прогресування клітинного циклу, рівні транскрипції (процесу синтезу РНК), функціонування ядерних компартментів, наприклад, таких як ядерця або тільця Кахала (структур, залучених у біогенез малих ядерних рибонуклеопroteinів) і активність ферментів, таких як ДНК-полімерази, які чутливі до щільності високомолекулярного оточення.

ПОВЕРХНЕВИЙ АПАРАТ ЯДРА

ЯДЕРНА ОБОЛОНКА

Ядерна оболонка (каріолема) складається із двох ядерних мембран – зовнішньої та внутрішньої, розділених *перинуклеарним простором (люменом)* шириною 20–60 нм, який становить єдине ціле з порожнинами ендоплазматичної сітки (ЕПС). Зовнішня мембрана ядерної оболонки має низку

структурних особливостей, за якими її об'єднують з мембранами ЕПС – на ній міститься велика кількість рибосом, спостерігається її безпосередній перехід у систему каналів ЕПС. Зовнішня мембрана ядра може утворювати пухирцеподібні, трубчасті або складчасті вирости в бік цитоплазми. Внутрішня мембрана відрізняється від зовнішньої тим, що на ній немає рибосом і не спостерігається її злиття та перехід у мембрани ЕПС. Проте вона здатна утворювати вирости як у бік ядра, так і в перинуклеарний простір. Крім самостійних виростів зовнішньої або внутрішньої мембрани ядерної оболонки, у багатьох типах клітин спостерігається утворення інвагінацій, або випинань, оболонки ядра в цілому, у якому задіяні одночасно обидві мембрани.

За загальною будовою ядерні мембрани подібні до всіх інших клітинних мембран, тобто є білково-ліпідним бішаром, але мають характерну особливість, властиву тільки ядерній оболонці – складно організовані пори (*ядерно-поровий комплекс*), діаметром 60–100 нм, які об'єднують дві ядерні мембрани й забезпечують процеси транспорту між ядром і цитоплазмою.

ХІМІЧНИЙ СКЛАД ЯДЕРНИХ МЕМБРАН

Основними хімічними компонентами ядерних мембран є білки (50–75 %) і ліпіди (13–35 %). За ліпідним складом вони дуже наближені до мембран ЕПС, характеризуються відносно низькою кількістю холестеролу й високим вмістом фосфоліпідів, збагачених насиченими жирними кислотами. Внутрішня ядерна мембрана містить мало сфінгомієліну.

Білковий склад ядерних мембран різноманітний, багато в чому близький до мембран ЕПС, але містить багато специфічних білків і розрізняється в зовнішній і внутрішній мембранах. Їх можна розділити на декілька структурно-функціональних груп (рис. 8.7).

Перша група складається із ~30 різних поліпептидів, названих **нуклеопоринами**, або Nups, що формують ядерно-порові комплекси (ЯПК), через які здійснюється двонаправлений обмін білків, РНК і рибонуклеопroteїнових комплексів між нуклеоплазмою і цитоплазмою.

Друга група білків ядерної оболонки локалізується у внутрішній ядерній мембрані й представлена більш ніж 60 інтегральними мембранними білками, які ще мало охарактеризовані. Ці білки взаємодіють з **ядерною ламіною** (див. нижче) і **хроматином** (Ламін В рецептор (LBR), ламіно-асоційований поліпептид 1 (LAP1), LAP2, Emerin і MAN1) і відіграють життєво важливі й різноманітні ролі у функціях ядра, таких як організація хроматину, експресія генів і метаболізм ДНК. Важливо відзначити, що порушення локалізації та функції білків внутрішньої ядерної мембрани пов'язані з цілою низкою захворювань людини.

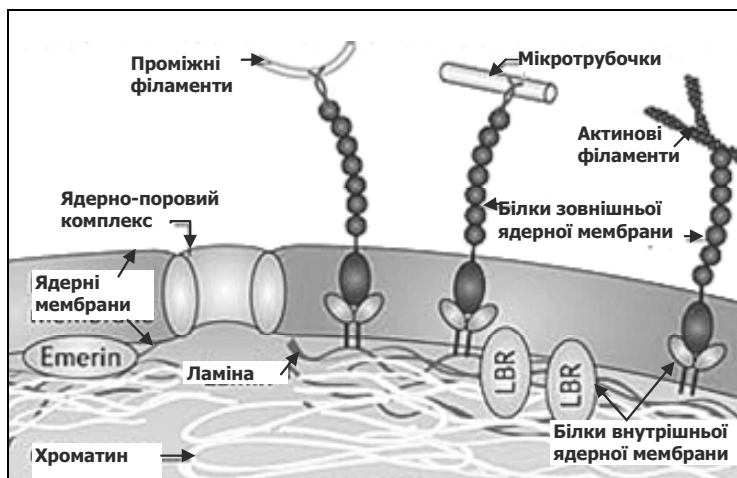


Рис. 8.7.Схема організації ядерної оболонки
(за Чоу К.-Х., Фактором Р. Е., Ульяновом К. С.,
2012 зі змінами)

Третя група специфічних білків локалізується в зовнішній ядерній мембрані. Це група різноманітних інтегральних мембранних білків, які взаємодіють з деякими білками внутрішньої ядерної мембрани і з прилеглим до ядра зовнішнім мікрооточенням, зокрема – з компонентами цитоскелета. Ці білки залучені в позиціонуванні ядра, що має важливе значення для таких процесів, як поляризація клітин, міграція пронуклеусів та організація синцитію. Крім того, вони утворюють "містки" через перинуклеарний простір, які утримують обидві ядерні мембрани на однаковій відстані (~ 50 нм), формують фізичні з'єднання між цитоскелетом і хроматином, мають відношення до механізмів транскрипції генів, реплікації й репарації ДНК.

Остання група білків ядерної оболонки складає *ламіну* – сітчасту структуру із проміжних філаментів (*ламівів А-і В-типу*), яка має вирішальне значення для забезпечення стабільності ядра. *Ламіни* також відіграють важливу роль у функціонуванні хроматину та експресії генів. Подібно до білків внутрішньої ядерної мембрани, мутації в ламінах пов'язані з великою кількістю різноманітних захворювань людини і процесами старіння, що підкреслює вирішальну роль білкового складу ядерної оболонки для нормального функціонування клітини.

Загалом ядерна оболонка виконує важливу роль у захисті геному й відокремленні його від цитоплазматичних компонентів, а також є вузькоспеціалізованими мембранами, які забезпечують анкерні (прикріплювальні) ділянки для хроматину й цитоскелета.

ЯДЕРНА ЛАМІНА

Ядерна ламіна – волокнисто-сітчаста структура (рис. 8.8, А), яка прилягає до всієї внутрішньої поверхні ядерної оболонки (за винятком ділянок пор) і забезпечує структурну підтримку

ядра. Ядерна ламіна складається зі споріднених білків – *ламів*. Більшість клітин ссавців містить 2 типи білків-ламів (А і В) які є продуктами альтернативного сплайсингу двох генів – відповідно *LMNA* (ламів А і С та мінорні білки AΔ10 та C2) та *LMNB* (ламів В1 та В2).

Усі ламів – фібрилярні білки з кінцевими глобулярними доменами (60–80 кДа), які належать до системи проміжних філаментів цитоскелета. Як і інші білки проміжних філаментів, вони взаємодіють один з одним, формуючи спочатку спірально-скручені димери, які надалі поєднуються у фібрили й формують сіткоподібні структури (рис. 8.8, А). Із внутрішньою ядерною мембраною ламів пов'язана через специфічні інтегральні білки мембрани. З іншого боку, білки ядерної ламів пов'язані також із білками хроматину, що забезпечує його прикріплення до ядерної мембрани.

Під час мітозу відбувається фосфорилування кінців ламів, унаслідок чого змінюється їхній заряд і вони відштовхуються один від одного, сітчаста структура ядерної ламів руйнується і ядерна оболонка, втрачаючи структурну цілісність, розпадається на окремі вакуолі (рис. 8.8, В). Наприкінці мітозу (під час телофази) відбувається зворотний процес – дефосфорилування ламів, що сприяє їхньому збиранню й відновленню ядерної оболонки та ядра в цілому.

Мутації в гені *LMNA*, що кодує ламів типу А, спричиняють більше 10 різних клінічних синдромів із загальною назвою *ламінопатії*, або *ядерні енвелопатії* (від англ. *envelope* – оболонка). Ці захворювання в першу чергу впливають на скелетні й серцевий м'язи, жирову тканину, нерви периферичної нервової системи, а також ведуть до передчасного старіння. Мутації в генах, що кодують ламів В-типу та ламиноасоційовані інтегральні мембранні білки (емерин, LBR, MAN1 і неспрін) також пов'язані із захворюваннями, в основі яких лежить висока нестабільність ядра і клітин (особливо – порушення скоротливих функцій), обумовлена порушеннями у структурі ламів.

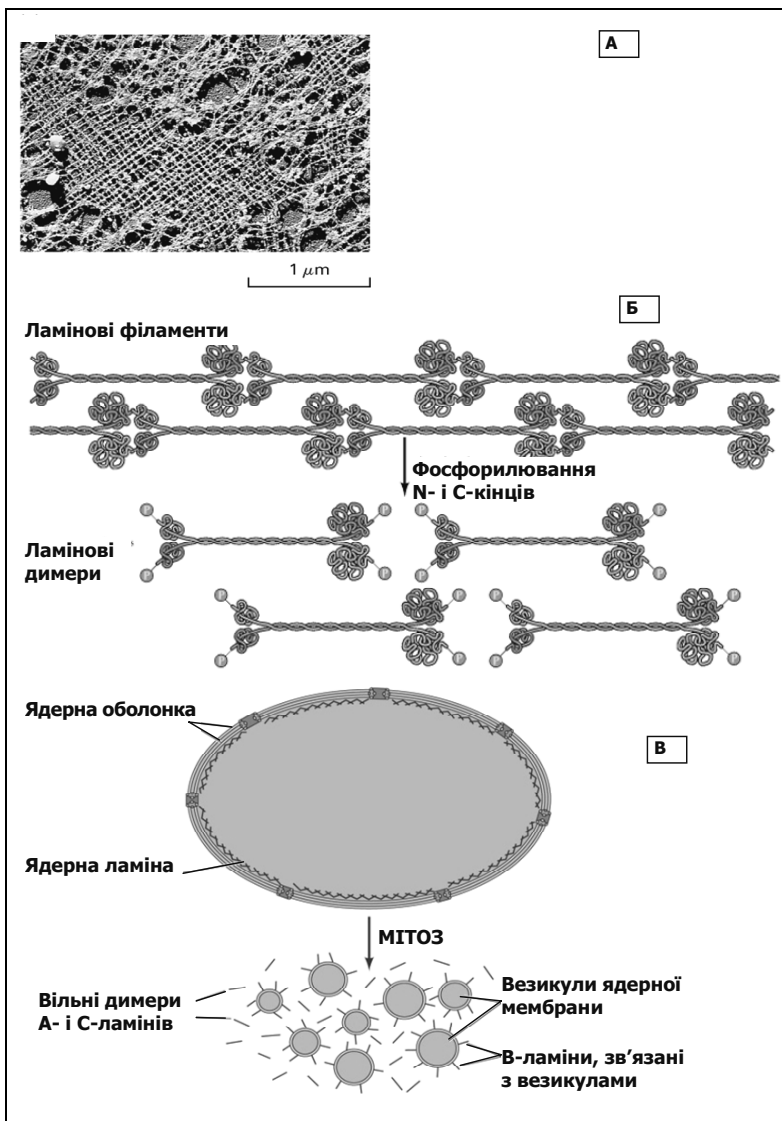


Рис. 8.8. Структурно-функціональна організація ядерної ламіни:
 А – електронна мікроскопія; Б – схема поєднання ламінів у філаменти та їхньої дисоціації при фосфорилуванні; В – схема розпаду ядерної оболонки під час мітозу, обумовленого фосфорилуванням ламінів

ЯДЕРНО-ПОРОВИЙ КОМПЛЕКС

Ядерно-поровий комплекс (ЯПК) – білково-каналні структури в складі ядерної оболонки, які забезпечують взаємозв'язок і транспорт молекул між цитоплазмою і нуклеоплазмою. Ядерно-порові комплекси мають складну структуру, організовані за участю спеціальних білків із загальною назвою *нуклеопорини*, також мають у своєму складі транспортні білки.

Ядерно-поровий комплекс має дуже великі розміри – близько 125 000 кДа (у хребетних), що приблизно в 30 разів більше за рибосому. Він складається із множинних копій 50–100 різних білків. Кількість пор на 1 ядро становить близько 190 у дріжджів, 3 000–5 000 тис. у клітинах людини, що діляться, і 5×10^7 у зрілих овоцитах *Xenopus*. Для ядерної пори характерна симетрія восьмого порядку (октагональна) – кількість більшості білків у її складі кратна восьми.

Ядерно-порові комплекси добре помітні на електронних мікрофотографіях ядерної оболонки великих ядер овоцитів амфібій (рис. 8.9).

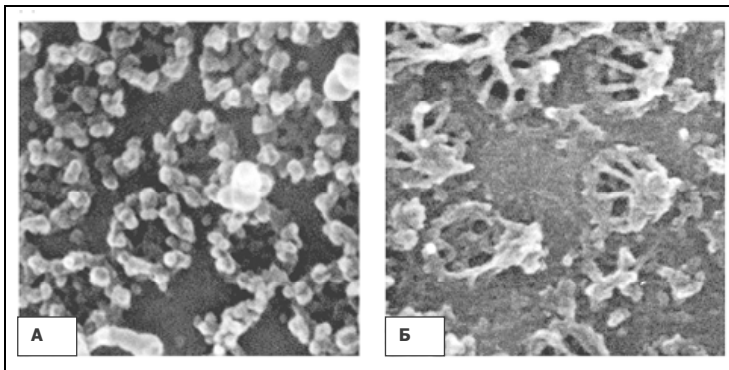


Рис. 8.9. Ядерно-порові комплекси ядерної оболонки овоцитів *Xenopus* у сканувальному електронному мікроскопі:
А – вигляд з боку цитоплазми, Б – вигляд з боку нуклеоплазми,
(за Лодішем І., Берком А., Кайзером К. та ін., 2008)

На базі таких фотографій створено модель ЯПК (рис. 8.10). І на цитоплазматичній, і на ядерній поверхні пори виступають білкові кільця – цитоплазматичне та ядерне. Цитоплазматичне кільце несе 8 вільних філаментів. Ядерне кільце підтримує 8 філаментів довжиною близько 100 нм, дистальні кінці яких з'єднані **термінальним кільцем**, формуючи структуру, яку називають **ядерним кошиком**. Ядерне кільце також безпосередньо приєднане до ядерної ламіни. У простір каналу пори обертнені 8 симетричних білкових утворів, що нагадують спиці колеса. У центрі комплексу – вхід у канал пори. Часто в центрі каналу помітна електроннощільна гранула, яка вважається функціональним (транспортуючим) компонентом самої пори.

За даними електронної мікроскопії ядерна пора є досить лабільною структурою, яка у відповідь на різні стимули може змінювати свій радіус і, можливо, провідність.

Через ядерно-поровий комплекс відбувається обмін речовинами між ядром і цитоплазмою. Нуклеоцитоплазматичний транспорт можна поділити на пасивний і активний. **Пасивний транспорт** відбувається за рахунок дифузії речовин через пори. Дифундувати через заповнені водою канали в ЯПК можуть іони, малі метаболіти і глобулярні білки розміром близько 60 кДа. **Активний транспорт** великих субстратів – це специфічний процес, який потребує енергетичних витрат.

Через ЯПК активно транспортуються великі білки та рибонуклеопротеїнові комплекси діаметром близько 25 нм, які не можуть проходити за рахунок дифузії. Усі рибонуклеїнові кислоти, що синтезуються в ядрі, а надалі функціонують у процесах білкового синтезу, повинні експортуватися в цитозоль. І навпаки, усі білки, залучені до молекулярних процесів у ядрі, мають бути імпортовані до нього із цитоплазми, де вони синтезуються на рибосомах. ЯПК діє як селективний канал, через який ці макромолекули вибірково транспортуються в ядро і з нього.

В активному транспорті макромолекул через ЯПК беруть участь спеціальні білки-**транспортини**. Їх поділяють на **експортини** (транспорт "ядро → цитоплазма") та **імпортини** ("цитоплазма → ядро").

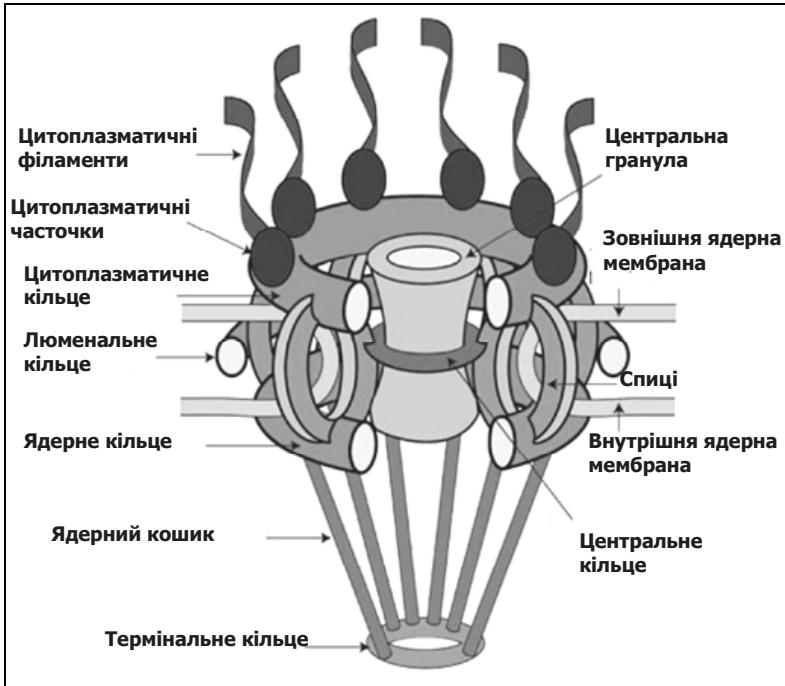


Рис. 8.10. Схема будови ядерно-порового комплексу

Загалом нуклеоцитоплазматичний транспорт можна уявити наступним чином. Спочатку в донорному компартменті (звідки субстрат транспортується) відбувається формування комплексу вантаж – транспортини. Потім комплекс тимчасово закріплюється на білках ядерної пори, розпізнається і транслокується через неї в акцепторний компартмент (у який спрямований транспорт). Просуванню вантажного комплексу крізь пору сприяють її цитоплазматичні та ядерні філаменти. Далі комплекс дисоціює, а вантаж вивільнюється. Транспортини, які брали участь в утворенні комплексу, повертаються в донорний компартмент. Білки-транспортини, що переносять різні види РНК і рибонуклеопротеїнів із ядра в цитоплазму, мають у своєму складі спеціальні короткі амінокислотні по-

слідовності – *сигнали ядерного експорту*, завдяки яким вантаж "пропускається" через пору. Білки ж, які транспортуються із цитоплазми в ядро, несуть подібні послідовності іншого складу (*сигнали ядерної локалізації*) безпосередньо у своїй молекулі. Серед транспортинів є як суто специфічні для перенесення певних молекул, так і такі, що можуть транспортувати декілька різних субстратів.

У більшості випадків джерелом енергії для активного нуклеоцитоплазматичного транспорту є гідроліз ГТФ. Його забезпечує спеціальний білок із ГТФазною активністю, який також входить до складу транспортного комплексу (Ran-білок).

МОЛЕКУЛЯРНА ОРГАНІЗАЦІЯ СПАДКОВОГО АПАРАТУ

Здатність клітин підтримувати високу впорядкованість організації залежить від генетичної інформації, котра реалізується, зберігається і відтворюється в ДНК, синтезі РНК і білків.

ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕЇНОВА КИСЛОТА

Генетична інформація, яка має бути стабільною і стійкою до впливу зовнішніх факторів, зберігається в ядрі в молекулах дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК). Усі молекули ДНК (як про-, так і еукаріотичних клітин) побудовані з чотирьох типів нуклеотидів, кожний із яких складається з азотистої основи, цукру – дезоксирибози та залишку фосфорної кислоти. У ДНК є чотири типи азотистих основ: **аденін** (А) і **гуанін** (Г) (пуринові) та **цитозин** (Ц) і **тимін** (Т) (піримідинові). Нуклеотиди зв'язані в довгі *полінуклеотидні ланцюги* (рис. 8.11, Б) ковалентними фосфодієфірними зв'язками, які з'єднують п'ятий атом вуглецю (позначається 5') однієї дезоксирибози з третім (3') вуглецевим атомом наступної дезоксирибози (рис. 8.11, В).

Первинна структура молекули ДНК (послідовність нуклеотидів) специфічна для кожної природної ДНК і є кодовою формою запису біологічної інформації – *генетичного коду*.

Молекула ДНК міститься в клітині переважно у вигляді спіралі з двох ланцюгів, закручених навколо однієї загальної осі й мають *антипаралельну* (протилежну) орієнтацію. Антипаралельна орієнтація, або полярність молекули ДНК, є важливим поняттям у біохімії ДНК. На рис. 8.11, В проілюстровано полярність двох ланцюгів ДНК у спіралі, де напрямки $5' \rightarrow 3'$ протилежно спрямовані. Така орієнтація ланцюгів є важливою при розумінні багатьох функцій і процесів у клітині, у яких беруть участь ДНК і РНК. У подвійній спіралі ДНК пуринові та піримідинові основи обернені одна до одної. При цьому аденін (А) одного ланцюга завжди зв'язується *водневими зв'язками* з тиміном (Т) другого, а гуанін (Г) – завжди з цитозином (Ц) (рис. 8.11, А). Утворення таких постійних пар у подвійній спіралі має назву *комплементарності*. Отже, спіраль ДНК утворюється послідовністю пар основ А-Т і Г-Ц уздовж полінуклеотидних ланцюгів. Різноманітні варіації в послідовності нуклеотидів уздовж ланцюга визначають функції кожної ділянки молекули ДНК та їхню роль у передачі інформації на молекули РНК, а через останні – і на молекули білків.

Макромолекулярну структуру ДНК встановлено Дж. Уотсоном та Ф. Криком у 1953 р. За цією моделлю (рис. 8.11, Б) дезоксирибофосфатний остов молекули ДНК розташований зовні молекули, а азотисті основи (площина яких перпендикулярна осі спіралі) – усередині. Два ланцюги ДНК обертаються один навколо одного й утримуються за рахунок водневих зв'язків між азотистими основами. У спрощеному вигляді модель нагадує скручену навколо своєї осі мотузкову драбину, "щаблі" якої утворені парами основ А-Т і Г-Ц (рис. 8.11, Б). На кожний оберт спіралі припадає 10 пар основ, що становить 3,4 нм. Отже, відстань між двома парами основ – 0,34 нм. Ці величини є постійними для ДНК усіх організмів.

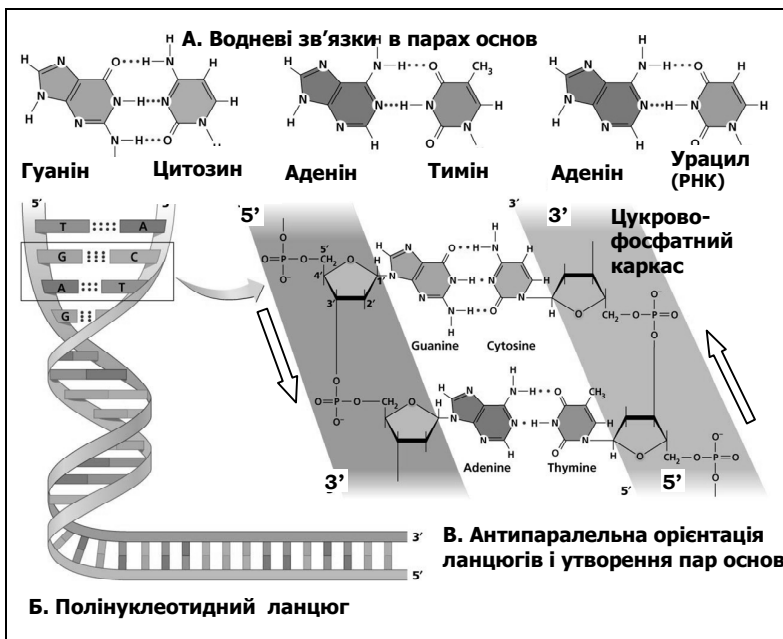


Рис. 8.11. Схема будови ДНК

У клітинах молекули ДНК можуть існувати в різних формах. Скажімо, бактеріальні клітини, мітохондрії та хлоропласти мають дволанцюгові кільцеві молекули ДНК, а деякі віруси ссавців – лінійні одностанцюгові молекули ДНК. Клітини еукаріотичних організмів мають лінійні дволанцюгові ДНК різної довжини, які зв'язані з білками, утворюючи структури, що називаються *хромосомами*.

Загальна кількість ДНК у кожній клітині містить уся генетичну інформацію організму й позначається як *геном*. Існують геноми ядерний, мітохондріальний і геном пластид. У даному розділі розглянемо лише ядерний геном.

У ядрах статевих клітин (гамет) міститься повний одинарний набір хромосом, який називають *гаплоїдним* і позначають *n*.

Соматичні клітини містять подвоєний – *диплоїдний* ($2n$) геном, у якому кожна хромосома представлена парою.

У різних видів організмів розмір геному неоднаковий (табл. 8.1). Геном людини містить близько $3,3 \times 10^9$ пар основ (п. о.) на гаплоїдне ядро, що в 1000 разів більше, ніж у бактеріальній клітині. Проте прямої кореляції між кількістю ДНК і еволюційним рівнем організму немає.

Послідовність нуклеотидів у молекулі ДНК визначає послідовність амінокислот кожного з білків в організмі людини. Будь-яка зміна в цій послідовності, навіть заміна однієї пари основ із загальної кількості ($3,3 \times 10^9$ п. о.), може привести до зміни у структурі білка та до втрати або зміни його функції.

Екзонно-інтронна організація генів

Таблиця 8.1

Розмір геному різних організмів

Об'єкт	Розмір гаплоїдного геному, пар нуклеотидів
Мікоплазми	$10^4 - 10^6$
Еубактерії (E. coli)	$10^5 - 10^7$
Гриби	$(2 - 5) \times 10^7$
Водорості	$(5 - 7) \times 10^7$
Черви	$\sim 10^8$
Молюски	$5 \times 10^8 - 5 \times 10^9$
Комахи	$10^8 - 5 \times 10^9$
Ракоподібні	$\sim 10^9$
Голкошкірі	$2 \times 10^8 - 2 \times 10^9$
Риби	$3 \times 10^8 - 10^{10}$
Амфібії	$7 \times 10^8 - 7 \times 10^{10}$
Рептилії	$(2 - 3) \times 10^9$
Птахи	10^9
Ссавці	3×10^9
Квіткові рослини	$2 \times 10^8 - 10^{11}$

В еукаріотів не встановлено чіткої *оперонної* організації генів. Гени, які визначають синтез ферментів одного ланцюга біохімічних реакцій, можуть бути розсіяні в геномі й, очевидно, не мають, як у прокаріотів, єдиної регулюючої системи. Нуклеотидні послідовності у складі самих структурних генів поділяють на два типи – *інтрони* та *екзони*. Інтрони (від англ. *intron (interveningsequence)* – проміжна послідовність) є ділянками молекули ДНК (гена) еукаріотів, які не несуть генетичної інформації. Припускають, що інтрони мають регуляторне значення, хоча точна їхня функція невідома. Екзони (англ. *ex-[pressi]-on – вираженість*) – ділянки генів еукаріотів, які несуть повну генетичну інформацію, що кодує синтез білка. У кожному гені фрагменти з екзонів та інтронів чергуються.

РИБОНУКЛЕЇНОВІ КИСЛОТИ

Молекули рибонуклеїнових кислот (РНК) *транскрибуються* (копіюються, синтезуються) безпосередньо з молекул ДНК і присутні в ядрі, цитоплазмі й мітохондріях. Основна функція молекул РНК – участь у процесах перенесення інформації від ДНК до білка. Молекули РНК, як і ДНК, складаються з нуклеотидів, зв'язаних 3'-5'-фосфодієфірними зв'язками, але зустрічаються в основному у вигляді одониткових полінуклеотидних ланцюгів і зазвичай коротші, ніж більшість молекул ДНК. Молекули РНК, як і ДНК, побудовані з основ А, Г, Ц, але замість тиміну (Т) містять урацил (У). Ще однією із значних відмінностей є присутність цукру рибози в РНК замість дезоксирибози в ДНК. Як і ланцюги спіралі ДНК, одноланцюгові молекули РНК мають 5'- і 3'-кінці у своєму цукрово-фосфатному каркасі, а молекулярні процеси за участю молекул РНК, також відбуваються в певному молекулярному напрямку.

Внутрішньомолекулярні водневі зв'язки надають молекулі РНК вторинної та третинної структури, що робить її молекулу компактнішою і стабільнішою. Крім того, наявність вторинної структури забезпечує молекулі РНК здатність ефективніше виконувати її біологічні функції порівняно з лінійною формою. У деяких випадках молекули РНК здатні складатися у дволанцюгові фрагменти завдяки наявності окремих ділянок з протилежною послідовністю основ (вони мають назву *паліндрому*). Завдяки цьому одностанцюгова молекула РНК, складаючись удвічі, утворює дволанцюговий фрагмент. Такі ділянки мають назву "шпилька". За будовою вони нагадують одностанцюгову петлю, яка "сидить" на двостанцюговій "ніжці". Такі структури, наприклад, завжди присутні в молекулах тРНК.

У клітинах людини є декілька основних класів молекул РНК і значна кількість різних форм РНК з регуляторними властивостями:

- матрична, або інформаційна (мРНК, іРНК);
- транспортна РНК (тРНК);
- рибосомальна РНК (рРНК);
- гетерогенна ядерна РНК (гяРНК);
- мала ядерна РНК (мяРНК);
- мала ядерцева РНК;
- мікро-РНК;
- Хіст-РНК;
- малі інтерферуючі РНК.

Кожний із типів молекул РНК відіграє специфічну роль у процесах *транскрипції* (перенесення інформації від ДНК до РНК), *трансляції* (перенесення інформації від РНК до білка) або виконує регуляторну роль у процесах реалізації генетичної інформації в клітині.

Матрична (інформаційна) РНК (мРНК)

Матрична, або інформаційна, РНК становить 2–5 % від усієї РНК у клітині. Її молекули короткоживучі (від декіль-

кох хвилин до декількох діб), вони є основними переносниками інформації ("месенджерами") від ДНК до білоксинтезуючої системи й характеризуються великою різноманітністю (залежно від того, які білки кодують). Це інформаційні матриці, що визначають амінокислотні послідовності в молекулах поліпептидів, котрі синтезуються на рибосомах.

Транспортна РНК (тРНК)

Транспортна РНК – невеликі полінуклеотидні ланцюги довжиною 74–95 рибонуклеотидів, вона становить 10–20 % клітинної РНК. Її головна роль – перенесення амінокислот до рибосом при синтезі білка. Для кожної із 20 амінокислот, які входять до складу білків, існують свої специфічні тРНК, котрі "впізнають" цю амінокислоту (для кожної амінокислоти існує декілька видів "своєї" тРНК, залежно від кількості відповідних кодонів цієї амінокислоти). Первинна структура тРНК, що визначається послідовністю нуклеотидів, формує вторинну структуру тРНК у вигляді листка конюшини, у якому окремі ділянки полінуклеотидного ланцюга укладені у вигляді петель і "шпильок" (рис. 8.12). Така структура, у свою чергу, зумовлює тривимірну третинну структуру, необхідну для виконання функцій цього виду РНК під час синтезу білка. Для неї характерне утворення двох перпендикулярно розташованих подвійних ланцюгів. Один із них утворений *акцепторною зоною*, другий – *антикодоною*. До акцепторної зони приєднується амінокислота, а на антикодоновій розміщений *антикодон* (триплет нуклеотидів, комплементарний кодону мРНК). Ці ділянки максимально віддалені одна від одної. Стабільність третинної структури тРНК підтримується завдяки виникненню додаткових водневих зв'язків між основами полінуклеотидного ланцюга, які локалізуються в різних її ділянках, але просторово наближені у третинній структурі.

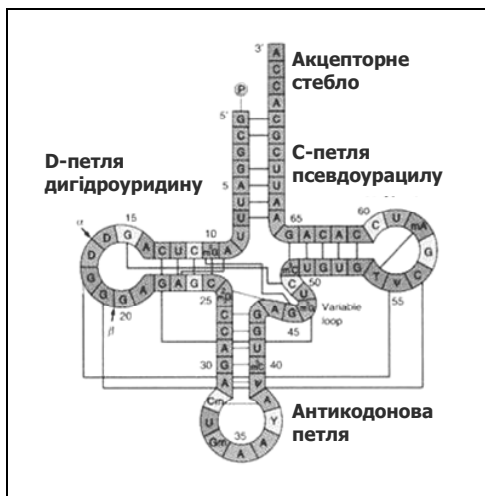


Рис. 8.12. Типова структура тРНК (вторинна структура). Схема

Рибосомальна РНК (рРНК)

Рибосомальна РНК – найзначніший за кількістю клас РНК, становить близько 80 % від загального вмісту РНК у клітині. Міститься в рибосомах у зв'язаному з білками стані. Молекули рРНК різноманітні за розмірами, які відрізняються у про- та еукаріотів.

Гетерогенна ядерна РНК (гяРНК) є безпосереднім продуктом транскрипції, вона комплементарна одному з ланцюгів ДНК того чи іншого гена, включає екзони та інтрони і є попередником мРНК.

Мала ядерна РНК асоційована зі специфічними білками й бере участь у перетворенні гяРНК на мРНК до її виходу із ядра в цитоплазму.

Мала ядерцева РНК функціонує в ядерці, відіграє певну роль у формуванні субодиниць рибосом.

Xist-РНК бере участь в інактивації однієї з *X*-хромосом у особин жіночої статі у ссавців.

Мікро-РНК – малі (у середньому 22 нуклеотиди) некодуючі молекули, регулюють кількість білка, продукованого клітиною в певний момент часу. Відомо декілька механізмів реалізації мікро-РНК своїх регуляторних функцій. Зокрема, вони комплементарно з'єднуються з ділянками мРНК і пригнічують біосинтез білка на них. Крім того, комплекси мікро-РНК з мРНК сприяють швидкому руйнуванню останньої.

Малі інтерферуючі РНК – короткі (20–25 нуклеотидів) дволанцюгові РНК, які також виконують регуляторні функції: знижують експресію специфічних генів, зв'язуючись з мРНК, захищають клітину від чужорідного генетичного матеріалу (наприклад, вірусних генів), діють за механізмами, подібними дії мікро-РНК.

РЕПЛІКАЦІЯ ДНК

Клітина передає генетичний матеріал своїм нащадкам, реплікуючи (подвоюючи) весь свій геном перед поділом (під час S-періоду інтерфази). Цей процес має здійснитися протягом 7–8 год без помилок, без втрати частини геному або надлишкових копіювань окремих його фрагментів. Під час реплікації два ланцюги спіралі розділяються, кожна нитка слугує матрицею для синтезу нового, дочірнього ланцюга, тобто у двох нових молекулах ДНК одна нитка стара (материнська), друга – нова (дочірня). Такий тип реплікації називають *напів-консервативним* (рис. 8.13).

Завдяки здатності азотистих основ нуклеотидів утворювати за допомогою водневих зв'язків комплементарні пари, нуклеотидна послідовність молекул ДНК є однаковою у двох дочірніх клітинах та ідентичною вихідній материнській молекулі.

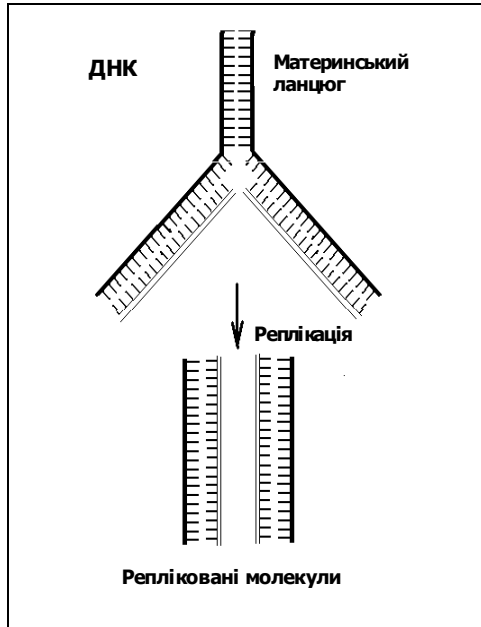


Рис. 8.13. Схема напівконсервативного типу реплікації ДНК

Процес реплікації ДНК у хромосомах може починатися одночасно в багатьох місцях (до декількох тисяч). Такі місця називають **точкою (сайтом) початку реплікації** (або *ori* – від англ. *origin*, походження). Завдяки великій кількості таких сайтів весь процес реплікації проходить швидко. У точці *ori* починається розплетення подвійної спіралі й формується **реплікативне вічко**. Два його роздвоєні кінці називають **реплікативними вилками**. При подальшому розплетенні вічка і приєднанні всіх необхідних для реплікації компонентів утворюється **реплікон**– функціональна структура, яка є одиницею реплікації (рис. 8.14). У його утворенні беруть участь ферменти (геліказа, топоізомераза) і дестабілізуючі білки.

Фермент **геліказа** розплітає ланцюги спіралі ДНК. **Топоізомераза** (або *гіраза* у бактерій) – фермент, що робить "над-

різи" на одному з ланцюгів попереду реплікативної вилки, щоб у спіралі перед нею не виникало надмірного скручування. *Дестабілізуючі білки* (або *SSB-білки* – від single strande binding) утримують одониткові ланцюги в розплетеному стані.

Синтез нового ланцюга ДНК (з'єднання вільних нуклеотидів фосфодієфірними зв'язками) здійснює фермент *ДНК-полімераза*. Узагалі, в еукаріотичних клітинах відомо не менше 15 типів ДНК-полімерази (α , β , γ , σ , ϵ і т. д.), кожна із яких виконує специфічні функції, але всі вони мають такі особливості:

- можуть нарощувати лише вже існуючий фрагмент ланцюга, спарений з матричним ланцюгом, а не починати його заново з будь-якого місця (*de novo*);
- можуть приєднувати нові нуклеотиди тільки до 3'-кінця, що "росте", тобто новий ланцюг завжди "росте" в напрямку 5'→3'.

Напрямок росту одного з нових ланцюгів збігається з напрямком розкручування реплікативної вилки, реплікація на ньому проходить безперервно й тому він називається *лідуючим*, або провідним. Для другого – *відстаючого* (у зв'язку з явищем антипаралельності ланцюгів) – цей напрямок протилежний. Для забезпечення всіх умов функціонування ДНК-полімерази на матричному відстаючому ланцюзі спочатку формується короткий (приблизно 10 нуклеотидів) ланцюжок – *затравка*, або *праймер*, із рибонуклеотидів за допомогою *РНК-полімерази*, або *праймази*. Від 3'-кінця праймера ДНК-полімераза вже може будувати далі ланцюг із ДНК-нуклеотидів у напрямку 5'→3'. Пізніше праймери видаляються ферментом *РНК-нуклеазою*. Отже, у цьому випадку синтез відбувається короткими фрагментами (приблизно 200 нуклеотидів) і кожного разу наступний праймер утворюється нижче по ходу розплетення спіралі. Такі окремі фрагменти ДНК-ланцюга називаються *фрагментами Оказаки*.

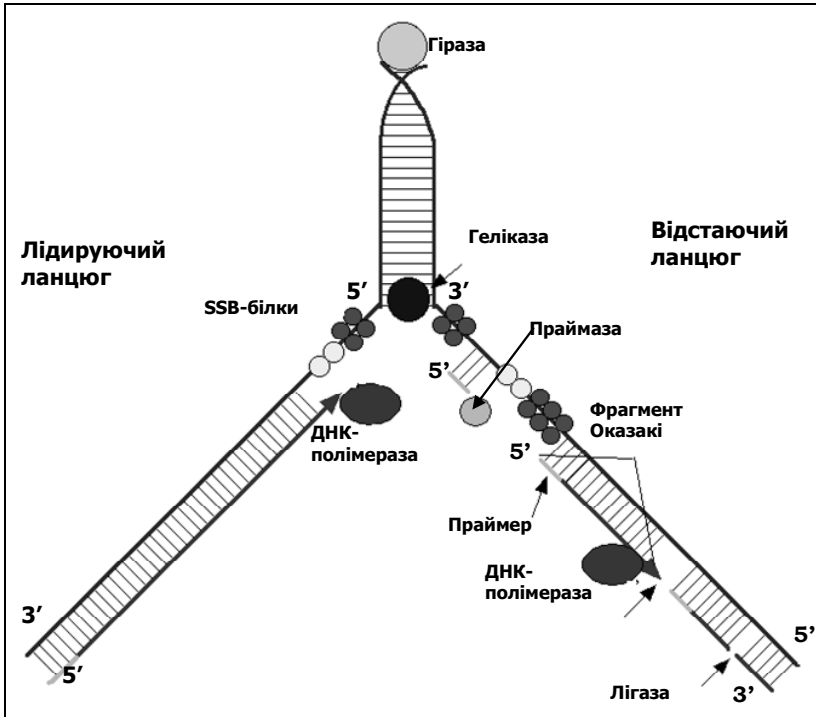


Рис. 8.14. Схема реплікації ДНК у ядрі (реплікон на одній із реплікативних вилок)

РЕПАРАЦІЯ ДНК

Для підтримання сталості генетичного матеріалу потрібний не лише надзвичайно точний механізм реплікації, але й механізм виправлення помилок, які все ж таки можуть виникати при реплікації (приблизно 1 помилка на кожен 1–10 млрд пар основ), або під дією різноманітних (мутагенних) факторів. Сукупність таких механізмів належить до системи **репарації ДНК**. Якщо вони не спрацюють, зміни в ДНК (мутації) закріплюються і передаються наступним поколінням клітин.

У ядрах еукаріотичних клітин міститься декілька систем репарації ДНК, здатних визначати і виправляти різні типи змін ДНК. Системи репарації поділяють на:

- *прямі* – специфічні ферменти безпосередньо виправляють певні типи пошкоджень ДНК. Прямими механізмами можуть виправлятися такі ушкодження, як тимінові димери, що виникають за дії ультрафіолетового опромінення, втрата пуринових або піримідинових основ у нуклеотидах (АП-сайти), приєднання алкільних груп до основ (наприклад, метилювання ДНК), одноланцюгові розриви ДНК;
- *непрямі*, у яких задіяна складна система ферментів і факторів. Ці механізми виправляють великі або складні ушкодження, але за умови збереження одного із ланцюгів – відновлюючи ушкоджену ділянку, вони так чи інакше використовують принцип комплементарності. Універсальним прикладом такого механізму є *ексцизійна* репарація (*excision* – вирізання), схему якої наведено на рис. 8.15. У цьому випадку видаляється пошкоджений фрагмент на одному з ланцюгів разом із неушкодженими сусідніми ділянками, після чого на цьому місці синтезується новий фрагмент (за принципом комплементарності на основі неушкодженого ланцюга).

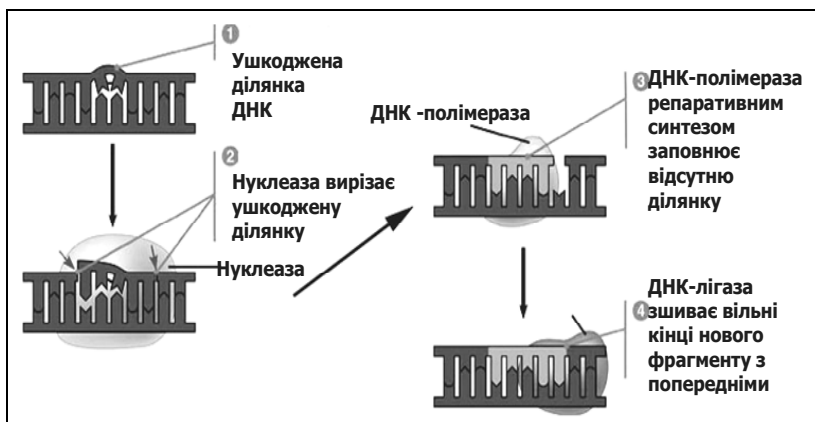


Рис. 8.15. Схема процесу ексцизійної репарації ДНК у ядрі

ТРАНСКРИПЦІЯ РНК

Біологічна інформація, яка зберігається в ДНК, має бути експресована (реалізована) у клітині. У кожній клітині потік генетичної інформації відбувається в напрямку ДНК → РНК → білок. Поняття про сукупність цих процесів визначають як *центральну догму молекулярної біології*.

Указаний потік інформації є односпрямованим і необоротним.

Інформація, що міститься в ДНК визначає кінцевий продукт (білок), який буде синтезований. Ця інформація "записана" за допомогою генетичного коду.

Перші етапи експресії генів здійснюються в ядрі шляхом *транскрипції* інформації ДНК у різні форми РНК за участю ферменту РНК-полімерази. РНК-полімераза, зчитуючи інформацію з ДНК-матриці, каталізує формування фосфодієфірних зв'язків між рибонуклеотидами, що приєднуються до ланцюга РНК, який росте.

На відміну від прокариотів, у яких синтез усіх видів РНК здійснюється одним і тим самим ферментом, в еукаріотів є три ядерні РНК-полімерази (I, II, III), а також мітохондріальні та хлоропластні РНК-полімерази. РНК-полімераза I локалізується в ядерці й транскрибує гени, які кодують більшість рРНК; РНК-полімераза II функціонує в нуклеоплазмі у вигляді великого мультібілкового комплексу і транскрибує матричні РНК (мРНК), а також синтезує деякі малі ядерні РНК (snRNAs); РНК-полімераза III транскрибує гени, котрі кодують усі тРНК і один із видів рРНК (5S-РНК) і деякі snRNAs. Кожна РНК-полімераза є складною молекулою з великою молекулярною вагою.

Субстратами для РНК-полімераз слугують рибонуклеозидтрифосфати (активовані нуклеотиди). Весь процес транскрипції здійснюється за рахунок енергії макроергічних зв'язків таких нуклеотидів.

Для транскрипції властива низка принципів (рис. 8.16):

- (1) – комплементарність;
- (2) – антипаралельність;
- (3) – уніполярність;
- (4) – відсутність потреби у праймері (затравці);

(5) – асиметричність, тобто РНК синтезується комплементарно й антипаралельно ланцюгу ДНК, який транскрибується.

Ріст ланцюга РНК відбувається тільки в напрямку 5'→3'. Для початку синтезу РНК фермент не потребує полі- або олігонуклеотидної затравки. Першим у РНК завжди є пуриновий нуклеотид у формі трифосфату.

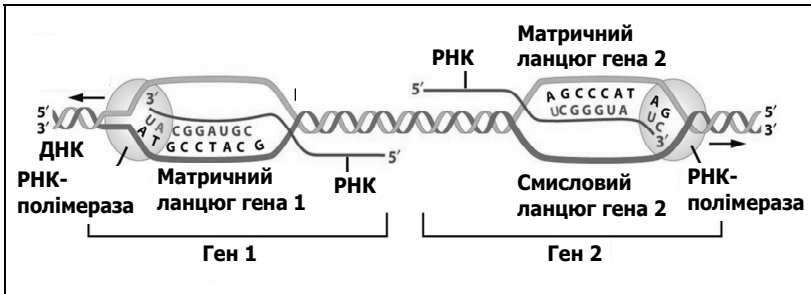


Рис. 8.16. Схема процесу транскрипції

Важливу роль в *ініціації транскрипції* відіграють специфічні нуклеотидні послідовності на ДНК, зокрема, *ТАТА-послідовність* та *ініціатор*, котрі містяться на 5'-кінці гена і входять до складу його *промотора*. Функція промотора – визначення локалізації та напрямку транскрипції на ДНК-матриці. Приєднання РНК-полімерази до промотора опосередковується великою кількістю білків – *транскрипційних факторів* (TF). Останні можуть зв'язуватися з промотором або один з одним, спрямовуючи РНК-полімеразу на транскрипцію певного гена. Різні клітини в організмі містять ідентичні послідовності ДНК, проте вони можуть експресувати різні гени в різний час у відповідь на різні сигнали, що й визначає функціонально-морфологічні відмінності різних клітин. Саме контролювання варіовальної експресії генів і є функцією взаємодії різноманітних TF у різних клітинах.

В ініціації транскрипції всіх генів є деякі основні етапи, один з яких – прикріплення до ТАТА-послідовності у промо-

торі білка, відомого як *TATA-зв'язувальний білок* (англ. – *TBP*). Одразу після цього інші фактори транскрипції приєднуються до *TBP* або безпосередньо до ДНК, формуючи складний ДНК-білковий комплекс, який "притягує" РНК-полімерази до промотора. Для початку та продовження транскрипції (*елонгації* – нарощення ланцюга РНК) два ланцюги ДНК мають бути розплетені ДНК-геліказою, активність якої також пов'язана з деякими ТФ. Копіюється тільки один із двох ланцюгів ДНК ("матричний", у напрямку 3'→5') (рис. 8.16). Який саме із двох ланцюгів виступатиме матричним для того чи іншого гена, визначається наявністю додаткових послідовностей у промоторі, таких як *ініціатор*.

Рух РНК-полімерази по матричному ланцюгу ДНК триває до досягнення специфічних *сайтів термінації* (припинення), після чого комплекс РНК-полімерази з новосинтезованою РНК від'єднується від матриці й розпадається.

ПРОЦЕСИНГ РНК

Первинний транскрипт РНК (копія з певного гена на ДНК) не є остаточною біологічною формою РНК. Усі види РНК повинні пройти процесинг (ряд додаткових перетворень) у ядрі, перш ніж вони набудуть такої форми, у якій будуть здатні транспортуватися в цитоплазму й функціонувати в біосинтезі білка.

Найбільший процесинг у ядрі відбувається з молекулами мРНК (рис. 8.17). мРНК синтезується як великий первинний транскрипт, відомий як *гетероядерна РНК* (гяРНК). Після утворення первинного транскрипту з ним здійснюються три процеси, що забезпечують остаточне дозрівання транскрипту. Першим етапом процесингу гяРНК є *кепінг* (англ. *capping*, приєднання "шапочки") – приєднання до 5'-кінця РНК особливого нуклеозиду – 7-метилгуанозину, яке робить молекулу РНК стійкішою до руйнівної дії ферментів екзонуклеаз і підвищує її стабільність.

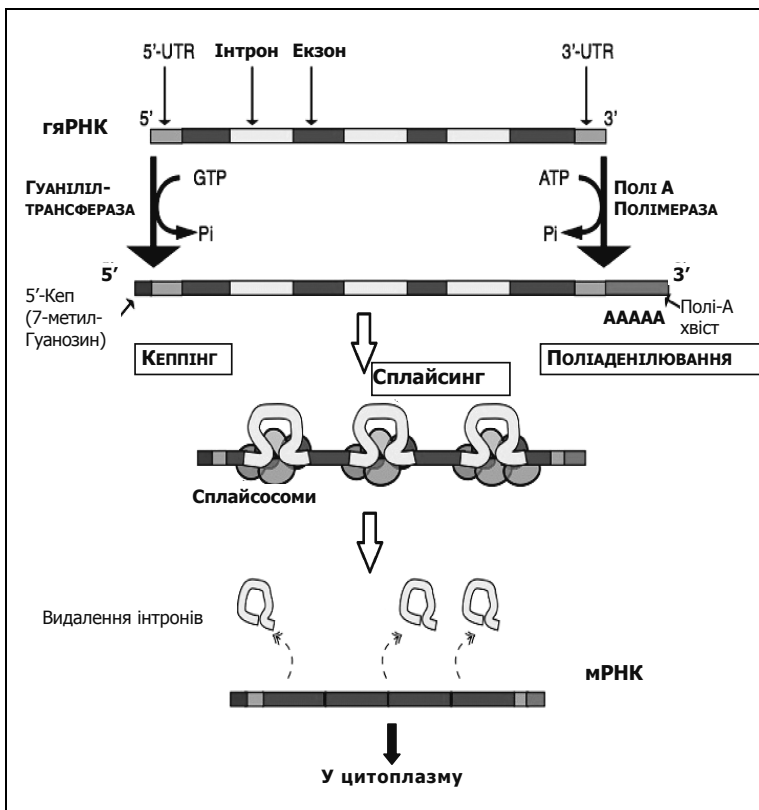


Рис. 8.17. Схема процесингу мРНК у ядрі еукаріотів

У самій молекулі транскрипту відбувається важливий процес видалення інтронів і з'єднання екзонів, що залишилися (*сплайсинг*). Реакції сплайсингу каталізуються у *сплайсосомах* – комплексах гетерогенної ядерної РНК з малими ядерними РНК (мяРНК) і низкою білкових факторів сплайсингу. Функцією сплайсосом є впізнавання специфічних нуклеотидних послідовностей на межах екзонів та інтронів і видалення останніх із формуванням тілець у вигляді ласо. По завершенні сплайсингу його продукти дисоціюють зі сплайсосоми.

Сплайсосоми утворюються лише в еукаріотичних ядрах, оскільки у прокаріотів інтрони в мРНК відсутні.

Завершення процесингу мРНК відбувається на її 3'-кінці, поблизу якого розташована сигнальна послідовність нуклеотидів ААУААА (*сигнал поліаденілювання*). Після низки молекулярних перетворень 3'-кінця фермент полі-А-полімераза приєднує сюди ланцюг із залишків аденозину (близько 200 залишків, так званий полі-А-хвіст), який, взаємодіючи з особливими білками, також сприяє стабільності мРНК і, крім того, полегшує її транспорт через ядерно-поровий комплекс.

Іноді зустрічається сплайсинг, який відбувається без участі сплайсосом (*самосплайсинг*). У цьому разі каталізатором процесу вирізання інтронів і зшивання екзонів виступає послідовність нуклеотидів РНК, яка входить до складу інтронної ділянки (*рибозим – РНК з каталітичними властивостями*). Самосплайсинг відбувається у пре-рРНК найпростіших (наприклад, у тетрагімени), деяких пре-мРНК мітохондрій нижчих грибів та декотрих інших пре-РНК, у яких інтрони містять консервативні послідовності, що зумовлює утворення певної вторинної та третинної структури.

Розподіл ділянок РНК-транскрипту на екзони та інтрони не завжди однаковий у різних клітинах організму. Межі інтронів і екзонів у різних клітинах можуть виявитись неоднаковими. Ділянка, котра в одній клітині вирізається як інтрон, в іншій може залишитися у складі зрілої мРНК як типовий екзон. Це явище назвали *альтернативним сплайсингом*.

У результаті альтернативного сплайсингу стає можливим утворення на основі однієї молекули РНК кількох білкових молекул. Так, один і той самий первинний транскрипт у клітині щитоподібної залози дасть початок гормону кальцитоніну, а в нервовій тканині приведе до утворення зовсім іншого пептидного гормону (*CGRP – calcitonin-gene-related peptide*). Проте в більшості випадків у результаті альтернативного сплайсингу утворюються мРНК, які кодують білки, схожі за будовою та функціями, а саме *ізоформи*. Так утворюються різні варіанти білків фібронектинів, тропоміозинів тощо. Після

ля завершення процесингу зріла мРНК набуває здатності транспортуватися із ядра в цитоплазму.

Процесинг рРНК і тРНК відрізняється за своїми етапами від дозрівання мРНК і є значно простішим. Процесинг рРНК включає її метилювання та видалення деяких фрагментів первинного транскрипту РНКазами. Частини, що залишились, є вже зрілими рРНК, які включаються до складу рибосомних субодиниць. Попередник тРНК піддається модифікаціям кінців та окремих нуклеотидів, вирізання єдиного інтрона.

ХРОМАТИН І ХРОМОСОМИ

У ядрі кожної соматичної клітини людини міститься 46 молекул ДНК, загальною кількістю $6,6 \times 10^9$ пар основ (п. о.), що становить близько 2 м. Проте вся вона впаковується в ядрі клітини й під час метафази ступінь її компактизації досягає 10^4 разів. Забезпечення правильності компактною упаковки молекул ДНК є необхідною умовою перебігу процесів транскрипції, репарації та реплікації ДНК і рівномірного розподілу подвоєного набору ДНК між дочірніми клітинами під час мітозу. За допомогою спеціальних механізмів молекули ДНК компактизуються в ядрі, утворюючи **хромосоми**, хімічною основою яких є **хроматин** – комплекс ДНК (30–45 %) з **гістонами** (30–50 %, особливий клас білків основної природи) і негістоновими білками (4–33 %).

Хроматин добре виявляється як зони щільної речовини при спостереженні живих клітин або клітин після фіксації та забарвлення різними барвниками, особливо основними. Завдяки цій здатності він і отримав назву "хроматин" – від грец. *chroma* – колір, фарба. Здатність хроматину сприймати основні барвники вказує на його кислотні властивості, які визначаються вмістом ДНК у ньому. Такими самими хімічними властивостями та здатністю до забарвлення характеризуються й хромосоми, що формуються як щільні, видимі у

світловому мікроскопі тільця із хроматину при його конденсації під час поділу клітини.

ДНК на всіх стадіях клітинного циклу перебуває в комплексі з гістонами – особливим класом висококонсервативних білків невеликого розміру, збагачених позитивно зарядженими амінокислотними залишками аргініну й лізину, завдяки чому вони мають яскраво виражені основні властивості. Позитивно заряджені гістони утворюють сильні іонні зв'язки з від'ємно зарядженою ДНК, формуючи **нуклеосоми** (рис. 8.18, А, Б). Кожна нуклеосома має **серцевину (кор)** із восьми гістонових білків (типу H2A, H2B, H3 і H4 – по дві молекули кожного), навколо якої обкручуються приблизно два витки спіралі ДНК (146 п. о.).

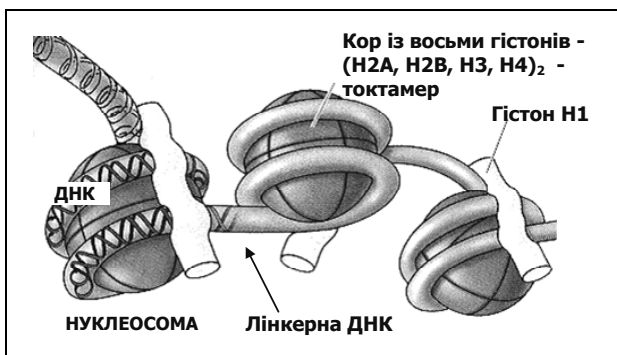
Між кожними двома нуклеосомами залишається вільна ("**лінкерна**") ДНК, довжиною 50–60 п. о. Під електронним мікроскопом нуклеосомна нитка має вигляд намиста.

П'ятий гістон, H1, приєднаний до ДНК у лінкерній ділянці й бере участь у формуванні вищих рівнів компактизації структури хроматину. Ланцюги нуклеосом можуть бути скручені у **фібрилу діаметром від 20 до 30 нм** з утворенням соленоїдної структури, у якій на один оберт припадає шість нуклеосом. Ця структура стабілізована взаємодіями між різними молекулами H1. Така фібрила може спостерігатися як у складі петель метафазних хромосом, так і в інтерфазному ядрі, та, імовірно, є природною конформацією транскрипційно неактивного на даний час хроматину. Порівняно з вільною ДНК, її упаковка в нуклеосомних ланцюгах у 5–7 разів компактніша, а у 20–30-нанометровому соленоїді – у 40 разів.

Додаткова компактизація (рис. 8.18, А) досягається шляхом укладання такої спіралі у вигляді петель, які утримуються негістоновими білками. При цьому **петльові домени**, які містять 5000–10000 п. о., прикріплюються до білкових **скелетних структур (скефолд-білки)** своїми специфічними послідовностями (**SAR** або **MAR** – *scaffold-associated regions* або *matrix-associated regions*).



А



Б

Рис. 8.18. Рівні упаковки молекули ДНК у складі хромосом (А), будова нуклеосоми (Б)
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Левісом Дж. та ін., 2002)

Хроматин такого рівня компактизації вважається низькоконденсованим, його називають **еухроматином** (від грец. *eu* – добре, повністю). Переважна його частина може бути транскрипційно активною. Більш конденсований (за рахунок додаткового скручування петельних структур) хроматин – **гетерохроматин** (від грец. *hetero* – інший) – транскрипційно неактивний. Під час поділу клітини (мітозу) практично весь хроматин (включаючи еухроматинові ділянки) переходить у стан гетерохроматину. Із нього формуються **хроматиди** хромосом (дві ідентичні частини хромосоми, що утворилися після її реплікації), добре видимі під світловим мікроскопом (рис. 8.18, А).

Хоча основна маса білків хроматину припадає на гістони, у ньому також є й інші білки – негістонові. Серед них, крім структурних білків, – фактори транскрипції, білки, які регулюють реплікацію, ферменти репарації тощо.

Отже, хромосоми клітин можуть перебувати у двох структурно-функціональних станах: активному (робочому), частково або повністю деконденсованому, коли за їхньою участю в інтерфазному ядрі відбуваються процеси транскрипції та редуплікації, і в неактивному – у стані метаболічного спокою при максимальній їхній конденсації, коли вони виконують функцію розподілу й перенесення генетичного матеріалу в дочірні клітини.

В інтерфазному ядрі індивідуальні хромосоми візуально не розрізняються. Різні їхні ділянки, залежно від функціональної активності, перебувають у стані еухроматину (на електронно-мікроскопічних фотографіях – світлий, диспергований) або гетерохроматину (темні, щільно упаковані ділянки) (рис. 8.19). Більша частина гетерохроматину прилягає до ядерної оболонки (пристінковий хроматин), за винятком ділянок ядерних пор.

Хромосоми приєднуються до мембрани ядерної оболонки через білки ядерного матриксу, зокрема, ядерної ламіни, і інтегральні білки внутрішньої ядерної облонки (рис. 8.7). Фібрили хроматину можуть переходити з одного стану в інший залежно від функціональної активності ядра. Гетерохроматин підрозділяють на два типи: **конститутивний**, тобто постійно конденсований і **факультативний** – хроматин, стан конденсації якого може змінюватись.

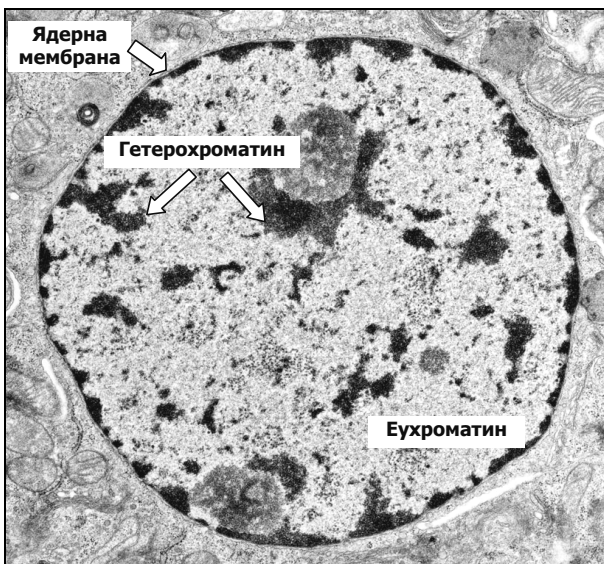


Рис. 8.19. Електронно-мікроскопічна фотографія інтерфазного ядра. Характерне розташування гетеро- та еухроматину

МОРФОЛОГІЯ МІТОТИЧНИХ ХРОМОСОМ

У хромосомах найвищого ступеня конденсації (під час поділу) виділяють ряд важливих структурних елементів (рис. 8.20).

Кожна мітотична хромосома складається із двох ідентичних частин – сестринських *хроматид*, які утворилися після реплікації ДНК інтерфазної хромосоми.

Центромери, або первинні перетяжки, – це ділянки, у яких з'єднані дві сестринські хроматиди. Ділянки ДНК, котрі розташовуються в зонах центромер, мають специфічні високоповторювані послідовності.

Залежно від розміщення центромери, хромосоми можуть мати плечі однакової чи різної довжини і класифікуватися як *метацентричні*, *субметацентричні* та *ахроцентричні* (рис. 8.20). Центромера є структурою, важливою для правиль-

ного розподілу хроматид під час мітозу між дочірніми клітинами. Під час мітозу на ній формується спеціальна білково-фібрилярна структура – *кінетохор*, до якого прикріплюються нитки веретена поділу.

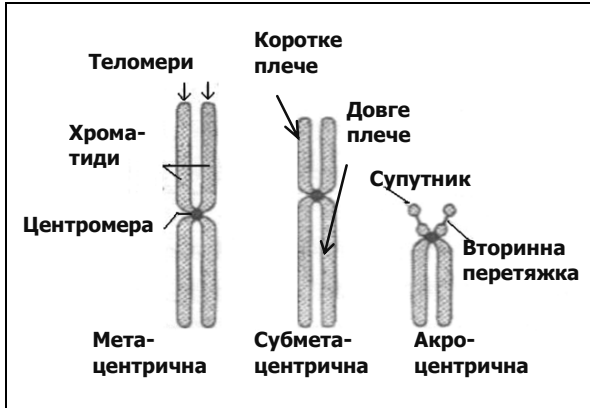


Рис. 8.20. Важливі структурні елементи мітотичних хромосом

Деякі хромосоми можуть мати ще й *вторинну перетяжку* (у цій ділянці розташована ДНК, яка відповідає за синтез рРНК і формування ядерця, тому її ще називають *ядерцевим організатором*). Ділянки хромосом, відокремлені вторинними перетяжками, називають *супутниками*.

Теломери локалізовані на обох кінцях кожної хроматиди всіх хромосом, складаються із множинних повторів особливих консервативних послідовностей ДНК і виконують низку дуже важливих функцій у клітині:

- підтримують стабільність хромосом, запобігають їхньому злипанню;
- захищають кінці хромосоми від руйнування нуклеазами;
- відіграють важливу роль у забезпеченні правильної реплікації кінців хромосом;
- забезпечують контроль нормального клітинного росту.

Наявність теломер на кінцях хромосом – сигнал того, що хромосома неушкоджена. Якщо в клітині з'являється пошкоджена хромосома або її фрагмент, то такі структури позбавлені теломер хоча б на одному з кінців. Системи контролю за пошкодженням ДНК (вони є в усіх нормальних клітинах) упізнають такі кінці й зупиняють процеси клітинного циклу, щоб дати можливість системам репарації усунути пошкодження. Якщо ж це з якоїсь причини неможливо, у клітині може бути запущений механізм запрограмованої загибелі (*апоптоз*).

Через молекулярні особливості процесу реплікації ДНК при кожній наступній реплікації в нормальній соматичній клітині теломери втрачають 50–100 п. о. Такому вкороченню може запобігати фермент *теломераза*, присутній в активному стані тільки в зародкових і стовбурових клітинах. В інших соматичних клітинах, які ростуть і діляться, теломерази неактивні, їхні теломери поступово вкорочуються. Це може розглядатися як своєрідний мітотичний годинник, котрий сигналізує про необхідність запуску у старіючих клітинах механізму апоптозу до того, як у їхніх ДНК із часом накопичаться й передадуться дочірнім клітинам невивправлені пошкодження.

Деякі ракові клітини здатні уникати такого контролю й стають "безсмертними". Їхні теломери залишаються стабільними за довжиною – це викликає нескінченний клітинний поділ і відсутність контролю з боку систем репарації. Припускається, що причиною цього є активація ферментів теломераз у ракових клітинах.

Структуру інтерфазного хроматину на рівні петель дуже добре видно в гігантських клітинах деяких комах. Часто в них після кількох циклів реплікації гомологічні хромосоми не відокремлюються одна від одної, а формують єдині гігантські комплекси – *політенні хромосоми*, які добре видно у світловому мікроскопі (рис. 8.21).

Політенні хромосоми добре вивчені у клітинах слинних залоз личинок дрозофіли, у яких ДНК у кожній із чотирьох хромосом реплікована в 10 циклах без розходження дочірніх

хромосом, унаслідок чого в них виявляються вирівняні в один ряд 1024 (2^{10}) ідентичні нитки хроматину з нерівномірною спіралізацією (рис. 8.22, А).

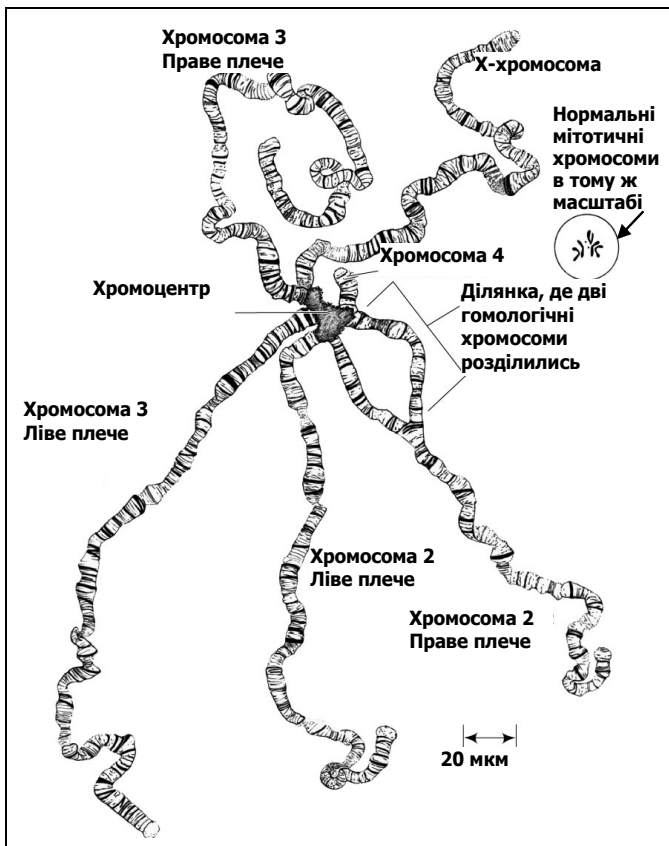


Рис. 8.21. Повний набір політенних хромосом однієї клітини хромосоми слинних залоз дрозофіли (світлова мікроскопія). Дрозофіла має чотири пари хромосом, однак кожна з них тісно спарена зі своїм гомологом, тому кожна пара виглядає як єдина структура
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Левісом Дж., та ін., 2002)

У них розрізняються темніші ділянки (*диски*), де міститься багато конденсованої ДНК, і світлі *міждискові ділянки*, де ДНК більш витягнута (рис. 8.22, А, Б). Для кожного виду організмів розташування й ширина дисків строго специфічні, але частково можуть змінюватись при активації / інактивації хроматину під час процесів розвитку. При активації транскрипції генів ДНК дисків ще більше розгортається у вигляді петель. Тоді на політенних хромосомах, які вперше описав італійський учений Бальбіані, утворюються пухкі структури – *пуфи*, або *кільця Бальбіані*, названі на його честь. Політенні хромосоми широко використовуються для вивчення процесів, що відбуваються у хроматині. Їх застосовують для побудови карт хромосом (розташування генів по довжині хромосоми), вивчення особливостей регуляції генів, виявлення хромосомних перебудов, визначення видової належності особин різних популяцій тощо.

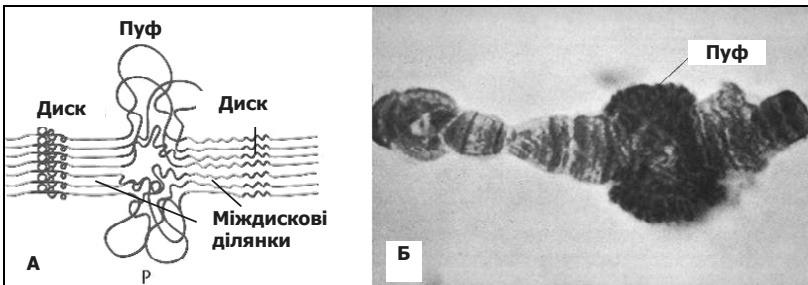


Рис. 8.22. Фрагмент політенної хромосоми і з клітини слинної залози дрозофіли з характерною картиною розподілу дисків: А – схема; Б – світлова мікроскопія

Організація хромосом може бути також легко візуалізована й у таких структурах, як *хромосоми типу лампових щіток* – це особлива форма, якої набувають хромосоми в багатьох тварин у ході овогенезу (розвитку жіночих статевих клітин) і значно меншою мірою – у сперматогенезі. Свою назву вони отримали завдяки великим розмірам і зовнішній подібності до щіток для чищення скла газових ламп (рис. 8.23, 8.24). Ця подібність зумовлена високим ступенем деспіралізації хроматину в таких

хромосомах і наявністю вздовж хромосомної осі численних хроматинових петель, на яких відбувається інтенсивна транскрипція багатьох послідовностей ДНК під час мейозу.

На початку мейозу кожна хромосома реплікується, потім їхні гомологічні подвоєні пари з'єднуються (кон'югують). У результаті утворюється структура, яка містить чотири репліковані молекули ДНК, або хроматиди.

Стадія хромосом типу лампових щіток в овогенезі триває протягом місяців або років, у цей період овоцит синтезує та накопичує поживні речовини, необхідні для його остаточного розвитку в новий організм.

Хромосоми типу лампових щіток добре видимі навіть у світловому мікроскопі, де виглядають як низка великих петель хроматину, що відходять від лінійної хромосомної осі. На таких петлях можна навіть побачити працюючі структурні гени, на яких синтезується мРНК. Певна петля завжди містить одну й ту саму послідовність ДНК і має однаковий розмір і розташування, поки овоцит росте. Однак більшість ДНК міститься не в петлях, а залишається висококонденсованою у складі **хромомерів** на осі, які взагалі не експресуються (рис. 8.24).

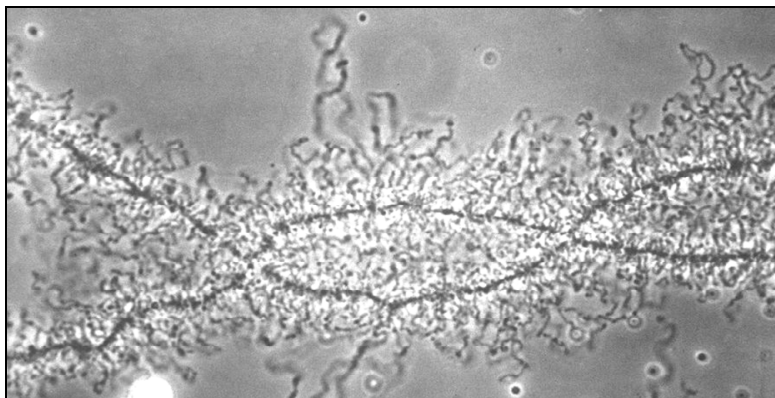


Рис. 8.23. Хромосоми типу лампових щіток з овоциту амфібії (світлова мікрофотографія)

Характер розташування й розмір петель хромосом типу лампових щіток є видоспецифічними. Найбільші вони в амфібій, тоді як у деяких видів організмів узагалі не виявляються, наприклад у риб. Проте при введенні в овоцити амфібій ДНК від організмів, які зазвичай не продукують хромосоми типу лампових щіток, вона набуває форми саме таких хромосом. На основі цих експериментів припустили, що інтерфазні хромосоми всіх еукаріотів організовані в петлі, які зазвичай є надто малими й нестійкими, щоб їх можна було легко спостерігати. Уводячи таку ДНК, скажімо, ссавців у овоцити амфібій для формування видимих хромосом типу лампових щіток, можна було б проводити детальний аналіз кореляції між структурою петель, розташуванням генів і певними послідовностями на ДНК.

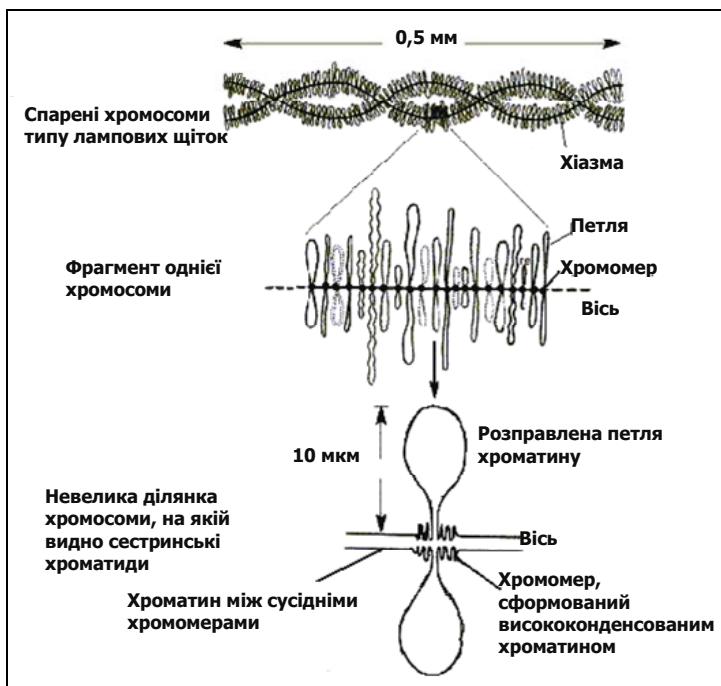


Рис. 8.24. Модель будови хромосоми типу лампових щіток
(за Альбертсом Б., Джонсоном А.,
Левісом Дж., та ін., 2002)

Сукупність ознак хромосомного набору (кількість, розмір, форма), характерних для того чи іншого виду (рис. 8.25), називається **каріотипом**.

До 1971 р. хромосоми класифікували лише за розміром і розташуванням центромери (*Денверська номенклатура*). У стандартному каріотипі людини 22 пари **аутосом** (нестатеві хромосоми) залежно від розміру були розподілені на 7 груп і позначені великими латинськими літерами від А до Г. Пара **статевих хромосом** (*гоносом*) розташовується окремо. За цією номенклатурою буває важко розрізнити хромосоми в межах однієї групи.

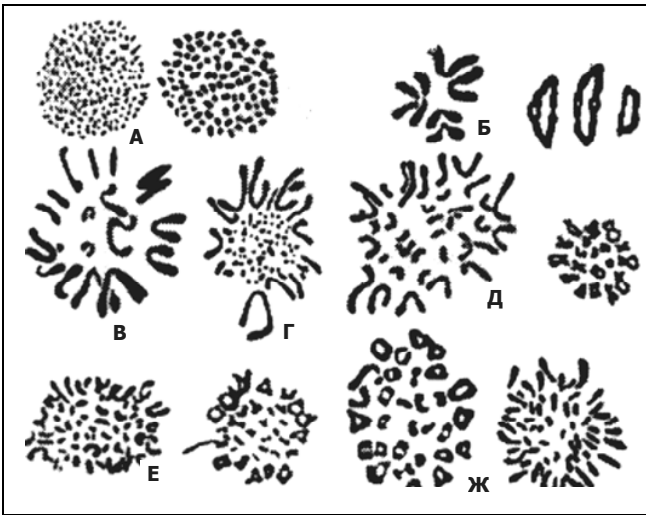


Рис. 8.25. Приклади каріотипів різних видів тварин:
А – річковий рак ($2n = 196$); Б – комар *Culex* ($2n = 6$);
В – щука ($2n = 18$); Г – курка; Д – кішка ($2n = 38$);
Е – кінь ($2n = 66$); Ж – бик ($2n = 60$)
(за Мюнцингом А., 1963)

У 1971 р. на конференції в Парижі було прийнято *Паризьку номенклатуру*, яка дозволяє ідентифікувати як кожну хромосому, так і окремі її фрагменти. Завдяки специфічним методам обробки й наступного фарбування флуоресцентними барвниками, наприклад *акрихін-іпритом*, у кожній парі хромосом вияв-

ляються суворо індивідуальні набори темних і світлих смуг різної ширини, які залежать від особливостей нуклеотидних послідовностей в різних парах хромосом (рис. 8.26).

Крім того, при описанні хромосом застосовуються спеціальні символи, прийняті в Міжнародній системі класифікації хромосом людини (*ISCN – International System of Human Chromosome Nomenclature*), за допомогою яких позначають різні їхні ділянки, структурні особливості (втрата ділянки, перенесення фрагмента з однієї хромосоми на іншу, перевертання якогось фрагмента тощо). Усі ці особливості, які є відхиленням від норми, лежать в основі спадкових захворювань людини.

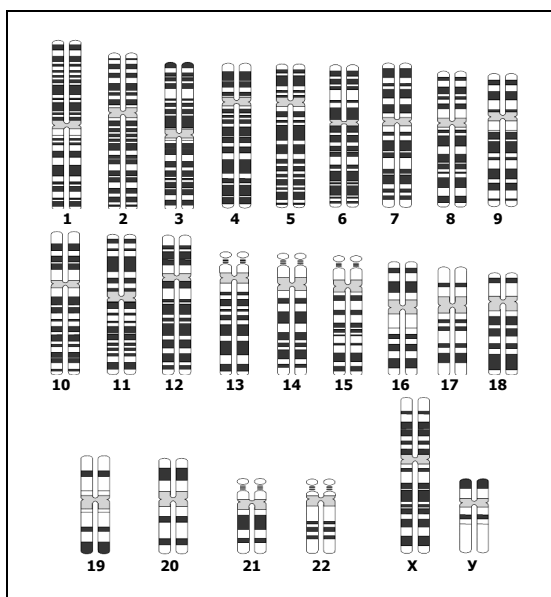


Рис. 8.26. Ідіограма хромосом людини, побудована та пронумерована згідно з Паризькою класифікацією

Розташування хромосом у ряд групами з урахуванням їхніх розмірів та інших морфологічних особливостей, передбачених Денверською й Паризькою номенклатурами, називається

ідіограмою (від грец. *idios* – особливий, своєрідний і *gramma* – рисунок, лінія). Порівняльний аналіз ідіограм використовується в каріосистематиці для виявлення спорідненості різних груп організмів на основі подібності та відмінності їхніх хромосомних наборів.

ЯДЕРЦЕ

Ядерце (лат. *nucleolus*) – щільне тільце всередині ядра більшості клітин еукаріотів, не оточене мембраною (рис. 8.27). Воно є місцем синтезу рРНК і формування субодиниць рибосом.

Ядерця – надзвичайно динамічні структури. Вони варіюють за розмірами, формою, щільністю, локалізацією не тільки серед різних видів організмів, але й в різних клітинах одного організму і навіть у клітинах одного типу, залежно від функціонального стану клітини і стадії клітинного циклу.

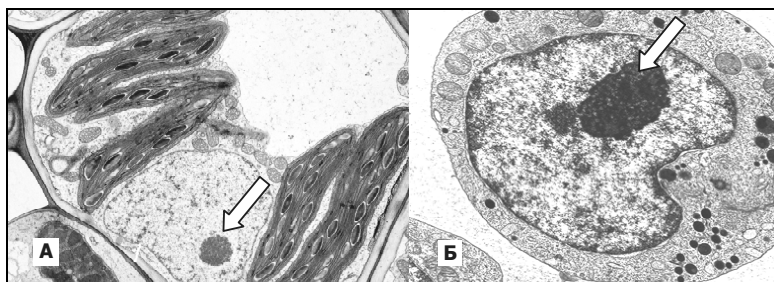


Рис. 8.27. Ядерце (позначено стрілками) у ядрах клітин:
А – рослинної, Б – тваринної

У ядерці сконцентровані ділянки ДНК, що несуть гени трьох різновидів рРНК, які є структурною основою рибосом.

Гени рРНК представлені в геномі багатьма послідовно розташованими копіями (**тандемами**). Зокрема, у людини кількість таких копій-тандемів у гаплоїдному геномі – більше 200,

у миші – 100, у кішки – 1000. У амфібій та багатьох рослин їхня кількість може сягати декількох тисяч. Така висока повторюваність цих генів забезпечує клітині здатність у будь-який момент на високому рівні активності продукувати рибосоми і здійснювати білковий синтез. Проте за нормальних умов клітина використовує лише частину цих генів (30–40 %), інші знаходяться у ядерці в неактивному, структурно репресованому стані.

Один **рибосомний повтор** містить генетичні послідовності одразу трьох видів рРНК (18S-, 28S- і 5.8S-рРНК). У результаті його транскрипції та процесингу первинного транскрипту вищеплюються три функціональні молекули рРНК, які беруть участь у формуванні рибосоми. Рибосомний повтор транскрибується в ядерці РНК-полімеразою I за участю специфічного комплексу білків.

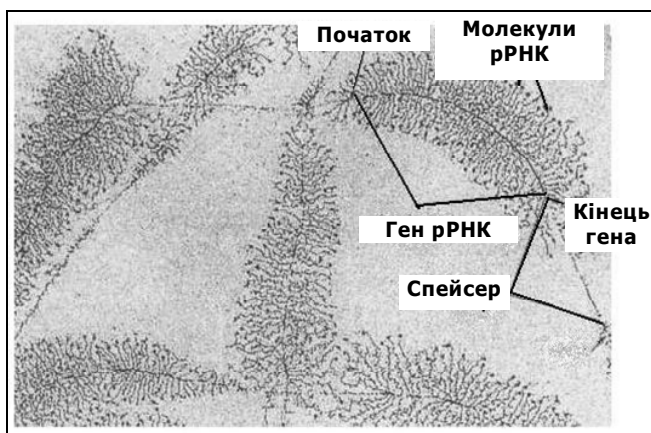


Рис. 8.28. Транскрипція кластерів генів рРНК

Зона ДНК рибосомного повтору (рДНК) складається із транскрибованої ділянки та проміжної – *спейсера*, який не транскрибується. Одночасно на одному гені рРНК працює велика кількість РНК-полімераз, завдяки чому при електронно-мікроскопічних дослідженнях такий активний ген разом з продукованими транскриптами набуває характерного вигляду гі-

лочок ялинки (рис. 8.28). Кластери рибосомних повторів локалізуються в ділянках окремих хромосом, формуючи в них **ядерцеорганізуючі регіони (ЯОР)**, або **ядерцеві організатори**. У каріотипі людини це – ділянки коротких плечей (вторинні перетяжки) п'яти пар акроцентричних хромосом (13, 14, 15, 21 та 22 пари). Ділянки кластерів рДНК в окремих ЯОР помітно розрізняються за розміром. ЯОР у метафазних хромосомах добре виявляються селективним забарвленням азотнокислим сріблом. Завдяки цьому методу було чітко показано, що гени рРНК розташовуються тільки в ділянці вторинної перетяжки, утворюючи навколо неї нещільне гало, яке не виявляється стандартними методами забарвлення метафазних хромосом.

АРХІТЕКТУРА ЯДЕРЦЯ

Через високу щільність і показник заломлення ядерце було одним із перших субклітинних компартментів, виявлених мікроскопістами. За даними електронної мікроскопії, ядерце найбільш високоорганізованих еукаріотів містить три основні морфологічні компоненти: **фібрилярний центр**, **щільний фібрилярний компонент (зона)** і **гранулярний компонент** (рис. 8.29). Кожний із них пов'язаний із певними процесами формування рибосом.

Фібрилярні центри ядерце утворенні поєднанням ДНК ядерцевих організаторів відповідних хромосом. Вони містять кілька сотень копій генів рРНК, при цьому неактивні гени (*резервні*) розташовані в центрі цієї зони, а активні, на яких здійснюється транскрипція рРНК, – по периферії, на межі із сусіднім щільним фібрилярним компонентом. Новоутворені транскрипти рРНК поступово віддаляються від матричної ДНК і виявляються спочатку в *щільному фібрилярному компоненті* й пізніше – у *гранулярному*.

Біогенез рРНК включає складний набір реакцій пост-транскрипційного процесингу, останні події якого відбуваються у гранулярному компоненті. Тут же відбувається і поєднан-

ня рРНК з рибосомальними білками з утворенням прерибосомних часточок. Нарешті, прерибосомні часточки (субодиниці рибосом) переміщуються в цитоплазму через ядерні пори.

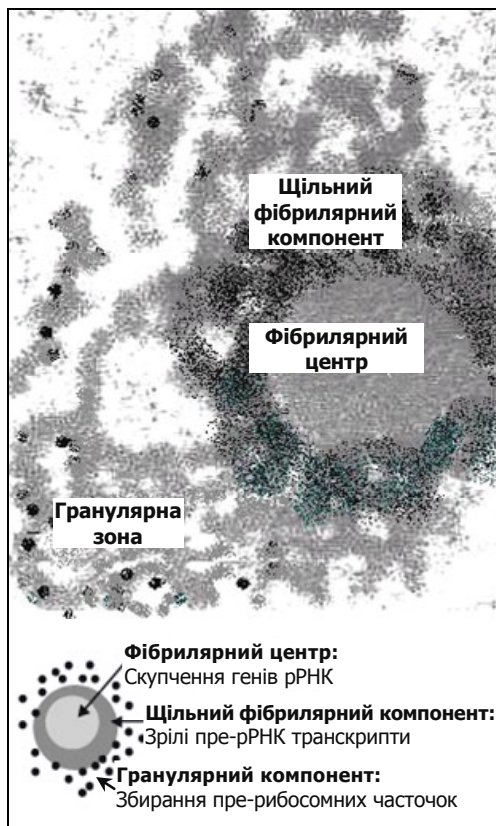


Рис. 8.29. Ультраструктура ядерця
(електронно-мікроскопічна фотографія)

Інтенсивність продукції прерибосомних часточок надзвичайно висока. Наприклад, у дріжджовій клітині в середньому щосекунди утворюється 40 рибосом. Це означає, що із ядра щосекунди експортуються 80 рибосомних субодиниць. Транспорт рибосомних часточок є енергозалежним односпрямованим процесом, до якого залучені специфічні транспортні фактори.

Ядерце значно варіює морфологічно залежно від типу клітини. У найпростіших еукаріотичних дріжджових клітинах це – єдина серпоподібна структура, яка безпосередньо прилягає до ядерної оболонки й займає до однієї третини ядра. У ньому практично не розрізняються три основні морфологічні компоненти ядерця хребетних. У тваринних і рослинних клітинах ядерця є дуже динамічними структурами, які виявляють значну варіабельність залежно від активності. Повністю активне ядерце велике, зі значним взаємопроникненням зон фібрилярних центрів, щільного фібрилярного та гранулярного компонентів. І навпаки, у клітин у стані спокою або клітин з ядерцевою інактивацією після вимушеної затримки транскрипції ядерце маленьке й компактне, у ньому різні морфологічні компоненти мають тенденцію чітко розділятися на суміжні блоки.

У дріжджів ядерце залишається інтактним (незмінним) під час мітозу, а протягом його останніх стадій розділяється по мітотичному веретену навпіл. А ядерце багатоклітинних організмів розбирається під час мітозу й різні ядерцеві білки упорядковано "залишають" ядерцеву структуру. Спочатку зникає гранулярний компонент, за ним – щільний фібрилярний. Одночасно на хромосомах стають видимими ядерцеорганізуючі регіони (ЯОР), які при електронній мікроскопії виявляють морфологію, подібну до фібрилярних центрів. Наприкінці мітозу в новосформованих дочірніх ядрах перед початком транскрипції виникають маленькі округлі рибонуклеопротейнові структури – *передядерцеві (пренуклеоллярні) тільця*. Початок транскрипції генів рРНК РНК-полімеразою I викликає притягування цих тілець до ЯОР і поступове формування повного ядерця.

ЗБИРАННЯ І ФУНКЦІОНУВАННЯ ЯДЕРЦЕВОГО КОМПАРТМЕНТА

Нині загальноприйнято, що ядерце є результатом об'єднання одиниць транскрипції з послідовним залученням факторів процесингу новоутвореної РНК. Хоча гени рРНК характеризуються дуже високою активністю транскрипції, становлячи близько 60 % від загального синтезу РНК в активних клітинах, не

всі копії рРНК-генів постійно активні. Приблизно половина з них у нормі репресована. Вважається, що в первинному зближенні всіх рРНК-генів із різних пар хромосом, а отже, і формуванні ядерцевого компартмента, і в репресії незадіяних на даний час копій генів рРНК бере участь хроматин-ремодулюючий білок родини Sir (від *Silent Information Regulatory*). Білки цієї родини забезпечують також тісне зближення хроматинових фібрил при формуванні конденсованого, генетично неактивного, гетерохроматину в інших частинах ядра (їхня назва саме і походить від англійського слова *silent* – мовчазний, тихий).

Гетерохроматинова репресія частини рДНК є також захисним механізмом, який обмежує гомологічну рекомбінацію (обмін подібними фрагментами) у ділянках ДНК ядерця, що містять множинні повтори. При порушенні цього механізму неконтрольована рекомбінація в ядерці зумовлює "випадання" окремих фрагментів ДНК з утворенням позахромосомних копій рДНК, які накопичуються у вигляді сотень малих кілець і нерівномірно розподіляються між дочірніми клітинами під час мітозу. Накопичення материнськими клітинами позахромосомних кільцевих рДНК веде до зменшення здатності клітин до поділу. Цей феномен пов'язують зі старінням клітини.

В еукаріотичних організмів **біосинтез рибосом** – це тонко регульований процес, який швидко адаптується до змін навколишніх умов. Центральним процесом такої адаптації є регуляція транскрипції рРНК-генів. Показано, що в ядерці активність транскрипції може регулюватися швидше зміною рівня транскрипції активних рРНК-генів, ніж активацією резервних "мовчазних" одиниць транскрипції, які перебувають у гетерохроматиновому стані. Еухроматинові рРНК-гени можуть бути транскрипційно більш або менш активні, залежно від регулюючих сигналів.

Первинний транскрипт, кодований рДНК – великий попередник рибосомної РНК (пре-рРНК), який проходить ще посттранскрипційний процесинг. Він включає видалення довгих спейсерних послідовностей і численні нуклеотидні модифікації. Збирання рибосоми відбувається одночасно з цим процесом дозрівання і включає асоціацію пре-рРНК з 5S рРНК (яка синтезується на інших хромосомах, поза ядерцем), а також із 70–80 різ-

ними рибосомними білками. Гени цих білків також транскрибуються поза ядром, а самі білки синтезуються на мРНК у цитоплазмі, після чого надходять у ядро через ядерні пори. Особливо помітним компонентом ядра є *нуклеолін*, добре вивчений білок (фосфопротейн), присутній у ядрі у великих кількостях і задіяний у біогенезі рибосомних часточок і деяких інших регуляторних функціях. Нуклеолін добре забарвлюється солями срібла, як і все ядро в цілому.

Під час процесингу гігантський рибонуклеопротеїновий комплекс пре-РНК (45S-РНК) поступово втрачає частину білків і послідовностей РНК і потім специфічно розщеплюється, утворюючи самостійні попередники великої і малої рибосомних субодиниць. Через 30 хв (за даними радіоактивного мічення) перші зрілі малі субодиниці рибосом виходять із ядра і з'являються в цитоплазмі. Збирання великих рибосомних субодиниць, що містять 28S-РНК, 5,8S-РНК і 5S-РНК, потребує дещо більшого часу (близько 1 год), тому в ядрі накопичується значно більше недоформованих великих субодиниць, ніж малих. Завершальні стадії дозрівання рибосом здійснюються тільки після виходу рибосомних субодиниць із ядра в цитоплазму. Цим досягається ізоляція функціонуючих рибосом від незрілих ядерних транскриптів.

Процес збирання рибосом вимагає координованої дії багатьох факторів, включаючи нуклеази, малі ядерцеві РНК і багато нерибосомальних білків, які мають бути залучені в ядро. Загальна структурна особливість ядерцевих білків – наявність РНК-розпізнавального мотиву, який зв'язує або рРНК на різних стадіях дозрівання, або малу ядерцеву РНК. Малі ядерцеві РНК відповідають не лише за процеси розщеплення, які вкорочують довгу пре-рРНК, а також і за керування хімічними модифікаціями нуклеотидів у ній. Загальну схему формування рибосомних субодиниць зображено на рис. 8.30.

Ядро, крім виконання основної функції, пов'язаної з біогенезом рибосом, а також його участі у процесах старіння клітини, може *регулювати окремі етапи клітинного циклу* – вхід клітин у мейоз та активність фосфатази Cdc 14 – одного з ферментів, який контролює проходження телофази мітозу.

Існують дані, що повторювані послідовності рДНК ядерця є місцем збирання регуляторного білкового комплексу RENT (*regulator of nucleolar silencing and telophase exit*), до складу якого входить указана фосфатаза та три інші білки, які й забезпечують регуляторні функції ядерця.

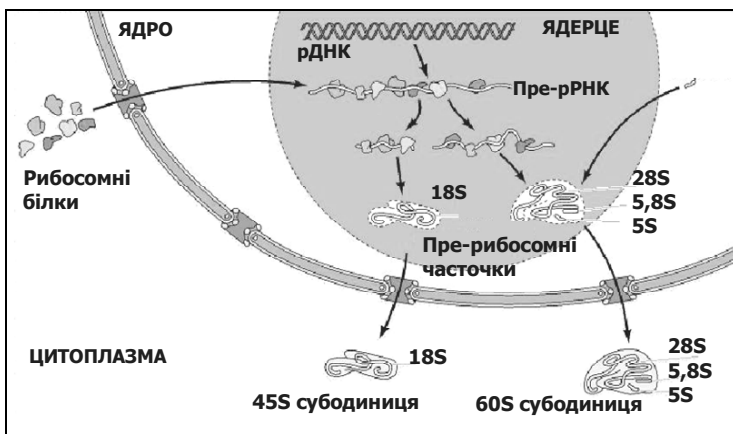


Рис. 8.30. Збирання рибосом. Рибосомальні білки імпортується в ядерце із цитоплазми й починають збиратися на пре-рРНК до її розрізання. Після процесингу пре-рРНК приєднує додаткові рибосомальні білки та 5S рРНК (яка синтезується в іншій частині ядра), формуючи пре-рибосомні часточки. Останній етап – експорт в цитоплазму пре-рибосомних часточок, які стають малою (40S) і великою (60S) рибосомними субодинамицями
(за Купером Дж., 2000)

ПАТОЛОГІЯ ЯДРА

Функціональний стан ядра суттєво впливає на характер функціональної активності всієї клітини і, очевидно, корелює з його розміром. Підвищеній синтетичній активності клітини відповідає велике округле ядро, тоді як при зниженні біосинтетичних процесів зменшується площа ядра та його діаметр.

Структура й розміри ядра в першу чергу залежать від їхньої плоідності. Тетраплоїдні ядра мають більший діаметр, ніж диплоїдні; октаплоїдні – більший, ніж тетраплоїдні.

Поліплоїдні клітини виявляють у тканинах людини в нормі, як, скажімо, мегакаріюцити кісткового мозку, що утворилися в результаті ендорепродукції. Однак найчастіше збільшення кількості поліплоїдних клітин спостерігається при старінні, репаративній регенерації (у печінці, наприклад), гіпертрофії міокарда, при пухлинному рості. У злоякісних пухлинах часто виявляється також *анеуплоїдія* – нестача або надлишок окремих хромосом.

Відображенням функціонального стану ядра є розподіл у ньому хроматину. Домінування в ядрі гетеро- чи еухроматину свідчить про різні стани його активності; перший із них вважається малоактивним або неактивним; другий – досить активним. Оскільки ядро може переходити зі стану функціонального спокою у стан високої функціональної активності й навпаки, морфологічна картина розподілу хроматину у вигляді гетеро- та еухроматину не може вважатися статичною. При цьому можлива як *гетерохроматизація*, так і *еухроматизація* ядер, механізми яких вивчені ще недостатньо.

Не є одностайним і визначення чинників розподілу хроматину в ядрі. Так, *маргінація хроматину* (рис. 8.31), тобто розташування його під ядерною оболонкою у вигляді стрічки чи маленьких грудочок (при цьому ядро дещо зменшене в об'ємі), трактується і як ознака активності ядра, і як вияв його пошкодження. Конгломерат хроматину виникає як наслідок зниження рН клітин при посиленому гліколізі. Цей процес є безпосередньою відповіддю на різноманітну агресію і, певно, перший її вияв.

Зростання конденсації еухроматинових структур (*гіперхроматоз* стінки ядра), яка відображає інактивацію активних ділянок транскрипції, розглядається лише як патологічне явище, як передвісник загибелі клітини. До патологічних змін ядра можна віднести також і його *дисфункціональний (токсичний) набряк*, який зустрічається при різноманітних пошкодженнях клітин. У цьому разі відбувається зміна колоїдно-

осмотичного стану ядра (а також цитоплазми) унаслідок гальмування транспорту речовин через клітинну мембрану.

Пошкодження (*альтерації*) ядер можуть бути оборотними (*сублетальні альтерації*) і необоротними (*летальні, або смертельні*). До перших відносять конденсацію й маргінацію хроматину, до других – такі морфологічні зміни ядра, як пікноз, каріорексис і каріолізис (рис. 8.31, 8.32).

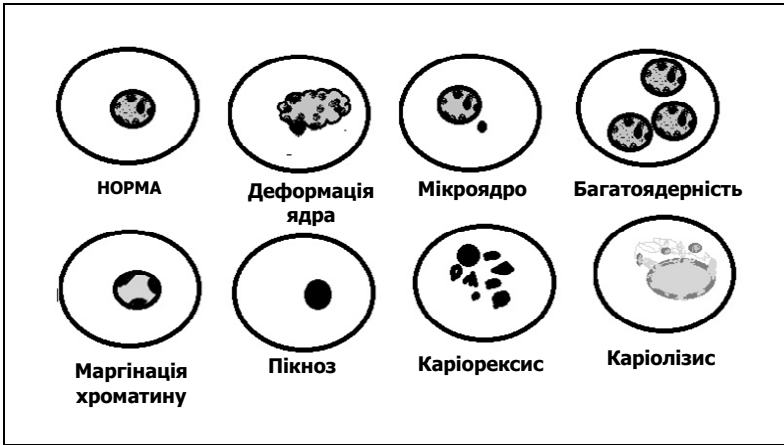


Рис. 8.31. Приклади патологічних змін ядра.
Схема

Пікноз – зморщування ядерного матеріалу в однорідну гіперхромну масу, яка інтенсивно забарвлюється (рис. 8.31, 8.32, Д). Ядро стає гомогенним, інтенсивно базofilічним і зморщеним. Очевидно, що коли ядро пікнотичне – воно є фактично мертве. Нитки хроматину конденсуються в результаті дії ДНКаз та лізосомних катепсинів.

Каріорексис (*rexis* – розрив) – розпад конденсованого хроматину на невеликі неправильної форми фрагменти, які можуть міститися всередині ядерної оболонки, якщо вона збережена, або розташовуються у цитоплазмі в разі її деструкції (рис. 8.31, 8.32, Е).

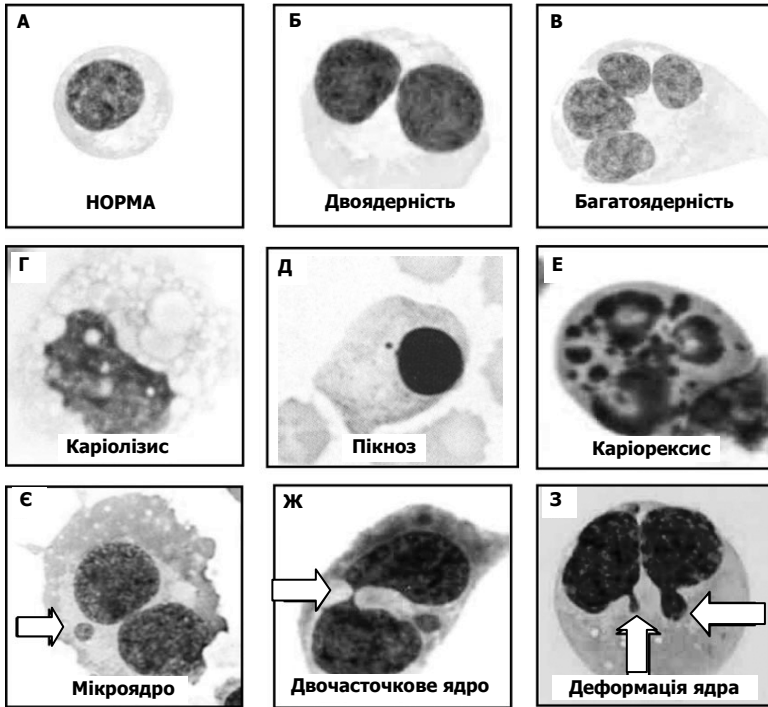


Рис. 8.32. Окремі форми патологічних змін у ядрі на прикладі лімфоцита:

А – норма, Б- двоядерність і В – багатоядерність як результати незавершеного цитокінезу (поділу тіла клітини після розділення ядра);

Г – початок каріолізу; Д – пікноз (у ранньому апоптозі);

Е – каріорексис (при пізньому апоптозі); Є – двоядерність та мікроядро;

Ж – двочасточкове ядро при порушенні мітозу;

З – двоядерна клітина з "брунькуванням" ядер

як результат хромосомних аберацій та порушення процесу мітозу

(за Фенечем М., 2007, зі змінами)

Каріолізис (*lysis* – розчинення, розплавлення) – повне розчинення ядра, тобто це вид такої загибелі ядра, за якої хроматин дезінтегрується (рис. 8.31, 8.32, Г). Створюється враження, що у клітині нібито відсутнє ядро – воно практично не забарвлюється.

Вважають, що каріопікноз, каріорексис і каріолізіс є послідовними стадіями загибелі ядра. Однак дуже часто, але не завжди, каріорексис може не статися, якщо клітина загине відразу після пікнозу або каріорексису, а фрагменти хроматину при цьому елімінуються.

Важливою діагностичною ознакою є зміни форми ядра. Нині виявлені такі патологічні зміни, як **деформація ядер** цитоплазматичними включеннями при дистрофічних процесах, **поліморфізм ядер** при запаленні (*гранулематоз*) і пухлинному рості (*клітинний атипізм*). Форма ядра може змінюватись також у зв'язку з утворенням множинних випинань ядра в цитоплазму, що зумовлено збільшенням поверхні ядра і свідчить про підвищення його синтетичної активності.

Певною формою патології можна вважати зміни кількості ядер у клітині: багатоядерність, появу "супутника ядра" та без'ядерність.

Багатоядерність виникає при злитті декількох клітин або при порушенні мітозу, коли відбувається поділ ядра без наступного поділу цитоплазми, що досить часто спостерігається після опромінення, при злоякісному рості або при введенні цитостатиків (хоча багатоядерними є й нормальні клітини, такі як остеокласти, мегакаріоцити, синцитіотрофобласти) (рис. 8.31, 8.32, Б, Є, З).

Мікроядра ("супутниками ядра", *каріомерами*) називають дрібні, подібні до ядра утворення з відповідною структурою і власною оболонкою, які розташовані в цитоплазмі біля незмінених ядер (рис. 8.31, 8.32, Є). Причиною їхнього утворення вважають хромосомні мутації та порушення розходження хромосом при поділі. При цьому окремі хромосоми або їхні фрагменти замикаються в окрему ядерну оболонку й існують окремо від основного ядра. Мікроядра часто спостерігаються за дії токсичних речовин на клітині і в клітинах злоякісних пухлин за наявності значної кількості фігур патологічних мітозів.

Без'ядерність щодо функціональної оцінки клітини трактується неоднозначно. Відомі вторинно-без'ядерні клітинні структури, що є життєздатними (еритроцити, тромбоцити). При патологічних станах можна інколи спостерігати життєздатність частин цитоплазми, відділених від клітини. Однак без'ядерність може свідчити й про загибель ядра, що проявляється каріокінезом, каріорексисом і каріолізисом.

Залишки ядерної субстанції виникають при перніціозній анемії в еритроцитах, де виявлені *тільця Жоллі* – дрібні округлі зернятка в цитоплазмі, які забарвлюють азуром-2 та еозином у червонувато-фіолетовий колір.

Патологічні зміни можуть відбуватися також і в **ядерцях**. За нормальних умов їхні розміри та структура здебільшого адекватні інтенсивності білкового синтезу. З розвитком певних патологій (у пухлинах тощо) висока функціональна (секреторна) активність клітин часто супроводжується збільшенням об'єму, а інколи й кількості ядерць та їхньої вакуолізації. У цих випадках говорять про ядерцеву *гідропію*, або *гідропічне ядерце*.

Зміни ядерць мають важливе значення в морфофункціональній оцінці стану клітини, оскільки з ними пов'язані процеси транскрипції рРНК. Розміри ядерць залежать також від типу клітин та їхньої функції. **Збільшення розмірів і кількості ядерць** говорить про зростання їхньої функціональної активності, що відбивається на підвищенні білкового синтезу. **Гіпергранульовані ядерця** з переважанням гранулярного компонента ядер над фібрилярним можуть свідчити про різний функціональний стан як ядерць, так і клітини у цілому. Наявність таких ядерць корелює з підвищеною базофілією цитоплазми й указує на підвищений синтез рРНК на фоні порушення виходу гранул. Такі *гіперфункціональні ядерця* зустрічаються в молодих плазматичних клітинах, активних фібробластах, гепатоцитах і в багатьох клітинах пухлин.

Розпушування (дисоціація) ядерць (або *гіпогрануляція*) є результатом виведення рРНК до цитоплазми або гальмування ядерцевої транскрипції. Ядро зменшується в розмірах, спостеріга-

ється виражена конденсація ядерцевого хроматину, відбувається поділ гранул і протеїнових ниток. Такі зміни мають місце при енергетичному дефіциті клітини, а також за дії різних агентів, таких як актиноміцин, афлатоксин, іонізуюча радіація.

Певні патологічні стани клітин пов'язані з утворенням ядерних включень – ядерних цитоплазматичних, справжніх ядерних і ядерних вірусообумовлених.

Ядерними цитоплазматичними включеннями називають відокремлені частини цитоплазми в ядрі. Вони можуть вмішувати всі складові частини клітини (органели, пігменти, глікоген тощо). У більшості випадків їхнє виникнення пов'язане з порушенням мітотичного розподілу.

Дійсними ядерними включеннями вважаються ті, що розташовані всередині ядра (каріоплазми) і містять речовини, які зустрічаються в цитоплазмі (білок, глікоген, ліпіди тощо). Здебільшого ці речовини проникають із цитоплазми в ядро через непошкоджені чи пошкоджені пори ядерної оболонки або через зруйновану ядерну оболонку. Можливе також проникнення цих речовин у ядро при мітозі. Такими є, наприклад, включення глікогену в ядра гепатоцитів при цукровому діабеті ("ядерний глікоген", "дірчасті, пусті ядра"), а також сферичні, лінійні, фібрилярні структури, природа яких не відома. У гліальних клітинах фібрилярні структури виявляються після впливу гідрооксиду алюмінію $Al(OH)_3$. Поява сферичних тіл пов'язана з підвищеним синтезом протеїнів і накопичуванням фібрилярних структур. Складні структури виникають у гепатоцитах і епітеліальних клітинах каналців нирок після впливу важких металів (Pb і Vi).

Вірусообумовлені ядерні включення – це включення вірусу в каріоплазмі або включення білкових часточок, які утворюються при внутрішньоядерному розмноженні вірусів.

Ядерна оболонка виконує ряд важливих функцій, порушення яких також викликає розвиток певних клітинних патологій. До таких відносять: **утворення внутрішньоядерних**

трубчастих систем, що відходять від внутрішньої ядерної мембрани, **поява вакуоль** у перинуклеарній зоні та в нуклеоплазмі (при гіпертрофії міокарда, легеневого склерозі, пухлинах печінки).

Із розвитком певних патологій у ядрах можуть формуватися **справжні та псевдовакуолі**. За впливу ряду хвороботворних чинників (скажімо, у відповідь на дію радіації) ядерна мембрана може ставати переривчастою, наприклад, при дилатації перинуклеарних цистерн, або ж утворювати локальні пухирці шляхом інвагінації внутрішньої ядерної мембрани. Це і є справжні внутрішньоядерні вакуолі.

Псевдовакуолі формуються шляхом внутрішньоядерної інвагінації цитоплазми, оточені двома ядерними мембранами й містять різноманітні частинки, органели, зокрема рибосоми. Вони характерні для деяких типів клітин, таких як менінгеальні, клітини Шванна, неусні та інші, а також виявляються в пухлинах. Псевдовакуолі верифікуються в гепатоцитах за різних метаболічних порушень.

Запитання для самоперевірки

1. Назвіть функції ядра.
2. Із яких основних компонентів складається ядро?
3. Який хімічний склад каріоплазми (ядерного соку)?
4. Який склад і функції ядерного матриксу?
5. Назвіть основні компоненти, із яких складається ядерна оболонка (поверхневий апарат ядра).
6. Порівняйте будову й хімічний склад зовнішньої та внутрішньої мембран ядра. Що таке перинуклеарний простір?
7. Що таке ядерна ламіна? Де вона розміщена? Яка її будова? Які функції ядерної ламіни?
8. Що таке нуклеопорини?
9. Як побудована ядерна пора?
10. Яким чином білки проникають із цитоплазми в ядро?
11. Чим відрізняються білки, які для виконання своїх функцій транспортуються в ядро, від решти білків цитоплазми?
12. Про що свідчить збільшення кількості ядерних пор?

13. Що таке ядерно-цитоплазматичне співвідношення? Як його розрахувати?
14. На що вказує збільшення та зменшення ядерно-цитоплазматичного співвідношення?
15. Які зміни відбуваються в ядрі при зростанні функціональної активності клітини?
16. Які зміни відбуваються в ядрі в разі зниження функціональної активності клітини?
17. Які морфологічні критерії функціональної активності клітини вам відомі?
18. У першій клітині спостерігається велике ядро з незначною кількістю гетерохроматину, у другій – ядро середніх розмірів, у каріоплазмі видно численні брилки гетерохроматину. Порівняйте синтетичну активність цих двох клітин.
19. У першій клітині спостерігається ядро середніх розмірів з помірною кількістю гетерохроматину, у другій – мале темне ядро. Порівняйте синтетичну активність цих двох клітин.
20. У першій клітині спостерігається велике світле ядро з незначною кількістю гетерохроматину, у другій – мале темне ядро. Порівняйте синтетичну активність цих двох клітин.
21. Перерахуйте основні рівні компактизації ДНК.
22. Будова подвійної спіралі ДНК. Завдяки яким зв'язкам стабілізується подвійна спіраль ДНК?
23. Що таке гістони? Які гістони ви знаєте?
24. Де зустрічаються гістонові білки? Яка їхня функція та розташування?
25. Функції негістонових ядерних білків. Наведіть приклади.
26. Що таке нуклеосома?
27. Які гістонові білки входять у нуклеосому?
28. Зі скількох молекул білків і яких саме складається "кор" нуклеосоми?
29. Де розташований гістон H1?
30. Що таке лінкерна ділянка в нуклеосомній нитці?
31. Чим утворені 30 нм фібрили ДНП?
32. Розкажіть про будову метафазної хромосоми.
33. Що таке теломери? Їхні функції.
34. Порівняйте первинну і вторинну перетяжки в хромосомі.
35. Що таке плечі хромосоми? На які типи поділяються хромосоми залежно від співвідношення довжини плечей?
36. Дайте визначення центромери.
37. Поясніть значення термінів "геном", "каріотип", "ідіограма".

38. Хроматин, його види.
39. Назвіть відмінності гетеро- та еухроматину.
40. Що таке конститутивний і факультативний гетерохроматин? Яка між ними різниця?
41. Що відбувається з ділянкою ДНП при її переході зі стану еухроматину в стан факультативного гетерохроматину? Відповідь обґрунтуйте.
42. Поясніть, що відбувається з ділянкою ДНП при її переході зі стану факультативного гетерохроматину в стан еухроматину?
43. Що таке статевий хроматин? Де він зустрічається?
44. Яка функція пристінкового гетерохроматину? В яких місцях поверхнього апарату ядра він відсутній?
45. Як закріплені хромосоми в ядрі?
46. Що таке політенні хромосоми? Як вони утворюються?
47. Дайте визначення пуфів. Як вони утворюються? Які процеси в них відбуваються?
48. У яких клітинах і коли можна спостерігати хромосоми типу лампових щіток?
49. Поясніть, чим зумовлена характерна структура хромосом типу лампових щіток.
50. Опишіть ультраструктурну будову ядерця.
51. Хімічний склад ядерця.
52. Що таке фібрилярний і гранулярний компонент ядерця? Їхнє взаємне розміщення.
53. Які процеси відбуваються в кожному із структурних компонентів ядерця?
54. Порівняйте ультраструктурну будову активного й неактивного ядерця.
55. При забарвленні гематоксиліном і еозином одне ядерце стає великим і рожевим, а інше – маленьким і фіолетовим. Які висновки можна зробити про функціональну активність цих двох ядерць? Відповідь обґрунтуйте.
56. Яку функцію виконує ядерце?
57. Де міститься ядерцевий організатор?
58. Як саме можна визначити найбільшу можливу кількість ядерць у клітині?
59. Поясніть функціональне значення множинності повторів генів рРНК.
60. Чи є ядерце постійною структурою в ядрі? Відповідь обґрунтуйте.

Рекомендована література

Загальна цитологія і гістологія : підручник / М. Е. Дзержинський, Н. В. Скрипник, Г. В. Островська та ін. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2010.

Becker's world of the cell / Jeff Hardin, Gregory Bertoni, Lewis J. Kleinsmith, Wayne M. Becker. – San Francisco, Calif. : Pearson / Benjamin Cummings, 2012.

Cooper G. M. The Cell: A Molecular Approach / G. M Cooper. – Boston University. Sunderland (MA) : Sinauer Associates, 2000.

Guo T. Functional organization and dynamics of the cell nucleus / Tongtong Guo and YudaFang // Front Plant Sci. – 2014. – Vol. 5. Article 378. – P. 1–12. Review.

Mistelli T. The nucleus / T. Mistelli, D. L. Spector (eds.) – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2010.

Molecular Cell Biology / H. Lodish, A. Berk, C. A. Kaiser et al. – N. Y. : W. H. Freeman & Company. 2008.

Molecular Biology of the Cell / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis et al. – N. Y., 2013.

Fedorova E. Nuclear architecture and gene regulation / E. Fedorova, D. Zink // Biochim. Biophys. Acta. – 2008. – Vol. 1783, № 11. – P. 2174–2184. Review.

Розділ 9

БІОСИНТЕЗ БІЛКА

Білки є одним із найважливіших класів хімічних речовин, необхідних для життєдіяльності клітини. Недарма вони становлять понад половину сухої маси клітини й виконують надзвичайно широкий спектр функцій, серед яких каталітична (виступають як ферменти – ензими), транспортна (найрізноманітніші системи молекулярного транспорту в мембранах і цитозолі), рецепторна (розпізнання інших речовин: гормонів, антигенів, елементів міжклітинного матриксу) тощо. Цей спектр функцій забезпечують тисячі білкових молекул, які розрізняються як за первинною будовою (послідовністю амінокислот), так і за способом згортання білкової молекули. Крім того, більшість білків у клітині зазнають тих чи інших модифікацій. До них приєднуються олігосахариди, метильні, ацильні та інші функціональні групи. На можливість виконання білком його функції впливає і тривалість життя білкової молекули, що суворо контролюється з боку клітини як цілісної біологічної системи.

Синтезуються білки в цитозолі в результаті процесу матричного синтезу (трансляції), в якому роль матриці (шаблону, що містить інформацію про первинну будову білкової молекули) відіграє молекула матричної (мРНК) або інформаційної РНК (іРНК).

Трансляцією (від лат. *translatio* – переклад) називають синтез поліпептидного ланцюга з амінокислот на матриці мРНК, який здійснюють рибосоми. При цьому справді відбувається переклад з мови нуклеотидів, згідно з якою кожна амінокислота кодується послідовністю з трьох нуклеотидів (триплет, кодон), на мову амінокислотної послідовності, власне з якої й складається білок.

Для здійснення процесу трансляції в цитозолі мають бути:

- рРНК (чотири види рРНК в ядрі об'єднуються з рибосомальними білками та формують субодиниці рибосом, після чого виходять у цитозоль, про що детально йшлося в розд. 8);
- мРНК (у комплексі зі спеціальними білками);
- тРНК (декількох десятків видів);
- 20 видів амінокислот, що синтезуються в самій клітині чи надходять із крові;
- різні ферменти (аміноацил-тРНК-синтетази, фактори ініціації, елонгації та термінації тощо);
- макроергічні сполуки АТФ, ГТФ.

Після закінчення етапу трансляції процес синтезу білків як правило ще не завершений. Так, потім відбуваються:

- **фолдинг** – згортання поліпептидного ланцюгу в певну просторову структуру;
- у випадку багатьох білків – ще й **модифікація** (наприклад, приєднання вуглеводних компонентів, окиснення певних амінокислотних залишків тощо).

Насамкінець, останнє важливе завдання – забезпечити **доставку білка** до місця його майбутнього функціонування. Для цього існують також спеціальні механізми, причому вирішення цього питання починається ще з трансляції.

Так звані "**експортні**" (ті, що призначені для виведення із клітини), **мембранні** та **лізосомальні** білки утворюються мембранозв'язаними рибосомами, тобто рибосомами, прикріпленими до поверхні мембран ендоплазматичної сітки (ЕПС). Завдяки цьому кінець пептиду, що синтезується, проникає у люмен ЕПС, де потім опиняється й увесь білок. У цьому ж люмені відбуваються пізніше фолдинг і модифікація даного білка. У подальшому в транспорті та модифікації беруть участь інші мембранні структури, перш за все апарат Гольджі. Врешті білок "обирає" одну із трьох можливостей:

- виходить із клітини внаслідок екзоцитозу;
- вбудовується в мембрану, стаючи її структурно-функціональною одиницею;
- залишається всередині новоствореної лізосоми.

На відміну від цього, *внутрішні* білки, так звані "хатнього господарства" (білки цитозоллю, мітохондрій, ядра тощо), синтезуються на вільних рибосомах.

Отже, можна сказати, що в утворенні будь-якого білка беруть участь багато інших білків, нуклеїнових кислот та інших речовин, залучених до складного механізму біосинтезу, який детально розглядатиметься нижче.

ТРАНСЛЯЦІЙНИЙ АПАРАТ КЛІТИНИ

ВЛАСТИВОСТІ ГЕНЕТИЧНОГО КОДУ КЛІТИНИ

Як тільки мРНК буде отримана в результаті транскрипції та процесингу, інформація, що закладена в її послідовності, може бути використана для біосинтезу білка – *трансляції* – процесу, який відбувається в цитозолі за участю рибосом. У прокаріотичних клітин трансляція може здійснюватися одночасно з транскрипцією. У еукаріотів ці два процеси відокремлені в просторі та часі: мРНК, що пройшла процесинг у ядрі, виходить через ядерні пори в цитозоль, де й відбувається трансляція (рис. 9.1).

Послідовність нуклеотидів у мРНК "зчитується" послідовно, групами по три нуклеотиди від 5'- до 3'-кінця. мРНК являє собою лінійний полімер із чотирьох різних нуклеотидів – урацил (У), цитозин (Ц), аденін (А), гуанін (Г). Отже, існує можливість кодування $4 \times 4 \times 4 = 64$ можливих поєднань нуклеотидів, наприклад УЦА, УЦЦ, УЦГ і так далі. Однак амінокислот, що входять до складу білків, 20, отже, одна амінокислота теоретично може кодуватись декількома триплетами (табл. 9.1). Кожна група із трьох нуклеотидів називається *кодоном* (codon), і кожен кодон кодує певну амінокислоту чи забезпечує зупинку процесу трансляції.

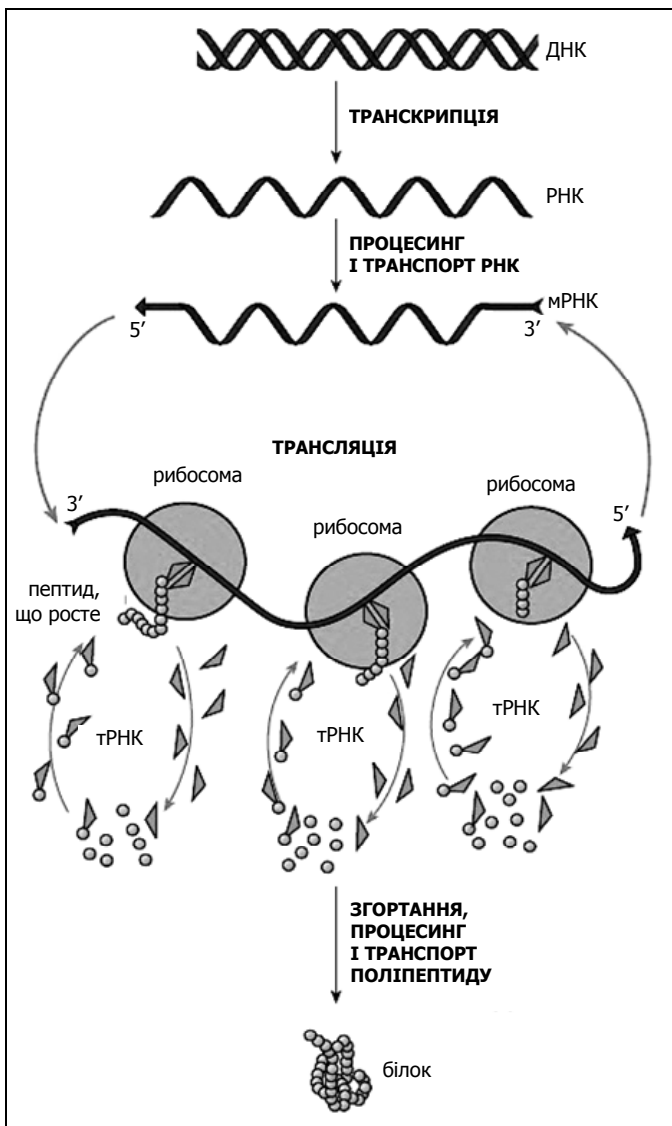


Рис. 9.1. Загальна схема біосинтезу білків у клітині.
 Основне положення молекулярної біології: ДНК-, РНК-білок
 (за Спіріним А. С., 1998)

Існують такі *властивості генетичного коду*:

- 1) триплетність – кожна амінокислота кодується триплетом нуклеотидів РНК – кодоном;
- 2) однозначність – кожний триплет відповідає певній амінокислоті;
- 3) виродженість (надлишковість) – одну амінокислоту можуть кодувати декілька (до шести) кодонів;
- 4) універсальність – генетичний код однаковий, однакові амінокислоти кодуються однаковими триплетами в усіх організмів;
- 5) дискретність – послідовність нуклеотидів має рамку зчитування по три нуклеотиди, один і той самий нуклеотид не може бути у складі двох триплетів;
- 6) наявність старт- і стоп-кодонів. Із 64 можливих триплетів 61 – кодує певну амінокислоту, а 3 – не є смисловими, не кодують амінокислоти, а завершують синтез поліпептидного ланцюга (УАА, УГА, УАГ). Крім цього, є старт-кодон, він кодує метіонін, і є сигналом для початку синтезу білка.

Таблиця 9.1

Схема кодонів на мРНК

Перший нуклеотид	Другий нуклеотид				Третій нуклеотид
	У	Ц	А	Г	
У	УУУ – фенілаланін УУЦ – фенілаланін УУА – лейцин УУГ – лейцин	УЦУ – серин УЦЦ – серин УЦА – серин УЦГ – серин	УАУ – тирозин УАЦ – тирозин УАА – стоп-кодон УАГ – стоп-кодон	УГУ – цистеїн УГЦ – цистеїн УГА – стоп-кодон УГГ – триптофан	У Ц А Г
Ц	ЦУУ – лейцин ЦУЦ – лейцин ЦУА – лейцин ЦУГ – лейцин	ЦЦУ – пролін ЦЦЦ – пролін ЦЦА – пролін ЦЦГ – пролін	ЦАУ – гістидин ЦАЦ – гістидин ЦАА – глутамін ЦАГ – глутимін	ЦГУ – аргінін ЦГЦ – аргінін ЦГА – аргінін ЦГГ – аргінін	У Ц А Г
А	АУУ – ізолейцин АУЦ – ізолейцин АУА – ізолейцин АУГ – метіонін або старт-кодон	АЦУ – треонін АЦЦ – треонін АЦА – треонін АЦГ – треонін	ААУ – аспарагін ААЦ – аспарагін ААА – лізин ААГ – лізин	АГУ – серин АГЦ – серин АГА – аргінін АГГ – аргінін	У Ц А Г
Г	ГУУ – валін ГУЦ – валін ГУА – валін ГУГ – валін	ГЦУ – аланін ГЦЦ – аланін ГЦА – аланін ГЦГ – аланін	ГАУ – аспарагінова ГАЦ – кислота ГАА – глутамінова ГАГ – кислота	ГГУ – гліцин ГГЦ – гліцин ГГА – гліцин ГГГ – гліцин	У Ц А Г

АКТИВАЦІЯ АМІНОКИСЛОТ

Кодони не розпізнають напряду амінокислоти, які вони кодують, тобто нуклеотиди не зв'язуються напряду з амінокислотами, для цього потрібні молекули-адаптери, і цю роль виконують **транспортні РНК** (тРНК, tRNA). Їхні невеликі молекули побудовані лише із 70–90 нуклеотидів (у тому числі й із такими невластивими іншим молекулам РНК азотистими основами, як, скажімо, дигідроуридин). Одноланцюгові молекули тРНК згортаються у просторі таким чином, що на чотирьох ділянках утворюються спарені структури (рис. 9.2, А), між якими є "вільні" ділянки – петлі. Вторинна структура молекул тРНК у двовимірному просторі має конформацію "листка конюшини", а за даними рентгеноструктурного аналізу, їхня третинна структура нагадує велику латинську літеру L (рис. 9.2, Б), при утворенні якої задіяні водневі зв'язки.

Таблиця 9.2

Основні компоненти білок-синтезуючої системи клітини

Необхідні компоненти	Функції
1. Амінокислоти	Субстрати для синтезу білків
2. тРНК	Виконують функцію "адаптерів". Одним акцепторним кінцем взаємодіють з амінокислотами, а антикодоном – з кодоном мРНК
3. Аміноацил-тРНК-синтетази	Кожна aa-тРНК-синтетаза каталізує реакцію специфічного зв'язування з однією із 20 амінокислот відповідної тРНК
4. мРНК	Матриця, містить лінійну послідовність кодонів, що визначають первинну структуру білків
5. Рибосоми	Рибонуклеопротеїнові субклітинні структури, є місцем синтезу білків
6. АТФ, ГТФ	Джерело енергії
7. Білкові фактори ініціації, елонгації, термінації	Специфічні позарибосомальні білки, необхідні для процесу трансляції (12 факторів ініціації: eIF; 2 фактори елонгації: eEF1, eEF2; фактори термінації: eRF)
8. Іони магнію	Кофактор, що стабілізує структуру рибосом

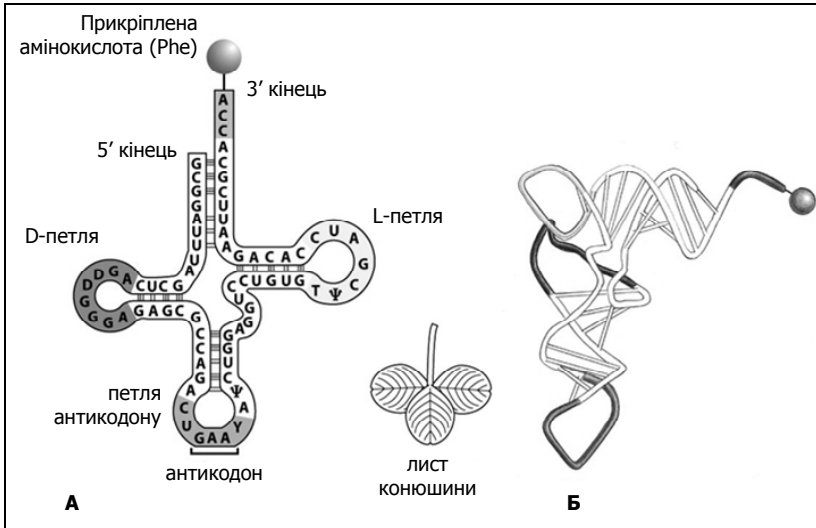


Рис. 9.2. Будова типової тРНК:
 А – механізм спарювання основ у відповідних ділянках молекули (структура "листя конюшини");
 Б – тривимірна конформація молекули
 (за Албертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Дж. та ін., 2013)

Дві ділянки неспарених послідовностей на молекулі тРНК мають важливе значення для її участі в біосинтезі білка. Одна з цих ділянок утворює **антикодон** (anticodon), і є комплементарною до кодону на мРНК. Інша – коротка одноланцюгова ділянка на 3'-кінці тРНК, до якої складнофірним зв'язком приєднується відповідна амінокислота. У такий спосіб тРНК поєднує мРНК та амінокислоту.

Оскільки кожен кодон містить три нуклеотиди, один і той самий генетичний текст можна прочитати у різний спосіб (починаючи з першого, другого або третього нуклеотиду), тобто в трьох різних **рамках зчитування**. Тому дуже важливим для біосинтезу білка є правильне позиціонування рибосоми на стартовому AUG-кодоні.

Кожна молекула тРНК з'єднується з певною амінокислотою, однією із 20, що входять до складу білків. Однак кількість тРНК

для кожної амінокислоти не збігається з кількістю кодонів у мРНК і, відповідно, деякі тРНК здатні зв'язуватись більш ніж з одним кодоном.

Сьогодні не викликає сумніву, що перші дві основи антикодону утворюють міцні пари та вносять найбільший вклад у специфічність декодування, а зв'язок третьої основи набагато слабший, ніж перших двох, і це дозволяє деяким тРНК "прочитувати" більше, ніж один кодон. Гіпотеза, що пояснює характер кодон-антикодонових взаємодій, отримала назву "**гіпотези розхитування**" (мається на увазі, що третя основа більшості кодонів має певний ступінь свободи при утворенні пари з відповідними кодоном і нібито "похитується") (рис. 9.3).

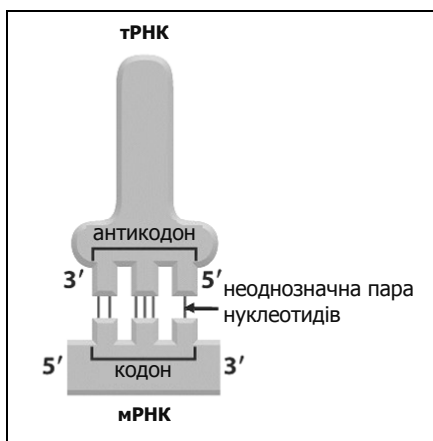


Рис. 9.3. Неоднозначна відповідність при спарюванні основ між кодонами та антикодонами
(за Албертсом Б., Джонсоном А.,
Льюїсом Дж. та ін., 2013)

Амінокислоти – органічні сполуки, у молекулі яких присутні одночасно карбоксильні та амінні групи (рис. 9.4). Усі амінокислоти – амфотерні, вони здатні проявляти як кислотні, так і основні властивості. Важливою особливістю амінокислот є їхня здатність утворювати поліпептидні ланцюги (власне, білки).

Комплекс амінокислоти та тРНК називається **аміноацил-тРНК (aminoacyl-tRNA)**. Розпізнання та зв'язок "правильної" амінокислоти з тРНК забезпечує фермент **аміноацил-тРНК-синтетаза (aminoacyl-tRNA-synthetases)**. Для кожної амінокислоти в клітині існує свій фермент, тобто їх нараховується 20 – одна прикріплює гліцин до всіх тРНК, що впізнають кодон, який "шифрує" гліцин, інша – аланін до всіх тРНК, які впізнають кодони до аланіну і т. д.

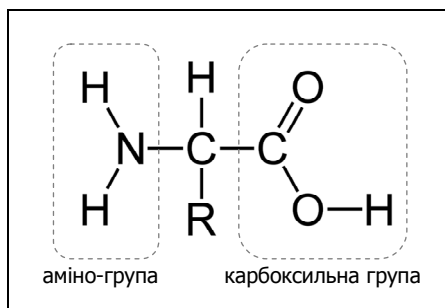


Рис. 9.4. Хімічна формула амінокислот

Реакція, яка каталізується аміноацил-тРНК-синтетазою – приєднання амінокислоти до 3'-кінця тРНК – спряжена з гідролізом АТФ, у результаті між тРНК та амінокислотою утворюється високоенергетичний зв'язок. Цей процес набуття багатой енергією форми називається **активацією** амінокислот. Енергія цього зв'язку використовується в подальших етапах синтезу білка – для формування ковалентного зв'язку між амінокислотою та поліпептидним ланцюгом, що росте.

Отже, приєднуючись до молекули тРНК своїм карбоксильним кінцем, амінокислоти активуються – переходять у багату енергією форму, здатну спонтанно утворювати пептидний зв'язок, що й зумовлює синтез поліпептидів.

Синтез білку полягає в утворенні пептидного зв'язку між карбоксильною групою на кінці поліпептидного ланцюга, що росте, та аміноацильною групою вільної амінокислоти, що підходить (рис. 9.5). Отже, білок синтезується від аміно- (N-) до карбокси-

льного (С-) кінця. Під час усього процесу карбоксильний кінець, що нарощується, залишається активованим завдяки ковалентному зв'язку з тРНК (утворюється *пептидил-тРНК*). Приєднання чергової амінокислоти руйнує цей ковалентний високоенергетичний зв'язок, але водночас відбувається його "заміна" на аналогічний зв'язок на "новій" амінокислоті. Таким чином, кожна амінокислота, що має приєднатись до поліпептидного ланцюгу, має енергію для активації наступної амінокислоти.

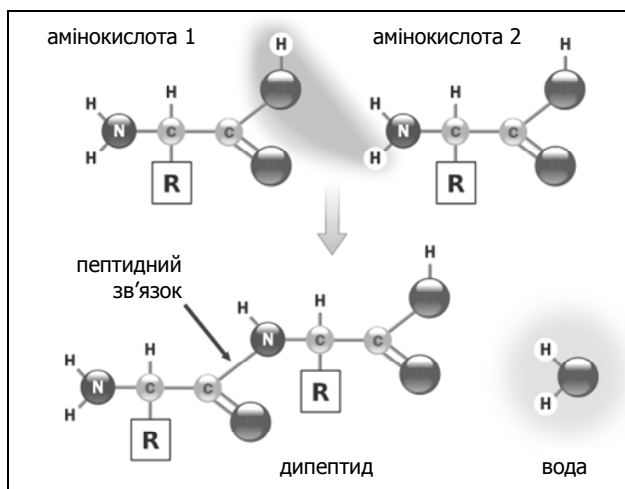


Рис. 9.5. Схема поєднання амінокислот

СТРУКТУРА ТА ПРИНЦИП РОБОТИ РИБОСОМ

Процес власне трансляції забезпечують *рибосоми (ribosome)* – немембранні органели, що складаються із двох субодиниць, кожна із яких є складним *рибонуклопротеїновим* комплексом – комплексом рРНК та рибосомальних білків. Кількість рибосом у клітині може сягати мільйонів.

Рибосоми були виявлені та описані Джорджем Палладе (George E. Palade) на початку 1950-х років і на його честь їх

було названо "частинками Палладе", але згодом, у 1958 р., їх було "перейменовано" на "рибосоми" з огляду на високий вміст РНК (рис. 9.6).

Збирання субодиниць рибосом в еукаріотів відбувається в ядерці; після виходу в цитозоль дві субодиниці з'єднуються на молекулі мРНК і починають синтезувати білок. Якщо рибосома не задіяна в синтезі білка, то її субодиниці знову роз'єднуються. Пізніше вони можуть знову зібратись на іншій молекулі мРНК.

Працюють рибосоми досить ефективно: за одну секунду еукаріотична рибосома приєднує до поліпептидного ланцюга приблизно 2 амінокислоти, а бактеріальна – до 20 за секунду.

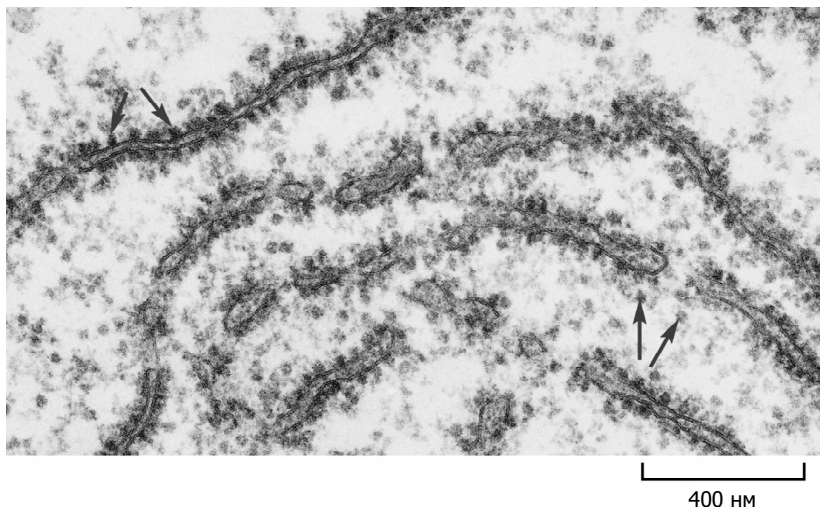


Рис. 9.6. Електронограма рибосом у цитозолі еукаріотичної клітини
(за Албертсом Б., Джонсоном А.,
Льюїсом Дж. та ін., 2013)

Рибосоми про- та еукаріотів подібні за будовою, хімічним складом та функціями, проте відрізняються за розміром. Складаються рибосоми із двох субодиниць, які зазвичай позначають одиницями Сведберга (S), що є мірою швидкості

седиментації (осадження) під час центрифугування, і залежать від маси, розміру та форми частинки. Позначені в цих одиницях, велика субодиниця є 50S або 60S (прокаріотичні або еукаріотичні відповідно), мала є 30S або 40S, і ціла рибосома (комплекс малої разом з великою) 70S або 80S (рис. 9.7).

Прокаріотична рибосома 70S має молекулярну вагу близько $2,7 \times 10^6$ Да і складається із двох субодиниць: *малої* 30S, яка має 21 одиницю різних білків і єдину молекулу 16S рРНК, та *великої* 50S, котра складається із 34 різних білків та двох молекул рРНК – 23S та 5S.

Еукаріотична рибосома 80S важить близько 5×10^6 Да і має також дві субодиниці: *малу* 40S – формується із 33 білків і 18S рРНК, та *велику* 60S, що складається із 49 білків та трьох молекул рРНК – 5S, 5,8S і 28S.

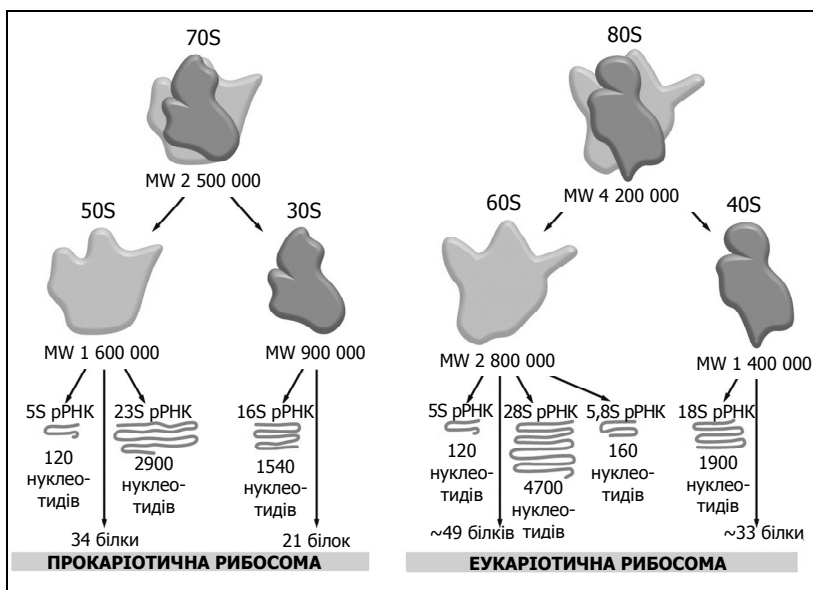


Рис. 9.7. Схема будови рибосом у прокаріотів та еукаріотів (за Албертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Дж. та ін., 2013)

Більшість *рибосомальних білків* є основними завдяки наявності великої кількості бокових ланцюгів Arg⁺ та Lys⁺. Більшість із цих позитивно заряджених груп взаємодіють з від'ємно зарядженими фосфатними групами молекул рРНК, що і стабілізує комплекс рРНК-білок.

Відомо, що за загальну структуру рибосоми та здатність "правильно розташовувати" молекули тРНК і мРНК відповідають саме рРНК, а не рибосомальні білки. Останні локалізовані по периферії органели та в проміжках між щільно упакованими рРНК. Основною роллю цих білків, очевидно, є стабілізація каркаса рибосоми, особливо при можливих змінах конформації рРНК, які відбуваються при каталізі біосинтезу білка. Молекули РНК, що мають каталітичні властивості (виконують ферментативні функції) називаються *рибозимами*. На сьогодні вважають, що саме молекули РНК, а не білки, були першими каталізаторами в живих клітинах.

Для здійснення своїх функцій рибосома містить чотири ділянки для зв'язування з РНК: одна призначена для приєднання мРНК, і три – для тРНК (А-, Р- та Е- сайти) (рис. 9.8).

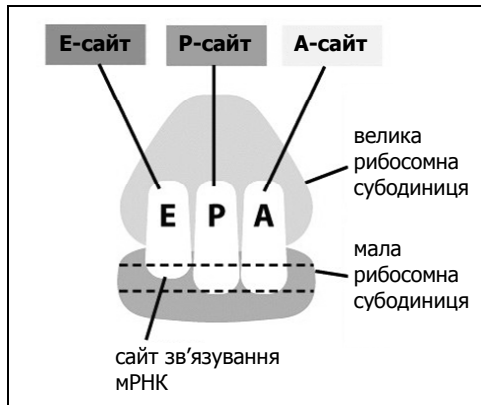


Рис.9. 8. Схема розміщення центрів зв'язування на рибосомі (за Албертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Дж. та ін., 2013)

Перший сайт (центр) зв'язування тРНК називається *сайтом аміноацил-тРНК*, або *А-сайтом*. У ньому приєднується чергова молекула аміноацил-тРНК. Друга ділянка, "*пептидил-тРНК*", або *Р-сайт*, є ділянкою зв'язування з молекулою пептидил-тРНК (несе новосинтезований поліпептидний ланцюг). Молекула тРНК міцно тримається в А- та Р-сайтах тільки якщо її антикодон утворює комплементарні пари основ з кодоном на мРНК. А та Р ділянки розташовані дуже близько одна від одної. *Вихідний (Е-сайт*, від exit – вихід) *сайт* – ділянка, на яку переміщується тРНК, що втратила зв'язок з пептидилом перед тим, як "відійти" від рибосоми. Сайт зв'язування мРНК знаходиться в малій субодиноці. Він утримує рибосому "нанизаною" на мРНК, котру рибосома транслює.

ТРАНСЛЯЦІЯ мРНК

У ході біосинтезу білка, як уже згадувалося раніше, зчитування інформації з мРНК відбувається в напрямку від 5'- до 3'-кінця, забезпечуючи синтез пептиду від N- до С-кінця.

Кожна еукаріотична мРНК кодує послідовність лише одного поліпептидного ланцюга (тобто вона *моноцистронна*), на відміну від прокаріотичних мРНК, які часто містять інформацію про декілька пептидів (тобто вони *поліцистронні*). Ці відмінності викликані тим, що у прокаріотів у ДНК відсутні інтрони. Крім того, на поліцистронних мРНК синтез білка починається до того, як закінчується їхній власний синтез, оскільки процеси транскрипції та трансляції не розділені просторово. В еукаріотів трансляція відбувається у цитозолі, куди із ядра потрапляють уже "зрілі" мРНК.

Трансляцію в усіх організмів можна поділити на три етапи: *ініціація* (початок синтезу поліпептиду), *елонгація* (продовження синтезу) і *термінація* (зупинка синтезу й вивільнення готового поліпептидного ланцюга).

ІНІЦІАЦІЯ ТРАНСЛЯЦІЇ

Синтез білка в більшості випадків починається з AUG-кодону, що кодує метіонін (у прокаріотичних організмів використовується модифікована форма метіоніну – формілметіонін). Цей кодон називають *стартовим*, або *ініціаторним*. Ділянка РНК, із якої починається трансляція, є дуже важливою, бо вона встановлює рамку зчитування для всього подальшого ланцюга. Помилка на один нуклеотид приводить до неправильного зчитування всіх наступних кодонів і згодом до синтезу функціонально неактивного білка. Отже, у всіх новосинтезованих білків N-кінець завжди починається з метіоніну. Пізніше цей перший метіонін буде вирізаний спеціальною протеазою.

Для ініціації трансляції необхідна також наявність певних нуклеотидних послідовностей у ділянці стартового кодону (послідовність Козак у еукаріотів та послідовність Шайна – Дальгарно у прокаріотів). Існування послідовності, що відрізняє стартовий AUG від "внутрішніх", є цілком необхідним, оскільки в іншому випадку ініціація біосинтезу білка відбувалась хаотично на всіх AUG-кодонах. Послідовність Козак включає в себе чотири-шість нуклеотидів, що передують старт-кодону, та один-два нуклеотиди безпосередньо після старт-кодону (ці послідовності є видоспецифічними). Послідовність Козак не є сайтом зв'язування рибосоми, на відміну від бактеріальної послідовності Шайна – Дальгарно.

Процес ініціації забезпечується спеціальними білками (білковими комплексами) – *факторами ініціації* (*initiation factors*, IF, у прокаріотів; eIF (від англ. *eukaryotes*) – в еукаріотів). У прокаріотів відомо всього три білкові комплекси: IF1, IF2 та IF3, а в еукаріотів – щонайменше 11.

Механізми ініціації трансляції у про- та еукаріотів суттєво відрізняються: прокаріотичні рибосоми потенційно здатні знаходити стартовий AUG та ініціювати синтез на будь-яких ділянках мРНК, тоді як еукаріотичні рибосоми зазвичай приєднуються до мРНК у ділянці кепу і "сканують" її в пошуках стартового кодону.

В еукаріотів ініціаторна тРНК (метіонін-тРНК) разом з факторами ініціації (eIFs) приєднується до малої субодиноці рибосоми (рис. 9.9).

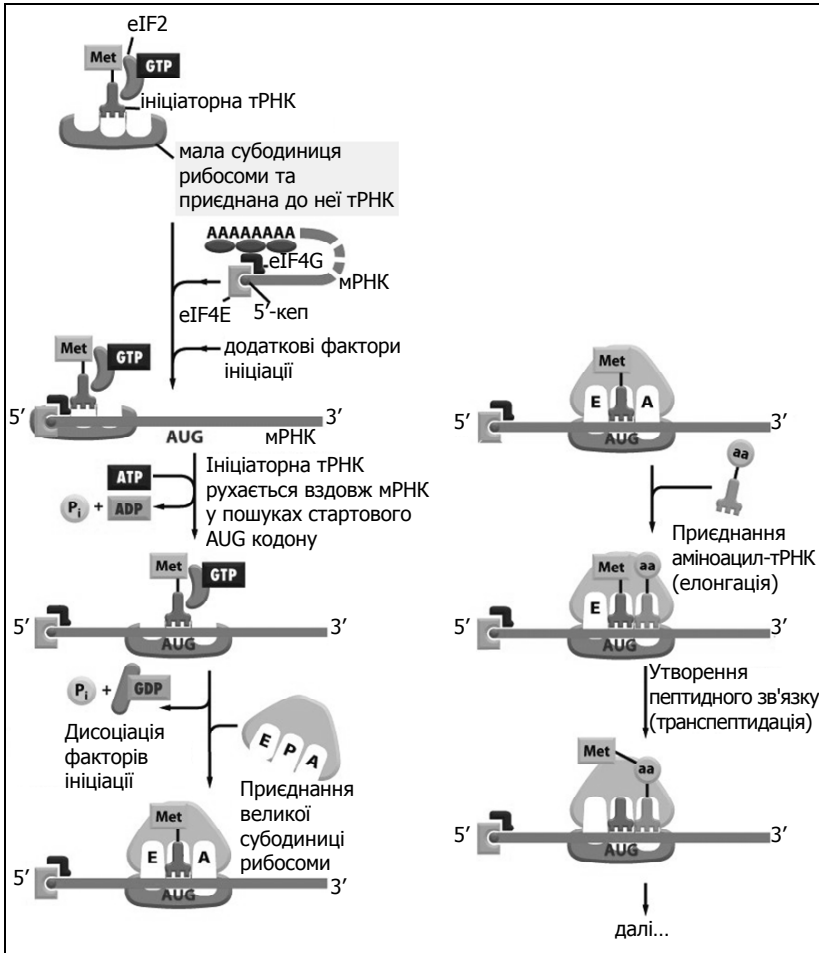


Рис. 9.9. Схема ініціації трансляції в еукаріотів
(за Албертсом Б., Джонсоном А.,
Льюїсом Дж. та ін., 2013)

Серед усіх комплексів аміноацил-тРНК, тільки метіонін-тРНК здатна зв'язуватися з малою субодиноцею рибосоми ще до утворення цільної рибосоми – вона приєднується до Р-сайту. Потім мала субодиноця рибосоми приєднується до 5'-кінця мРНК, яку розпізнає за кепом (7-метилгуанін та полі-А хвіст) і двома прикріпленими до нього факторами ініціації (eIF4E та eIF4G). Після цього мала субодиноця рухається по мРНК у напрямку 3'-кінця в пошуку стартового AUG-кодону. Допомагають малій субодиноці просуватися інші фактори ініціації (цей транспорт є АТФ-залежним). Коли мала субодиноця знаходить AUG-кодон, фактори ініціації дисоціюють, дозволяючи великій субодиноці приєднатися до комплексу, завершуючи таким чином збирання рибосоми. Ініціаторна тРНК все ще так само зв'язана з Р-сайтом, А-сайт залишається вільний (рис. 9.9). Отже, синтез білка готовий до запуску.

На відміну від еукаріотичної, прокаріотична рибосома здатна легко збиратися прямо на стартових кодонах за умови, що *сайти посадки рибосоми* (RBS, *ribosome-binding site*) передують йому на відстані декілька нуклеотидів. Ці ділянки містять, поперше, ініціаторний AUG, а по-друге, послідовність Шайна – Дальгарно, із якою комплементарно зв'язується рибосома 16S рРНК. Процеси з'єднання малої субодиноці рибосоми з мРНК та просування по ній знаходяться під контролем прокаріотичних факторів ініціації.

ЕЛОНГАЦІЯ ТРАНСЛЯЦІЇ

Елонгація – циклічний процес, який можна розділити на три етапи.

Перший етап – приєднання т-РНК до А-ділянки. Після того, як ініціаторна аміноацил-тРНК зв'язалася з Р-сайтом рибосоми та відбулося збирання рибосоми, до А-сайту підходить тРНК, що несе наступну амінокислоту для ланцюга. При цьому кодон на мРНК спарюється за принципом комплементарності з антикодоном на тРНК. Кодозалежне зв'язування аміноацил-тРНК відбувається за участю ГТФ і забезпечується білками, які називаються

ваються **факторами елонгації** (наприклад, EF1a – в еукаріотів, EF-Tu – у прокаріотів). Отже, Р-сайт зайнятий ініціаторною тРНК (що несе метіонін), а А-сайт – тРНК з наступною амінокислою (рис. 9.10).

Другий етап – **транспептидація** – утворення пептидного зв'язку. Відбувається перенос метіоніну з метіонін-тРНК (з Р-сайту) на другу аміоацил-тРНК (в А-сайті) з утворенням пептидного зв'язку між метіоніном та другою амінокислою (рис. 9.10). При цьому вже активована COOH-група метіоніну зв'язується з вільною NH₂-групою другої амінокислоти (рис. 9.5). Таким чином, поліпептидний ланцюг збільшується на одну амінокислоту. Джерелом енергії слугує макроергічний зв'язок між амінокислою та тРНК. Каталізує цю реакцію фермент **пептидилтрансфераза**, що входить до складу великої субодиниці рибосоми.

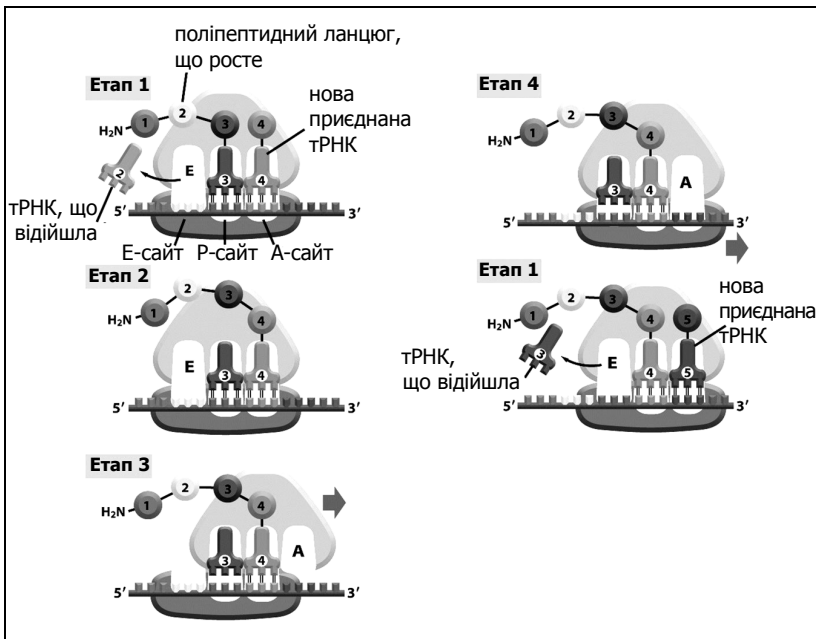


Рис. 9.10. Схема трансляції молекули мРНК
(за Албертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Дж. та ін., 2013)

Третій етап – **транслокація** – переміщення рибосоми по мРНК на один триплет. При цьому спочатку пересувається велика субодиноця відносно мРНК, яка утримується малою субодиноцею, а пізніше мала субодиноця з мРНК пересуваються на три нуклеотиди (рис. 9.10). У результаті пептидил-тРНК знову опиняється в Р-сайті, а "порожня" тРНК із Р-сайту переходить в Е-сайт, звідки вона вивільнюється в цитозоль. Цей етап потребує затрат енергії й супроводжується гідролізом ГТФ. По завершенні цього етапу незайнята А-ділянка може прийняти нову аміноацил-тРНК і цикл може повторитися знов.

ТЕРМІНАЦІЯ ТРАНСЛЯЦІЇ

Завершення процесу біосинтезу білка, або **термінація** трансляції, відбувається тоді, коли рибосома досягає одного із трьох **термінуючих**, або **стоп-кодонів** (УАА, УАГ, УГА).

Особливі цитоплазматичні білки, які називаються **факторами вивільнення**, або **факторами термінації** (наприклад, у прокаріотів – RF₁, RF₂, RF₃; в еукаріотів – eRF), безпосередньо зв'язуються зі стоп-кодомом, що досяг А-ділянки рибосоми. Ці білки взаємодіють з рибосомою та викликають гідроліз зв'язку між тРНК і пептидом молекули пептидил-тРНК у Р-ділянці. Ці процеси також потребують енергії ГТФ.

Після вивільнення новосинтезованого пептиду від рибосоми відокремлюються і фактори термінації. Потім від неї за допомогою спеціального фактора відщеплюється також деацильована тРНК. Вільна рибосома розпадається на дві субодиноці.

ПОЛІРИБОСОМИ

Синтез поліпептиду проходить досить швидко. Один цикл елонгації триває лише близько 1/20 с, а синтез одного поліпептиду продовжується від 20 до 560 с. Проте навіть поки відбувається цей короткий процес, на одній молекулі мРНК може запу-

скатись синтез кількох поліпептидів. У результаті утворюється **полісома** (полірибосома) – структура, яка складається з декількох рибосом, з'єднаних з однією молекулою мРНК (рис. 9.11). Середня відстань між рибосомами в полісомі становить близько 80 нуклеотидів.

Формування полісом дозволяє клітині продукувати набагато більше білка за той самий час, якби б синтез наступного відбувався тільки після завершення попереднього. Сприяє появі полірибосом те, що в мРНК еукаріотів її 3'- та 5'-кінці взаємодіють один з одним, і тому, як тільки рибосома дисоціює, дві її субодиниці, знаходячись в оптимальному положенні, здатні знову зібратись на тій самій мРНК.

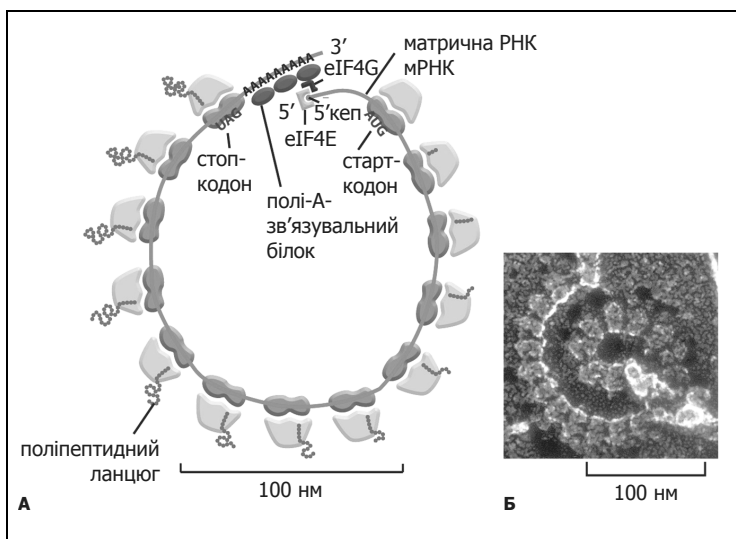


Рис. 9.11. Полірибосома. А – Схема, на якій показано, як велика кількість рибосом може здійснювати синтез на одній мРНК еукаріотів.
 Б – електронна мікрофотографія полірибосоми еукаріотів
 (за Албертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Дж. та ін., 2013)

ДОЗРІВАННЯ БІЛКІВ

ФОЛДИНГ

Фолдингом називається процес набуття синтезованим поліпептидним ланцюгом визначеної робочої конформації. У довгому поліпептидному ланцюзі можливе вільне обертання атомів навколо багатьох зв'язків, унаслідок чого остов молекули є надзвичайно гнучким. Тому білкова молекула потенційно може набувати величезної кількості просторово впорядкованих форм (конформацій). Однак більшість поліпептидних ланцюгів існують лише в одній конформації, яка врешті-решт визначається послідовністю амінокислот у поліпептиді. Це зумовлено тим, що бічні групи амінокислот взаємодіють одна з одною та з водою з утворенням слабких нековалентних зв'язків. При цьому амінокислоти з полярними бічними групами розташовуються на периферії білка, тоді як амінокислоти з гідрофобними властивостями займають положення в центрі білкової глобули (рис. 9.12).

Фолдинг білків, які синтезуються на вільних рибосомах (полісомах), здійснюється в цитозолі. Складніше (і якісно інакше) відбувається цей процес у білків, синтезованих на грЕПС (про що детальніше йтиметься в розділі "Вакуолярна система").

Загалом процес фолдингу білків має наступний перебіг. Спочатку білок набуває вторинної структури, яка, нагадаємо, формується за рахунок водневих зв'язків між NH- і CO-групами різних амінокислотних залишків у складі поліпептидного ланцюга. Вторинна структура може бути представлена *α-спіраллю* або *β-складчастою структурою*. У випадку *α-спіралі* остов поліпептидного ланцюга закручується у спіраль, а радикали амінокислот повернуті назовні. Стабілізується *α-спіраль* водневими зв'язками між NH-групою одного амінокислотного залишку та CO-групою іншого такого залишку, відділеного від першого трьома амінокислотними залишками, тобто водневі зв'язки формуються між 1 і 4, 2 і 5, 3 і 6 і т. д. амінокислотними залишками. У випадку *β-складчастої* структури остов поліпептидного ланцюга має зигзагоподібну конфігурацію. Стабілізується ця стру-

ктура також водневими зв'язками між NH- і CO-групами амінокислотних залишків. Далі формується третинна структура білка. Під останньою розуміють просторову укладку α -спіральных, β -складчастих і безструктурних ділянок поліпептидного ланцюга. Третинна структура білка формується за рахунок утворення різного виду зв'язків між радикалами амінокислотних залишків. Це можуть бути *дисульфідні* зв'язки між SH-групами залишків цистеїну, *іонні* та *водневі* – між полярними радикалами амінокислотних залишків, *гідрофобні* й *вандерваальсові* – між неполярними радикалами амінокислотних залишків. Якщо білок складається з декількох субодиниць, то вони після набуття правильної вторинної та третинної структури об'єднуються між собою і формують четвертинну структуру білка.

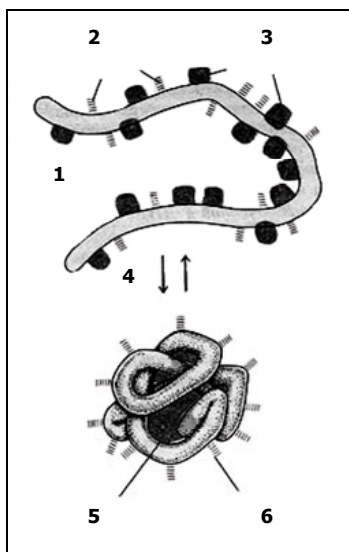


Рис. 9.12. Схема згортання білка у глобулу: полярні бічні групи амінокислот прагнуть розміститися на зовнішній поверхні білка, де вони можуть взаємодіяти з водою; неполярні розташовані всередині, де утворюють "заховане" від води гідрофобне "ядро". 1 – не згорнутий поліпептид; 2 – полярні бічні групи; 3 – неполярні бічні групи; 4 – згорнута конформація у водному середовищі; 5 – гідрофобна ділянка серцевини містить неполярні бічні групи; 6 – полярні бічні групи можуть утворювати водневі зв'язки
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Левісом Дж. та ін., 2002)

Набувати правильної вторинної, третинної та четвертинної структури самостійно можуть лише невеликі білки, а для фолдингу більших потрібні спеціальні білки: *шаперони* й ферменти *фолдази*. Фолдазою є, наприклад, пептидилдисульфідізомераза в ЕПС. Цей фермент каталізує переміщення дисульфідних зв'язків у білках. Без пептидилдисульфідізомерази дисульфідні зв'язки можуть утворитися не між тими залишками цистеїну, що потрібно. Так, фермент рибонуклеаза має вісім залишків цистеїну – у 26, 40, 58, 65, 72, 84, 95 і 110 положеннях. Правильна й найбільш енергетично вигідна третинна структура цього ферменту сформується лише у випадку, якщо дисульфідні зв'язки утворюються між залишками цистеїну у 26 і 84, 40 і 95, 58 і 110 та 65 і 72 положеннях. У всіх інших випадках (а це ще 104 комбінації!) цей білок набуде такої третинної структури, яка зробить його функціонально неактивним. Навіть якщо така неправильна третинна структура й буде менш енергетично вигідною, то білок все одно не зможе її змінити, оскільки для розриву дисульфідного зв'язку, який є ковалентним, потрібно багато енергії. Фолдаза пептидилдисульфідізомераза лабілізує утворені дисульфідні зв'язки, роблячи їх доступними для самостійного розриву, і білок отримує можливість шляхом випадкового перебору знайти таку комбінацію дисульфідних зв'язків, яка відповідає найбільш енергетично вигідній просторовій структурі.

Шаперони відрізняються від фолдаз тим, що вони не каталізують ніяких реакцій, а дозволяють поліпептиду швидко перебрати велику кількість конформацій і зупинитися на найбільш енергетично вигідній. Шаперонову активність виявляють декілька груп білків. Це, наприклад, білки теплового шоку в цитозолі та білок ВіР у цистернах ЕПС.

Підкреслимо, що шаперони виконують декілька функцій. По-перше, вони запобігають утворенню неправильних взаємодій між новосинтезованими поліпептидними ланцюгами або частинами одного ланцюга. По-друге, якщо такі неправильні слабкі зв'язки все ж утворились, то шаперони лабілізують ці зв'язки. По-третє, вони контролюють рефолдинг білків.

Рефолдинг, або *ренатурація*, білка називається процес відновлення правильної вторинної, третинної та четвертинної структури білка, яка була порушена під час дії тих чи інших денатуруючих агентів (підвищеної температури, опромінення, певних хімічних сполук).

При обробці певними агентами та дії деяких фізичних впливів (скажімо, підвищення температури) білок може втратити визначену конформацію, розгорнутися (денатурувати). По закінченні дії денатуруючого агента білок може відновити вихідну конформацію як самостійно, так і за допомогою шаперонів, білків теплового шоку.

ПОСТТРАНСЛЯЦІЙНІ МОДИФІКАЦІЇ БІЛКА

Більшість білкових молекул у клітині перебувають у модифікованому стані. На сьогодні описано понад 100 ковалентних модифікацій, яких зазнають білки в цитозолі. Це найрізноманітніші форми метилування, ацетилювання, аденілування, уридинування, приєднання коферментів тощо. Ці модифікації носять, як правило, оборотний характер, що робить їх надзвичайно цінними для регуляції метаболічних процесів у клітині. Одні посттрансляційні модифікації регулюють функціональну активність білків (наприклад, фосфорилування і дефосфорилування), інші – необхідні для набуття ферментом функціональної активності (скажімо, приєднання коферментів). Є посттрансляційні модифікації, потрібні для доставки білків за місцем призначення. Прикладом останньої може бути приєднання до білка жирної кислоти. Ця кислота в подальшому вбудовується у ліпідний бішар мембрани із цитозольного боку і в такий спосіб приєднує білок до мембрани.

Але найпоширенішим типом ковалентних модифікацій білків у цитозолі є фосфорилування ОН-груп бічних ланцюгів серину, треоніну і тирозину в білку. За існуючими оцінками, у тваринних клітинах цим способом модифікується близько 10 % білків цито-

золю. Зрідка в цитозолі зустрічається і глікозилювання. У незначній кількості цитоплазматичних білків до бічної ОН-групи серину або треоніну приєднується N-ацетилглюкозамін.

ТЕРМІН ЖИТТЯ БІЛКОВОЇ МОЛЕКУЛИ

Кожна молекула білка існує в клітині певний час, після чого вона піддається протеолізу, тобто розщеплюється на амінокислоти. Цей механізм захищає клітину від старих білкових молекул, які за час свого довгого життя можуть зазнавати помилкових модифікацій, що змінюють їхню активність. Також це є засобом більш тонкої регуляції у відповідь на швидко зміну умов навколишнього середовища, що робить необхідним постійну зміну складу білкового пулу в клітині. Крім того, процеси протеолізу мають захистити клітину від мутантних, помилково синтезованих білків і білків, які не потрапили вчасно в компартмент, де вони функціонують у нормі (наприклад, в ендоплазматичну сітку).

Існують декілька механізмів знищення старих білків. Для одного з них має значення перша амінокислота в білковій послідовності. Так, амінокислоти Met, Ser, Thr, Ala, Val, Cys, Gly і Pro, які займають перше положення на N-кінці поліпептиду, стабілізують його і захищають від негайної протеолітичної атаки. Решта амінокислот викликають швидкий протеоліз білка. "Дестабілізуючі" амінокислоти практично ніколи не займають перше положення в білках цитозолу, проте часто зустрічаються на N-кінці білків, що функціонують в інших компартментах (скажімо, в ендоплазматичній сітці). Унаслідок цього поліпептид, який помилково не був відправлений до ЕПС, не буде функціонувати в цитозолі, а розпадеться через невеликий проміжок часу.

Усі білки одразу після синтезу несуть на N-кінці стабілізуючу амінокислоту *метіонін*, який майже зразу видаляється специфічним ферментом. Замість нього іншим ферментом до N-кінця білка може бути приєднана "дестабілізуюча" амінокислота. У цьому разі також буде утворений білок з малим терміном існування.

В еукаріотів має місце **убіквітинозалежний протеоліз**. При такому протеолізі з білком, що підлягає руйнуванню, зв'язується велика кількість копій невеликого білка **убіквітину (ubiquitin)**. При цьому убіквітин приєднується до тих білків, що на N-кінці несуть "дестабілізуючу" амінокислоту. До першої молекули убіквітину згодом приєднується друга, третя і так далі, поки не утворюється великий розгалужений ланцюг. Він розпізнається убіквітинозалежною протеазою, яка розщеплює білок і вивільняє окремі молекули убіквітину.

Убіквітин у першу чергу приєднується до денатурованих, аномально згорнутих білків, а також тих, що містять окиснені чи інші аномальні амінокислоти, навіть якщо на N-кінці у них є "стабілізуюча" амінокислота. Протеоліз денатурованих білків починається з розпізнавання гідрофобних амінокислот, які в нормі мають розташовуватися всередині глобули, тоді як у неправильно згорнутому поліпептиді вони можуть опинитися на поверхні глобули. Після цього від пошкодженої білкової молекули відщеплюється N-кінцевий фрагмент для того, щоб білок починався саме з "дестабілізуючої" амінокислоти. Далі поліпептид руйнується завдяки убіквітинозалежному механізму, як було описано вище.

Під час синтезу поліпептиду на рибосомі він захищений від протеолізу апаратом трансляції. Також захист від протеолізу забезпечує ацетилювання N-кінцевої амінокислоти. У такий спосіб захищені, наприклад, білки-гістони, що, як правило, містяться в ядрі клітини, однак під час її поділу потрапляють до цитозолу. Кожен із гістонів несе на собі одну молекулу убіквітину, проте не зазнає передчасного протеолізу.

Запитання для самоперевірки

1. Які типи РНК ви знаєте та які функції вони виконують?
2. Порівняйте структуру тРНК та мРНК.
3. Властивості генетичного коду.
4. Скільки нуклеотидів кодують білок, що складається з 51 амінокислотних залишків?
5. Де відбувається синтез білків "хатнього" господарства?
6. Де відбувається синтез експортних білків?
7. Де відбувається синтез білків плазмолемі?

8. Як відбувається ініціація біосинтезу білка?
9. Що необхідно для ініціації біосинтезу білка?
10. Що відбувається на стадії елонгації в процесі біосинтезу білка?
11. Що потрібно для елонгації біосинтезу білка?
12. Як відбувається термінація біосинтезу білка?
13. Що необхідно для термінації біосинтезу білка?
14. Як відбувається зв'язок амінокислот у поліпептидному ланцюзі?
15. Що таке полірибосома?
16. Що таке фолдинг білка?
17. Які посттрансляційні модифікації білків вам відомі?
18. Яка функція шаперонів?
19. Яка функція фолдаз?
20. Яка функція убіквітину?
21. Як визначається термін життя білкової молекули?

Рекомендована література

Загальна цитологія і гістологія : підручник / М. Е. Дзержинський, Н. В. Скрипник, Г. В. Островська та ін. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2010.

Зенгбуш П. Молекулярная и клеточная биология / П. Зенгбуш. – М. : Наука, 1982.

Клетки / под ред. Б. Льюина и др. ; пер. с англ. – М. : БИНОМ, Лаборатория знаний, 2011.

Мушкамбаров Н. Н. Молекулярная биология. / Н. Н. Мушкамбаров, С. Л. Кузнецов. – М. : Мединформагентство, 2003.

Сиволоб А. В. Молекулярна біологія / А. В. Сиволоб. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2008.

Фаллер Дж. Молекулярная биология клетки / Дж. Фаллер, Д. Шилдс. – М. : – Бином-пресс, 2004.

Ченцов Ю. С. Введение в клеточную биологию. / Ю. С. Ченцов. – М. : ИКЦ "Академкнига", 2004.

Cooper G. M. The cell: a molecular approach / G. M Cooper. – N. Y., 2000.
Molecular Biology of the Cell / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis et al. – N. Y., 2013.

Molecular cell biology / H. Lodish, A. Berk, A. Kaiser et al. – N. Y., 2013.

Розділ 10

ВАКУОЛЯРНА СИСТЕМА

Вакуолярною системою називають систему одномембранних органел, які виконують загальну функцію синтезу, модифікації, сортування та виведення із клітини біополімерів (як правило, глікопротеїнів), а також функцію синтезу й формування складових мембран цієї системи, плазмолемі та інших клітинних мембран.

До вакуолярної системи належать гладенька і гранулярна ендоплазматична сітка, апарат Гольджі, різні типи лізосом, екзоцитозних пухирців, секреторних гранул тощо.

ЕНДОПЛАЗМАТИЧНА СІТКА

Ендоплазматична сітка (ЕПС, ендоплазматичний ретикулум, ЕР) є типовою органелою всіх еукаріотичних організмів. Ця органела має звивисту мембрану, що може становити більше половини всіх клітинних мембран. При цьому вона утворює безперервну поверхню, що оточує єдиний внутрішній простір органели. Порожни- на ЕПС може займати до 10 % загального об'єму клітини. ЕПС – це набір витягнутих і сплюснених цистерн, що оточують ядро й зливаються із зовнішньою мембраною його оболонки.

Ендоплазматична сітка поділяється на два субкомпартменти – дві функціонально та морфологічно відмінні частини, які іноді розглядають як дві окремі органели. Це *гладенька*, або *агранулярна*, ЕПС (глЕПС, або аЕПС) і *гранулярна*, або *шорстка*, ЕПС (грЕПС, або шЕПС), що містить на своїй поверхні рибосоми (рис. 10.1). Хоча цистерни гладенької та гранулярної сітки безпосередньо сполучаються одна з одною, мембранні білки, які забезпечують функціональні особливості обох видів ЕПС, утримуються в межах своїх субкомпартментів.

Крім того, виділяють ще *проміжний* ретикулум, який за своїми властивостями подібний до гранулярного, але не містить на своїй поверхні рибосом. Саме від нього відокремлюються мембранні мікропухирці, котрі переносять мембранний "матеріал" і глікопротеїни до апарату Гольджі.

ГЛАДЕНЬКА ЕНДОПЛАЗМАТИЧНА СІТКА

Цистерни глЕПС дрібніші, вони не утворюють широких сплоснених структур. глЕПС нагадує ажурну сіточку, сплетену з тендітних трубочок, які перебувають у стані постійного руху, зміни (рис. 10.1). Гладенька ендоплазматична сітка не несе на своїй поверхні зв'язаних рибосом і білків, здатних забезпечувати таке зв'язування. Основними функціями глЕПС є синтез ліпідів і олігосахаридів, участь у процесах детоксикації, депонування іонів кальцію. Також глЕПС може відігравати роль донора мембран для аутофаголізосом у процесах аутофагії в клітинах, які детальніше будуть описані нижче.

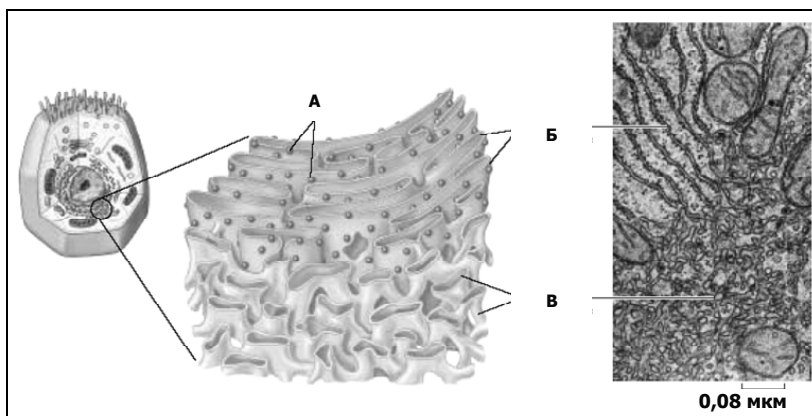


Рис. 10.1. Эндоплазматична сітка. А – рибосоми на мембранах гранулярної ендоплазматичної сітки; Б – гранулярна ендоплазматична сітка; В – гладенька ендоплазматична сітка
(за Равеном П., Джонсоном Г., Сінгером С. та ін., 2005)

Синтез ліпідів

У мембрані глЕПС утворюються майже всі ліпіди, необхідні для побудови мембран клітини, включаючи фосфоліпіди (процес їхнього синтезу отримав назву **цикл Кеннеді**) й холестерол. Основним фосфоліпідом, який синтезується на глЕПС, є фосфатидилхолін.

Фосфатидилхолін утворюється з двох жирних кислот – гліцерофосфату й холіну в три етапи на цитозольному боці мембрани (Р-поверхні). На першому етапі фермент *ацилтрансфераза* додає до гліцерофосфату дві жирні кислоти, у результаті утворюється *фосфатидилова кислота*, яка занурюється залишками жирних кислот у біліпідний шар. Унаслідок цього відбувається збільшення розмірів бішару. На наступних етапах формується полярна "головка" ліпиду. Подібним чином утворюються й інші фосфоліпіди.

Деякі ліпідні молекули потребують особливих перетворень, що не відбуваються у глЕПС, проте здійснюються на мітохондріальних мембранах. Так, *фосфатидилетаноламін* може утворитися з *фосфатидилсерину* шляхом декарбоксілювання полярної "головки" лише там. Фосфатидилсерин для цього процесу виробляє окремий субкомпартмент глЕПС, що носить назву **мембрани, пов'язаної з мітохондрією**. Ця ділянка глЕПС розташовується поруч з мітохондрією і має характерну пласку поверхню, що тісно контактує з оргanelюю.

Також на мембранах глЕПС та мітохондрій проходять процеси синтезу і модифікації *стероїдів*. На глЕПС розташовані ключові медіатори їхнього біосинтезу – трансмембранні **білки, що зв'язуються з регуляторним стеринреспонсивним елементом (SREBP)**.

Також на ЕПС знаходиться **білок, що активує розрізання SREBP (SCAP)**, він контролює рівень внутрішньоклітинного *холестеролу*. Якщо цей рівень недостатній, SCAP транспортує SREBP із ЕПС до апарату Гольджі, де відбувається розрізання SREBP. N-кінцева ділянка молекули виводиться до цитозолу, мігрує до ядра й діє там як фактор транскрипції, що активує експресію генів у каскаді реакцій біосинтезу холестеролу.

Мітохондрії (так само, як пероксисоми) не пов'язані з ЕПС системами мембранного транспорту, а тому не можуть отримати ліпіди з мікропухирцями. Ліпіди їм доставляють специфічні білки-переносники, які здатні екстрагувати ліпід із бішару однієї органели, перенести його до іншої та вивільнити його там (рис. 10.2). Розчинні білки-переносники фосфоліпідів можуть перерозподіляти фосфоліпіди між мембранними органелами. Перенесення фосфатидилхоліну з ЕПС до мітохондрій загалом може відбуватись спонтанно, оскільки його концентрація в мембрані ЕПС (де він синтезується) висока, а в зовнішній митохондріальній мембрані – низька. Завдяки подібній системі кооперації органел митохондрія отримує всі необхідні їй ліпіди, а органели вакуолярної системи – фосфатидилетаноламін.

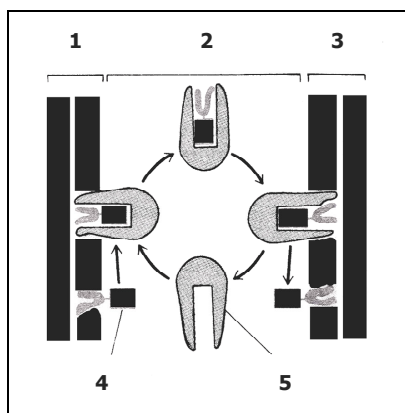


Рис. 10.2. Схема транспорту мітохондріальних ліпідів:
 1 – мембрана ЕПС; 2 – цитозоль; 3 – зовнішня мембрана мітохондрії;
 4 – головна група фосфатидилхоліну; 5 – білок, що обмінює фосфоліпіди
 (за Альбертсом Б., Джонсоном А., Левісом Дж. та ін., 2002)

Ліпіди, як уже зазначалося, формуються на цитоплазматичному боці мембрани ЕПС. Перенесення новосинтезованих молекул ліпідів на внутрішній бік її мембрани має відбуватись завдяки процесу, відомому як *фліп-флоп-перехід*. Цей процес час від часу відбувається в мембрані спонтанно, проте частота подібного спонтанного

переходу дуже низька. У мембрані глЕПС цей процес здійснюється зі швидкістю у 100 000 разів більшою, ніж можна очікувати при його спонтанному перебігу.

Імовірно, у глЕПС є специфічний транслокатор фосфоліпідів (*фліпаза*), що переносить *холіновмісні* фосфоліпіди (але не етаноламіно-, серино- чи інозитоловмісні) з однієї половини бішару в іншу. Саме цей транслокатор відповідає за асиметричне розташування фосфоліпідів у бішарі. Крім того, у глЕПС синтезується *церамід* – попередник сфінгомієліну та глікосфінголіпідів, які утворюються з нього вже в апараті Гольджі.

Синтез вуглеводів

глЕПС безпосередньо бере участь у метаболізмі вуглеводів. Так, глікоген відкладається в ділянках, вільних від цистерн грЕПС, проте збагачених каналцями глЕПС. Іншою функцією глЕПС є синтез *олігосахаридів* – попередників бічних глікозильних груп глікопротеїнів. Цей процес відбувається за участю великого гідрофобного ліпиду – *доліхолу* (мінорний ліпід із групи ізопреноїдів), який спочатку приєднує два залишки N-ацетилглюкозаміну та п'ять залишків манози на Р-поверхні мембрани ЕПС, а потім переходить на Е-поверхню (внутрішню) (рис. 10.3) за допомогою неідентифікованої *фліпази*.

Доліхол є досить гідрофобною молекулою, тому фліп-флоп-перехід здійснюється в цьому разі досить просто. Уже всередині цистерни ЕПС відбувається добудова олігосахариду: додаються чотири додаткових залишки манози, що призводить до утворення трьох відгалужень. Потім до однієї з трьох манозних гілок додаються три залишки глюкози, унаслідок чого буде утворено молекулу, що стане джерелом вуглеводів при глікозилуванні білків у цистернах грЕПС (цей процес буде описано нижче).

Детоксикація

Гладенька ЕПС бере участь у процесі детоксикації (разом із пероксисомами та мітохондріями). Одним із ферментів глЕПС, що каталізує реакції детоксикації (при барбітуратних отруєннях, прийманні деяких фармакологічних препаратів тощо) є *цито-*

хром р450. Цей білок використовує високоенергетичні електрони, отримані від NADPH для приднання гідроксильних груп до шкідливих водонерозчинних вуглеводів, які потрапляють до бішару.

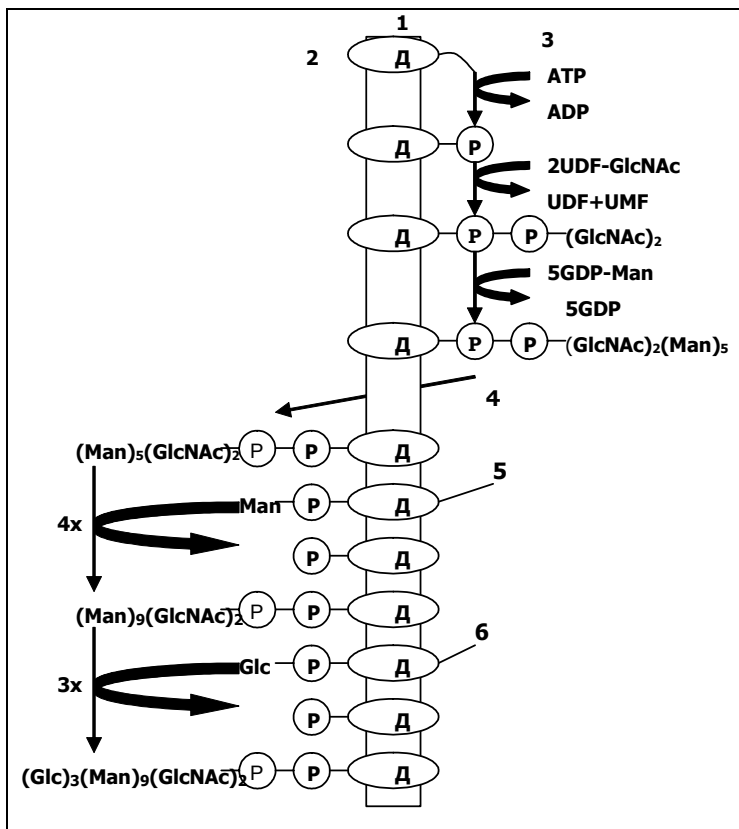


Рис. 10.3. Синтез ліпідв'язаного олігосахариду, що переноситься до залишків аспарагіну на внутрішньому боці мембрани ЕС:
 GlcNAc – N-ацетилглюкозамін, Man – маноза, Glc – глюкоза,
 ATP – АТФ, ADP – АДФ, GDP – ГТФ, UDP – УДФ, UMP – УМФ, Д-доліхол,
 Р – фосфат, 1 – ліпідний бішар мембрани ЕПС, 2 – провіт ЕПС,
 3 – цитозоль, 4 – "перескакування в мембрані", 5 – донор манози,
 що складається із фосфату доліхолу та ГТФ-манози, 6 – донор глюкози,
 який складається із фосфату доліхолу та УДФ-глюкози

Потім до цих гідроксильних груп додаються залишки сульфатів чи глюкуронової кислоти, у результаті чого токсична молекула стає водорозчинною й може залишити клітину і згодом виділитися із сечею. У випадку гострої детоксикації об'єм глЕПС може збільшуватися в декілька разів, по закінченні ж цих процесів зайва кількість глЕПС знищується за допомогою аутофагосом.

Цитохром р450 індукується етанолом та іншими спиртами, а також ліками, такими як, наприклад, згаданими вище барбітуратами. При зловживання цими речовинами р450 набуває більшого значення в метаболізмі цих речовин, їхній детоксикації. Так, окиснення етанолу відбувається за участю ізоформи Р450 II E₁, кількість якої при хронічному алкоголізмі зростає паралельно з гіпертрофією глЕПС.

Також р450 може каталізувати утворення *активних форм кисню* і брати участь у *метаболізмі пероксиду водню*. Іншими органелами, які забезпечують процес детоксикації є мітохондрії та пероксисоми. У клітинах, спеціалізованих на детоксикації, ці органели часто розташовані поруч.

Депонування кальцію

Ще однією функцією глЕПС є депонування іонів кальцію. У цитозолі їхня концентрація знаходиться в межах 10^{-8} – 10^{-7} моль/л. У міжмембранному просторі вона досягає 10^{-3} моль/л. Особливого розвитку ця функція набуває у м'язових клітинах, де глЕПС перетворюється на *саркоплазматичну сітку* (чи *ретікулум*). Основна функція цього спеціалізованого варіанта глЕПС – "захоплення" із цитозолу, депонування та швидке вивільнення під час м'язового скорочення іонів Ca^{2+} .

Іони Ca^{2+} у цистернах глЕПС перебуває у зв'язаному стані. Їх зв'язує кальційзв'язувальний білок *кальрегулін* (або *каль-ретікулін*) – глікопротеїн з молекулярною масою 7 кД, що здатний депонувати до 20 моль Ca^{2+} на моль білка. Він має два домени зв'язування кальцію: *високоафінний*, котрий може зв'язувати кальцій навіть за його дуже низьких концентрацій, та домен з *високою ємністю*, що зв'язує декілька іонів Ca^{2+} одночасно. Крім того, цей білок виконує функцію глікопротеїнового шаперона.

У скелетних м'язах виявлені й інші кальційзв'язувальні білки. Один із них, **кальсеквестрин** (2 кД) – кислий розчинний білок (40 % у ньому припадає на залишки глутамінової та аспарагінової кислот). Одна його молекула здатна зв'язувати 43 іони Ca^{2+} з помірною спорідненістю. Кальсеквестрин локалізований у термінальних цистернах саркоплазматичного ретикулума, де становить до 20 % усіх білків і є, як вважають, основним кальційзв'язувальним білком у цій органелі. Він розташований у безпосередній близькості від ріанодинчутливого кальцієвого каналу, що сприяє прискоренню вивільнення іонів Ca^{2+} при скороченні м'язів. З іншого боку, кальсеквестрин усередині термінальних цистерн зв'язує більшу частину кальцію, що надходить в них при роботі кальцієвої АТФази.

До інших білків, що у великій кількості присутні у міжмембранному просторі ЕПС, належать ViP , Grp94 , ERp72 , протеїндисульфідізомераза та кальнексин, які також можуть зв'язувати кальцій і сприяти його накопиченню у клітині. Подібно до кальсеквестрину ці білки мають численні сайти зв'язування з низькою спорідненістю до іонів Ca^{2+} . Оскільки ЕПС виконує функцію кальцієвого депо, для активації цих шаперонів необхідні іони кальцію. Так, шаперонова дія ViP , кальнексину та кальретикуліну відчутно знижується при виснаженні кальцієвих депо ЕПС.

Слід зауважити, що великі обсяги іонів Ca^{2+} депонуються і в мітохондріях, у матриксі яких виявлено електроннощільні гранули діаметром 20–50 нм, які послуговуються місцем акумуляції двовалентних іонів. Збільшення розміру, щільності й числа цих гранул виявлено не лише при обробці тканин високими концентраціями іонів Ca^{2+} , але й в інтактних клітинах тих тканин, які залучені до активного транспорту кальцію – остеокластів, остеобластів тощо. Аналогічна ситуація виявлена і при гормонально-обумовленій гіперкальціємії – кальцинозі.

Хоча кількості кальцію в мітохондрії навіть більші за ті, що містяться в ЕПС, однак лише глЕПС може швидко звільняти й так само швидко "захоплювати" з цитозоллю його у великих об'ємах. Ці функції забезпечують селективні кальцієві канали та Ca^{2+} -АТФази відповідно.

ГРАНУЛЯРНА ЕНДОПЛАЗМАТИЧНА СІТКА

ГрЕПС є другою складовою частиною ЕПС. Її цистерни, як правило, містять на своїй поверхні рибосоми, що активно синтезують білки, які під час трансляції надходять до порожнини цистерн ендоплазматичної сітки (рис. 10.1). Цистерни грЕПС, широкі й плоскі, лежать правильними стосами, при цьому відстань між окремими цистернами дещо більша, ніж товщина самих цистерн. У деяких випадках, коли на грЕПС іде інтенсивний білковий синтез, цистерни можуть розширюватися й навіть займати більшу частину цитоплазми клітини.

Гранулярна ЕПС може бути представлена в клітинах або у вигляді окремих розрізаних цистерн, або ж їхніми локальними скупченнями (*ергастоплазма*). Перший тип грЕПС характерний для недиференційованих клітин або клітин з низькою метаболічною активністю, тоді як ергастоплазма характерна для клітин, які активно синтезують секреторні білки. Так, у клітинах печінки грЕПС зібрана в окремі зони (тільця Берга), так само як у деяких нервових клітинах (тигроїд). У клітинах підшлункової залози ергастоплазма у вигляді щільно упакованих мембранних цистерн займає базальну й навколядерну ділянки клітини.

Головною функцією грЕПС є участь у біосинтезі білків, їхньому згортанні та глікозилюванні. На відміну від вільних рибосом цитозолу, які синтезують так звані білки "хатнього господарства", тобто білки для "власних" потреб клітини (білки мітохондрій, хлоропластів, ядра, пероксисом та власне цитозольні білки), рибосоми на грЕПС синтезують експортні білки, білки лізосом та інтегральні білки мембран (табл. 10.1).

Білки "хатнього господарства" транспортуються із цитозолу "за призначенням" (або залишаються працювати як цитозольні) після закінчення свого синтезу на рибосомах. Однак для інших органел – ЕПС, апарату Гольджі, лізосом (а також плазмолемі) – процес такого транспортування є більш складним. Транспорт білка через ці органели разом із самими органелами називають *секреторним шляхом*. Усі білки, що мають бути або секретованими, або виконувати свої функції у складі

мембран цих органел або плазмолемі, спочатку у процесі синтезу проходять через мембрану грЕПС. У цій органелі вони набувають нативної тривимірної конформації, модифікуються та утворюють комплекси з іншими білками. Потім ці комплекси потрапляють до апарату Гольджі, а звідти чи назад, до ЕПС, чи далі в лізосоми та плазмолему.

Переміщення білків між органелами секреторного шляху відбувається за участю дрібних пухирців, які відокремлюються від вихідної мембрани та зливаються з мембраною призначення.

Таблиця 10.1

Місця синтезу деяких груп білків

Група білків	Місце синтезу
Білки "хатнього господарства", у тому числі ферменти, гістони, негістонові білки, складові цитоскелета тощо	Вільні рибосоми в цитозолі
Мітохондріальні білки	Вільні рибосоми в цитозолі та власні рибосоми мітохондрій
Білки пероксисом	Вільні рибосоми в цитозолі
Заякорені й поверхневі білки Р-поверхні органел вакуолярної системи та Е-поверхні плазмолемі	" _ "
Заякорені й поверхневі білки Е-поверхні органел вакуолярної системи та Р-поверхні плазмолемі	Рибосоми на грЕПС
Інтегральні білки органел вакуолярної системи та плазмолемі	" _ "
Експортні білки й глікопротеїни, у тому числі гормони, антитіла, складові позаклітинної речовини тощо	" _ "

Усі білки, що повинні синтезуватися на мембранах грЕПС (як і білки "хатнього господарства", що синтезуються на цитозольних полісомах), починають свій синтез на вільних рибосомах у цитозолі. Проте досить швидко цей процес призупиняється, і рибосоми разом із мРНК і олігопептидом, що знаходиться у процесі синтезу (*насцентним*), переноситься до мембран грЕПС,

де трансляція продовжується. Цей процес називають **таргетингом (адресуванням)** білка. Найбільш розповсюдженою формою перенесення білка в ЕПС є **котрансляційне перенесення**. Ця транслокація відбувається під час синтезу білка на рибосомах. Однак деякі білки можуть переноситись через мембрану ЕПС уже після завершення трансляції в цитозолі (**посттрансляційне перенесення**). Різні клітини по різному використовують ці дві форми транслокації білків. У клітинах ссавців частіше має місце котрансляційне перенесення, а у простіших еукаріотів, зокрема у дріжджів, використовуються обидві форми.

Старт процесу котрансляційного перенесення пов'язаний з наявністю на початку поліпептиду, який має "закінчувати свій синтез" на зв'язаних із грЕПС рибосомах, так званої **сигнальної послідовності – N-кінцевого лідерного пептиду**, який складається з гідрофобних амінокислот. Цей сигнальний пептид розпізнається рибонуклеопротейиновою часткою – **СРЧ (частка, що розпізнає сигнал)**, або **SRP (signal-recognition particle)**.

СРЧ є складним комплексом із шести поліпептидних ланцюгів і молекули 7SL-РНК (рис. 10.4).

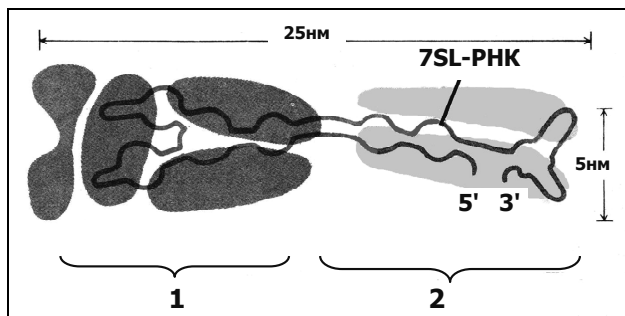


Рис. 10.4. Спрощена схема частки, що розпізнає сигнал:

- 1 – частина, що розпізнає сигнальний пептид;
 - 2 – частина, яка може зв'язуватися з А-ділянкою рибосоми
- (за Альбертсом Б., Джонсоном А., Левісом Дж. та ін., 2002)

Для впізнання сигнальної послідовності потрібна лише одна субодиниця СРЧ – SRP54. Ця субодиниця має три домени: два кінцевих (N та M) та проміжний (домен G), який є ГТФазою

(зв'язує і здійснює гідроліз ГТФ). М-домен, багатий на метіонін, забезпечує можливість безпосереднього зв'язування з сигнальною послідовністю. Він містить борозенкоподібну ділянку, вистелену залишками метіоніну, що робить її гідрофобною і дозволяє з'єднуватися з гідрофобними зонами у складі сигнальної послідовності. Дві інші субодиниці (SRP9 і SRP14), а також 7SL-РНК блокують елонгацію поліпептидного ланцюга (шляхом приєднання до рибосоми та безпосереднього впливу на фактор елонгації).

СРЧ приєднується своїми субодиницями до сигнальної послідовності й рибосоми та "пришвартовує" "біосинтетичний апарат" (рибосому з пептидом, що синтезується) до мембрани грЕПС. Це реалізується за рахунок її взаємодії з рецептором (білком, що специфічно зв'язується з СРЧ, його інколи називають *доковим* протеїном), розташованим на мембрані грЕПС.

Отже, однією із своїх субодиниць ще у цитозолі СРЧ зв'язується з N-сигнальною послідовністю, а іншою – з рибосомою поблизу А-ділянки. При цьому блокується "надходження" до А-ділянки нової аміноаліл-тРНК, і синтез білка тимчасово припиняється. Він відновлюється лише після зв'язування СРЧ з інтегральним білковим рецептором (**SR**), розташованим у мембрані цистерни грЕПС.

Рецептор є димером, що складається із двох субодиниць. Перша з них, α -субодиниця, орієнтована в бік до цитозолу (**SR α**) і взаємодіє із СРЧ, а друга (**SR β**) – вбудована в мембрану. Остання взаємодіє з α -субодиницею та фіксує її на мембрані грЕПС. Подібно до SRP54 обидві субодиниці рецептора містять домен, що забезпечують зв'язування та гідроліз ГТФ (тобто є ГТФазами). Для здійснення зв'язування СРЧ на мембрані грЕПС, необхідне скоординоване зв'язування та гідроліз ГТФ обома комплексами.

СРЧ, зв'язана із сигнальною послідовністю та рибосомою, з'єднується з SR, який, у свою чергу, взаємодіє із *транслоконом* – великим білковим комплексом, інтегрованим у мембрану грЕПС. Основу транслокону становлять три субодиниці (Sec61 α , Sec61 β , Sec61 γ), відповідальні за утворення каналу, по якому буде відбуватись перенесення синтезованого пептиду до цистерни ЕПС. До

цих субодиниць приєднується ще ряд функціонально важливих білків. Так, до складу активного транслокону входить *сигнальна пептидаза*, що здатна відщепляти згодом сигнальну послідовність від білка, що переноситься. Також у транслоконі міститься комплекс *олігосахаридтрансферази*, що ковалентно зв'язує олігосахариди та білкові ланцюги. Дві субодиниці цього комплексу – *рибофорин I* та *II* – беруть участь у фіксації великої субодиниці рибосоми на грЕПС. Крім того, у складі транслокону може бути *мембранний білок, асоційований з білком, який переноситься* (TRAM), що допомагає перенесенню деяких білків. Ще один білок, асоційований із транслоконом – TRAP, полегшує впізнання сигнальної послідовності білками каналу.

Процес зв'язування SRβ з ГТФ полегшується субодиницею каналу транслокону, який унаслідок цих структурних перебудов, зв'язується з комплексом СРЧ-рибосома. Конформаційні зміни, які виникають при цьому, призводять до "звільнення" рибосоми та насцентного поліпептидного ланцюга від СРЧ. Одразу після цього рибосома розміщується над входом у канал з боку цитозолу, безпосередньо взаємодіючи з каналними білками.

Тепер білок має пройти через ліпідний бішар мембрани грЕПС. При цьому стає можливим продовження трансляції. N-сигнальна послідовність "захоплюється" транслоконом і переноситься через мембрану, утворюючи структуру на зразок пеглі. N-кінець білкової молекули залишається з боку Р-поверхні мембрани. Після відновлення елонгації білкового ланцюга сигнальна послідовність впізнається Sec61a.

Функціонування транслокону забезпечується *воротним* механізмом: канал транслокону відкривається лише в момент перенесення насцентного білка. Сигнальна послідовність такого білка взаємодіє з каналними білками, викликаючи їхні конформаційні зміни і відкриття самого каналу, унаслідок чого запускається перенесення білкового ланцюга. Цей механізм також попереджає проходження через канал іонів та інших молекул, сприяючи підтриманню своєрідності "хімічної атмосфери" в люмені грЕПС. За відсутності насцентного білка канал залишається закритим, що також унеможливорює проникнення сторонніх молекул та іонів.

Інший важливий аспект сортування стосується відбору білків, що повністю проходять через мембрану від тих, що залишаються у її складі як трансмембранні. За це також відповідає сам транслокон, що має розпізнавати нові гідрофобні сигнальні послідовності у складі синтезованого поліпептиду. Деякі білки зазнають розщеплення (протеолізу) перед самим закінченням транслокації. Продукти розщеплення таких молекул ковалентно зв'язуються з фосфоліпідами мембрани грЕПС.

Транслокація *водорозчинного* білка відбувається наступним чином. Під час синтезу такий поліпептид, побудований (як правило) переважно з гідрофільних амінокислот, переноситься через ліпідний бішар і опиняється в просвіті грЕПС. Тепер лише N-сигнальна послідовність підтримує його зв'язок з мембраною. Якщо ця послідовність відрізається *сигнальною пептидазою*, то отриманий водорозчинний білок вільно пересувається всередині цистерни грЕПС і згодом буде виведений поза межі клітини. Тобто він є класичним *експортним* білком (рис. 10.5, А).

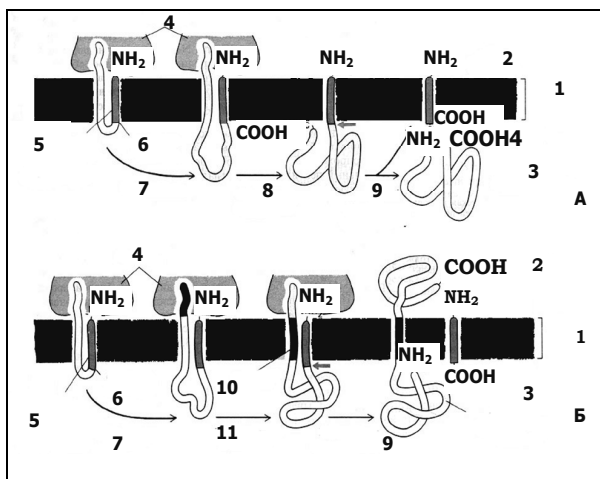


Рис. 10.5. Два випадки перенесення білка через мембрану грЕПС: 1 – ліпідний бішар, 2 – цитозоль, 3 – просвіт ЕПС, 4 – рибосома, 5 – специфічно зв'язаний сигнальний пептид (старт-пептид), 6 – сайт розщеплення, 7 – перенесення, 8 – перенесення завершено, 9 – відщеплення старт-пептиду, 10 – стоп-пептид, 11 – перенесення зупинено (за Альбертсом Б., Джонсоном А., Левісом Дж. та ін., 2002)

Відщеплення сигнальної послідовності відбувається за дії комплексу мембранних білків, що складається із п'яти субодиниць, який називається **комплексом сигнальної пептидази** (SPC). Дві субодиниці комплексу мають протеолітичну активність, три інші відіграють регуляторну роль. Місцезнаходження сайту відщеплення сигнальної послідовності залежить від самого білка і значною мірою визначається амінокислотним оточенням. Залишок, розташований з N-термінального боку від місця розщеплення, має бути представлений амінокислотою з коротким бічним ланцюгом, а залишок, розташований від нього через три амінокислоти, повинен належати незарядженій амінокислоті.

Зазвичай відщеплення сигнальної послідовності відбувається після того, як розміри білкового ланцюга досягли близько ста або більше амінокислот. Однак для деяких білків відщеплення відбувається у набагато пізніші терміни. Слід зазначити, що іноді, до відщеплення, сигнальна послідовність може впливати на взаємодію білка з іншими факторами ЕПС, включаючи ті, що беруть участь у модифікації зростаючого ланцюга або в утворенні його нативної структури. Відщеплений же сигнальний пептид зазвичай піддається подальшому протеолізу, що здійснюється за допомогою ферментного комплексу, який називається **пептидазою сигнального пептиду** (**SPP**, не плутати із сигнальною пептидазою, яка видаляє сигнальний пептид із насцентного ланцюга). Виявлено, що ця пептидаза активна щодо певного набору відщеплених сигнальних пептидів, що дозволяє припускати існування у неї більш складних функцій, ніж просто видалення використаного сигнального пептиду. Однак деталі її функціонування залишаються на сьогодні не до кінця зрозумілими.

Якщо при перенесенні поліпептиду крізь мембрану зустрінеться послідовність із гідрофобних амінокислот (**стоп-послідовність**, або **сигнальна якірна послідовність**) перенесення пептиду крізь мембрану буде зупинено. У такий спосіб утворюються трансмембранні білки.

Першим кроком на шляху інтеграції білка до мембрани є впізнання транслоконом "майбутніх" трансмембранних доменів

(вони складаються загалом приблизно із 20 гідрофобних амінокислотних залишків). Ці сигнальні якірні послідовності спочатку взаємодіють з білками транслокону, а потім проходять до його каналу, де й відбувається розпізнання гідрофобності "майбутнього" трансмембранного домену.

Структура транслокону передбачає, що канал здатний відкриватися подібно до раковини молюска, що дозволяє трансмембранному домену одночасно контактувати і з каналом, і з ліпідним бішаром. Сигнальні послідовності та трансмембранні домени зв'язуються з білком Sec61 α , розташованим з боку "стулок", і це зв'язування викликає латеральне відкриття каналу. Зазначимо, що хоча у складі транслокону наявний гідрофільний канал, у самій мембрані достатньо гідрофобних зон, у яких поліпептиди, що транслокуються, можуть потрапити "в оточення" ліпідів. У результаті ділянки, що містять полярні амінокислоти, будуть переноситися через канал без зупинки, тоді як гідрофобні домени за рахунок сильної взаємодії з ліпідами залишатимуться зв'язаними з бічними стінками каналу, перешкоджаючи транслокації.

Деякі домени покидають транслокон швидко, майже відразу після їхнього впізнання у каналі. У таких випадках трансмембранний домен спочатку контактує з Sec61 α і з ліпідами, а потім, проникаючи в ліпідний бішар, лише з ліпідами. Інших білків, за винятком комплексу Sec61, для інтеграції подібних доменів не потрібно. Проте існують і такі трансмембранні домени, що інтегруються повільніше й після розпізнання довго не виходять із транслокону, іноді залишаючись там навіть до закінчення трансляції. У міру виходу з каналу в бішар ці трансмембранні домени вступають у контакт з білком TRAM.

Чи буде трансмембранний домен інтегруватися одразу або на більш пізньому етапі синтезу білка частково визначає ступінь його гідрофобності. Більш гідрофобні домени можуть швидше просуватися в ліпідний бішар, а менш гідрофобні залишатимуться на межі, і їм необхідні додаткові "транспортні фактори". Не виключено, що TRAM та інші білки відіграють роль шаперонів для деяких трансмембранних доменів. Вони сприяють інтеграції таких доменів, гідрофобність яких виявляється недостатньою для самостійного переміщення. Очевидно, що принаймні група

трансмембранних білків містить певний домен, який в одних випадках інтегрується в мембрану, а в інших залишається невпізнаним. І такі білки, як TRAM, можуть визначати, за яких умов такі домени будуть інтегровані.

Після відрізання N-сигнальної послідовності утворюється пептид, який міститиме один домен у лумені цистерни грЕПС, другий – у товщі мембрани (стоп-послідовність), і третій – обернений до цитозолу (рис. 10.5, Б). На відміну від N-сигнальної послідовності, сигнальні якорні послідовності не відщеплюються від білка, а інтегруються у мембрану.

Крім видалення N-сигнальної послідовності можливе приєднання частини білка до "якоря" з жирної кислоти або до **глікозилфосфатидилінозитулу (ГФІ)** (рис. 10.6). Остання модифікація може бути надзвичайно важливою для подальшої долі такого ("якорного") білка.

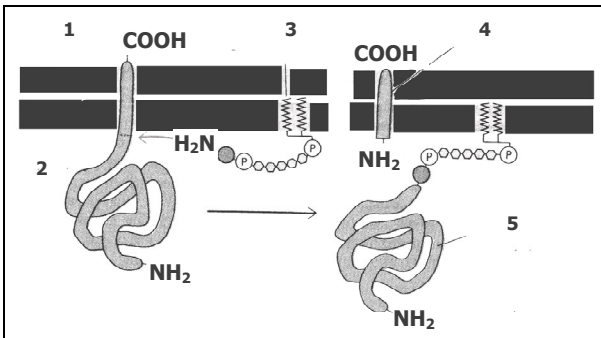


Рис. 10.6. Утворення білка, зв'язаного з мембраною за допомогою "якоря" із фосфатидилінозитулу. По завершенні синтезу білка, фермент у грЕПС відрізає білок від його мембранної С-кінцевої частини, одночасно приєднуючи його до глікозилфосфатидилінозитулу. 1 – цитозоль; 2 – порожнина ЕПС; 3 – глікозилфосфатидилінозитол; 4 – відщеплений С-кінцевий пептид; 5 – білок, ковалентно приєднаний до ліпідного "якоря" у мембрані
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Левісом Дж. та ін., 2002)

Існують дані про те, що в результаті зв'язування з ГФІ "відбираються" білки, призначені для наступного внутрішньоклітинного транспортування, наприклад, до апікальної поверхні поляризованих клітин, кавеол плазматичної мембрани тощо.

Слід підкреслити, що білки, зв'язані з мембраною за допомогою ліпиду, мають більшу рухливість у межах мембрани, ніж інтегральні білки, оскільки ліпіди швидше дифундують у мембрані. Також інтегровані білки важко видалити з мембрани, тоді як білки, зв'язані з нею за допомогою ГФІ, можуть вивільнитися при ферментативному видаленні гліколіпиду (у відповідь, скажімо, на отриманий клітиною сигнал).

ГФІ є складною структурою, яка має синтезуватися раніше, ніж вона приєднається до білка. Синтез ГФІ починається на мембрані ЕПС з боку цитозолу із взаємодії мембранного фосфоліпиду фосфатидолінозиту (PI) з N-ацетилглюкозаміном (GlcNAc). Далі відбувається деацетилювання GlcNAc-PI з наступним додаванням трьох залишків манози і приєднанням до кожного з них фосфоетаноламіну.

Додавання ГФІ вимагає упізнання новоствореного пептидного ланцюга, який є фактично субстратом, і перенесення залишку ГФІ на його відповідний акцепторний сайт. "Сигналом" додавання ГФІ є невеликий гідрофобний домен, розташований із С-термінального кінця, довжина якого зазвичай становить 20–30 амінокислотних залишків. Подібно до N-термінальних сигнальних послідовностей, сигнал ГФІ є різним у різних білків і видаляється після приєднання ГФІ (експонуючи при цьому С-термінальний сайт *омега* (ω)).

Найбільш вірогідний механізм цього процесу включає двоетапну реакцію трансамінування, на першому етапі якої специфічний фермент утворює ковалентний інтермедіат із сайтом ω , що призводить до відщеплення С-термінального пептиду від решти білка. Потім термінальний фосфоетаноламіновий залишок ГФІ вступає у контакт з новоутвореним білком (за участю ферменту) і додається до його експонованого сайту ω . При цьому утворюється ГФІ-зв'язаний білок, а фермент вивільняється.

Існує разюча подібність між процесами розпізнавання і відщеплення сигнальної послідовності та ГФІ-сигналу, (хоча дані процеси й каталізуються різними ферментами): у тому випадку, коли ці домени займають у білку однакове положення, вони можуть виконувати однакові функції. Інколи звичайна N-сигнальна послідовність може бути ГФІ-сигналом, якщо

вона займає С-термінальне положення в секреторному білку. Обидва типи сигналів упізнаються як трансмембранні домени й інтегруються у ліпідний бішар, якщо містяться всередині молекули білка. Сайти розщеплення двох цих типів сигналів також подібні. Сказане вище дозволяє припускати ймовірність того, що в упізнаванні обох типів сигналів можуть брати участь одні й ті самі білки.

До деяких білків ковалентно приєднуються складні вуглеводні залишки (дет. див. нижче).

Якщо в новосинтезованому білку присутній лише лідерний пептид, що індукує початок перенесення, а стоп-пептид відсутній, поліпептид переноситься крізь мембрану повністю, а після відрізання лідерного пептиду в просвіт грЕПС вивільнюється зрілий розчинний білок (рис. 10.5, А). Якщо ж є і лідерний (стартовий) пептид, і стоп-пептид, який зупиняє перенесення поліпептидного ланцюга крізь мембрану, то після закінчення синтезу й відрізання лідерного пептиду утворюється інтегральний білок (рис. 10.5, Б), що пронизує мембрану один раз (**монотонний білок**). Прикладами подібних трансмембранних білків є рецептор ліпопротеїнів низької щільності та попередник амілоїду.

Окремо слід обговорити механізм утворення білків, які декілька разів пронизують мембрани (**політонні білки**). У цьому разі пептид містить декілька стартових і стопових гідрофобних послідовностей, які, відповідно, починають або призупиняють перенесення білкової молекули через мембрану грЕПС. У деяких найпростіших випадках трансмембранні домени інтегруються до мембрани один за одним у міру їхньої появи в каналі. Орієнтація всього білка в цьому випадку визначається властивостями першого трансмембранного домену.

Однак іноді перебіг процесу йде більш складним чином. Трансмембранні домени не обов'язково інтегруються один за одним відразу після їхнього впізнавання. У деяких випадках на транслоконі можуть одночасно займати визначену позицію щонайменше два домени, які й інтегруватися до мембрани можуть парою, а не поодиноці. Більш того, до інтеграції ці трансмембранні домени в результаті їхньої взаємодії можуть реорієнтуватися.

Таким чином, послідовність подій інтеграції політопного мембранного білка носить індивідуальний характер, і орієнтація такого білка може визначатися сумарним впливом кількох ділянок, присутніх у його первинній послідовності.

Однак загалом, знаючи послідовність амінокислот у білку, а отже, і положення його гідрофобних послідовностей, можна, у першому наближенні, передбачити розташування білкових доменів відносно мембрани (табл. 10.2).

Крім описаних процесів *котрансляційного* перенесення білка через мембрану грЕПС, для одноклітинних еукаріотів виявлено механізм *посттрансляційного перенесення*. У цьому процесі СРЧ участі не бере, білок транспортується до транслокону за участю мультибілкового комплексу, що є частиною посттрансляційного транслокону. Як і описаний вище котрансляційний транслокон, посттрансляційний транслокон містить тример Sec61, але поруч із ним виявлено інші білки: Sec62p, Sec63p, Sec71p та Sec72p.

Таблиця 10.2

**Орієнтовне розташування доменів
у трансмембранному білку, що кілька разів пронизує мембрану**

№ домену	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Гідрофобний (-) або гідрофільний (+)	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Розташування	Р	І	Е	І	Р	І	Е	І	Р	І	Е
Примітки	Н	ЛП	СР	стоп		старт		стоп		старт	С

Примітки: "+" – гідрофільний; "-" – гідрофобний; Р – розміщений на цитоплазматичному боці; Е – розміщений у просвіті цистерни; І – розміщений усередині бішару; Н – N-кінцевий домен; ЛП – містить лідерну (N-сигнальну) послідовність; СР – може містити сайт розрізання; стоп – містить сигнал закінчення перенесення поліпептидного ланцюга через мембрану грЕПС; старт – містить сигнал початку перенесення поліпептидного ланцюга через мембрану грЕПС; С – С-кінцевий домен.

Ці білки утворюють субкомплекс, великі домени якого відкриваються у цитозоль та в порожнину грЕПС. Деякі з цих доменів беруть безпосередню участь в адресуванні білків. Утворення нативної структури насцентного білка під час посттрансляційного перенесення блокується завдяки взаємодії з шаперонами родини hsp70. Ці білки використовують енергію гідролізу АТФ для зворотного зв'язування з посттрансляційно зміненими білками, запобігаючи утворенню їхньої нативної структури чи агрегації. Завдяки цьому білки набувають можливості взаємодіяти з каналом посттрансляційного транслокону.

Після розміщення поліпептидного ланцюга на транслоконі, сигнальна послідовність упізнається каналними білками, подібно до механізму котрансляційної транслокації. Цей важливий етап гарантує специфічність перенесення, запобігаючи помилковому перенесенню цитозольних білків.

Джерелом енергії для посттрансляційного перенесення білків до грЕПС є АТФ, який гідролізується білком ВіР з групи шаперонів hsp70 (детальніше про участь цього білка у фолдингу в цистернах ЕПС буде сказано нижче). Цей білок люмену грЕПС обернено зв'язується з доменом Sec63p. Функція ВіР у даному випадку полягає у зв'язуванні з поліпептидом, що росте, у міру його виходу з каналу. Подібне з'єднання запобігає зворотному руху поліпептиду до цитозолу: нова ділянка білка після синтезу зв'язується з новою молекулою ВіР. Енергія гідролізу АТФ витрачається при цьому на посилення взаємодії ВіР з поліпептидом. У подальшому, при обміні АДФ на АТФ, відбувається дисоціація ВіР та субстрату.

Оригінальна система пост трансляційного перенесення виявлена у прокариотів. У бактерій пост трансляційний шлях відіграє важливе значення під час синтезу різноманітних експортних білків. Транслокон прокариотів є комплексом із трьох білків і носить назву SecYEG. Особливість прокариотичного різновиду посттрансляційного перенесення зумовлена відсутністю у бактерій ЕПС та інших мембранних органел, а отже, експортні білки переносяться одразу через плазмалему. Транслокацію забезпечує білок SecA, що діє з цитозольного боку мембрани. Під час роботи він багаторазово "входить" до

каналу, протягуючи за собою нову ділянку поліпептиду. Зв'язування та вивільнення поліпептиду білком SecA відбувається за рахунок гідролізу АТФ.

Система посттрансляційного перенесення, про що вже йшлося, широко представлена у дріжджів, проте й у вищих еукаріотів знайдено гомологи білків посттрансляційного транслокону Sec62p та Sec63p. Однак є очевидним, що для останніх головне значення має система саме котрансляційного перенесення.

Після перенесення білка через мембрану грЕПС він має згорнутися. Під час *фолдингу* (укладка білка, від англ. *folding*) – процесу спонтанного згортання поліпептидного ланцюга в унікальну нативну просторову структуру (так звана третинна структура) – білки в ЕПС стикаються з проблемою, яка практично відсутня в цитозолі: простір грЕПС переповнений незгорнутими білками. У правильно згорнутому білку гідрофобні послідовності сховано всередині білкової глобули, і новоутворений у цитозолі білок, який набув відповідної конформації, не має шансів "зачепитися" своїми гідрофобними ділянками за функціонально активний білок цитозолу, яких у цьому компартменті більшість.

У грЕПС ситуація інша: більшість білків у порожнині її цистерн тимчасові, із часом вони надходять до апарату Гольджі. Тому у відносно невеликому об'ємі цистерни сконцентровано багато незгорнутих білків, які легко "зчеплюються" своїми гідрофобними послідовностями, утворюючи складне сплетення.

Оскільки білки з дефектною нативною структурою є небезпечними для клітини, одна з головних функцій грЕПС полягає в контролі за нативною структурою білків. В ЕПС існує активна система контролю якості, яка розпізнає незгорнуті чи невірно згорнуті білки й забезпечує їм можливість правильного фолдингу чи викликає їхню деградацію.

Рушійною силою при формуванні нативної структури білка в грЕПС, як і в цитозолі, є гідрофобні взаємодії. Гідрофобні домени виявляють тенденцію зв'язуватися один з одним, а не залишатися у водному оточенні. Проте такі домени можуть зв'язуватися неправильно, що призводить до дефектної нативної структури білка чи до його агрегації з іншими білками. Утворенню належної структури білка сприяють шаперони, які забез-

печують відповідне оточення для перебігу цього процесу та контроль за його результатами. Структурні перебудови можуть повторюватися доти, поки білок не набуде "правильної" нативної конформації. Поки білок пов'язаний із шаперонами, він не може вийти із ЕПС і транспортуватися до апарату Гольджі.

Значна кількість шаперонів грЕПС близькі за структурою до шаперонів цитозолі. До них можна віднести зв'язувальний білок **BiP** (від англ. *binding protein*) із групи hsp70, який має шаперонну активність. Цей білок часто зустрічається в ЕПС і взаємодіє з багатьма білками на ранніх етапах утворення їхньої нативної структури. Високий вміст цього шаперону в міжмембранному просторі ЕПС є запорукою того, що він буде першим шапероном, із яким зустрінеться новоутворений білок. BiP із самого початку бере участь у процесі набуття білком правильної конформації, про що вже йшлося вище.

BiP зв'язується із зовнішніми гідрофобними ділянками неправильно згорнутих білків і запобігає їхньому переходу в інші компартменти, аж поки вони не згорнуться правильно. Зазвичай такі гідрофобні ділянки сховані у серцевині глобулярних білків, тому наявність на поверхні глобули гідрофобної ділянки свідчить про те, що білок не набув повністю правильної нативної структури. Саме до цих ділянок і приєднується BiP. За рахунок послідовних циклів гідролізу АТФ, цей шаперон зв'язується з новоутвореним білком і вивільнюється. Завдяки цьому попереджується агрегація новоутвореного білка й полегшується утворення ним правильної нативної структури.

На шаперонову активність BiP впливають додаткові білки, що стимулюють гідроліз АТФ, та білки, що сприяють обміну АДФ на АТФ. У такий спосіб, залежно від потреб клітини, регулюється швидкість утворення нативної структури білка. Зв'язок з BiP білка припиняється після утворення білком компактною структурою, гідрофобні ділянки якої знаходяться всередині.

До інших шаперонів, що містяться у люмені грЕПС (а також цитозолі) належить **Grp94**, який належить до родини hsp90. На відміну від BiP, він зв'язується з білками, що вже частково набули нативної структури. Grp94 взаємодіє з меншою кількістю субстратів, ніж BiP, і точний механізм його селективності зали-

шається невідомим. Імовірно, він сприяє ефекту ВіР та інших шаперонів при формування дефінітивної структури білка. Однак саме існування Grp94 є показником багаторівневості контролю якості утворення нативної структури поліпептидного ланцюга.

Шаперонну активність також мають білки групи *кальнексину* та *кальтерікуліну*, які розпізнають моноглікозилований білок і фіксуються на ньому через N-пов'язану глюкозу. Ці шаперони дозволяють уникати агрегації між собою присутніх у цистерні грЕПС різних білків і забезпечують фіксацію інших шаперонових білків, таких як, скажімо, ERp57. Утворений таким чином комплекс білок–кальнексин–ERp57 забезпечує правильний фолдинг. У подальшому фермент глюкозидаза II видаляє залишок глюкози, звільняючи у такий спосіб білок від шаперонів.

У випадку, коли згортання відбулося неправильно, глікозилтрансфераза додає глюкозу до білка, що ініціює новий цикл "просторового ремоделювання" до досягнення правильної конформації. Якщо згортання знову виявляється неправильним, манозидаза відщеплює N-пов'язану манозу, після чого білок транспортується в цитозоль через комплексний канал транслокону. У цитозолі такий білок взаємодіє з цитозольними шаперонами (такими як Hsp70, Hsp90 або Hdj-2), які "дозволяють" убіквітину фіксуватися на білку й ініціювати його розщеплення АТФ-залежним комплексом протеосоми 26S.

Білки в цистерні грЕПС зустрічаються ще з однією проблемою, яка не властива цитоплазматичним білкам, – формування дисульфідних містків. Залишки амінокислоти цистеїну в цитозолі підтримуються у відновленій (–SH) формі завдяки наявності відновлювальних агентів: трипептиду глутатіону та невеликого білка тіоредоксину. У грЕПС цих агентів немає, і між різними залишками цистеїну утворюються дисульфідні (–S–S–) містки. Зазвичай такі містки утворюються між цистеїнами одного поліпептидного ланцюга, але іноді вони можуть об'єднувати й різні білки. Оскільки в цистерні ЕПС одночасно згортається багато білків, цей процес часто відбувається з помилками.

Виправляти такі помилки "допомагають" ферменти *фолдази* з родини *протеїндисульфідізомераз*, прикріплені до внутрішньої поверхні мембрани грЕПС. За наявності помилок в утво-

ренні дисульфідних містків виникає неправильна конформація молекули, і, як наслідок, різні молекули агрегують між собою. У таких випадках протеїндисульфідізомераза (за однією із моделей) каталізує перегрупування та утворення нових дисульфідних зв'язків: розрізає дисульфідні містки неправильно згорнутих білків, даючи їм можливість за невеликий відрізок часу перебрати багато варіантів конформації, доки не буде досягнуто найбільш енергетично вигідної. Це й буде означати, що білок згорнуто вірно. Таким чином, цей фермент та інші тіолові ізомерази забезпечують молекулам білків необхідну гнучкість, знімаючи обмеження, що виникають через наявність неправильних дисульфідних зв'язків.

Протеїндисульфідізомераза каталізує утворення дисульфідних зв'язків за участю цистеїнових залишків, що знаходяться в її власному активному центрі. Утворення такого зв'язку є окисно-відновною реакцією, за якої відбувається обмін електронами між цистеїновими залишками білка та ферменту. Для початку такої реакції мають виконуватися як мінімум дві вимоги: залишки цистеїну у ферменті мають бути в окисненому стані й має бути наявна система подальшого їхнього окиснення.

Вважалось, що повторне окиснення відбувається за участю молекули глутатіону, що імпортується в міжмембранний простір ЕПС і підтримує дисульфідізомеразу в окисненому стані. Проте показано, що принаймні в деяких білках дисульфідні зв'язки можуть утворюватися і перегруповуватися й без глутатіону. Ключову роль у такому глутатіоннезалежному механізмі відіграє білок Ero1p. Він містить дисульфідний зв'язок, який використовується в реакції дисульфідного обміну для регенерації поліпептиддисульфідізомерази. У свою чергу, Ero1p окиснюється за участю *флавінаденіндинуклеотиду* (ФАД).

Нині запропоновано ще один механізм ізомеризації існуючих дисульфідних зв'язків у невірно згорнутому білку. Відповідно до нього в цій реакції один із залишків цистеїну в активному сайті поліпептиддисульфідізомерази утворює тимчасовий дисульфідний зв'язок із цистеїновим залишком білка, який необхідно правильно згорнути. Доки існує цей зв'язок, утворення нативної структури може продовжуватися (зв'язок із ферментом цьому не

заважає), проте утворення інших, "неправильних" –S–S– зв'язків стає малоймовірним. Коли білок набуває ("правильної") конформації, за якої можливе утворення іншого ("правильного") дисульфідного зв'язку, тимчасовий зв'язок розривається.

Точний механізм, завдяки якому відбувається контроль відповідності утворення дисульфідного зв'язку і припинення взаємодії з білком, остаточно не встановлений. Можливо, щільна упаковка поліпептидного ланцюга за умови вірного фолдингу робить його дисульфідні зв'язки недосяжними для ферменту.

Окрім фолдазної дії, поліпептиддисульфідізомераза може діяти і як власне шаперон, активність якого регулюється ступенем його окиснення. Цей фермент є найбільш вивченою тіолізомеразою, яка експресується майже в усіх тканинах. Однак відомо цілий ряд і інших шаперонів, що містяться у міжмембранному просторі ЕПС, які також функціонують за окисно-відновним принципом. Вважається, що деякі з них мають специфічність до певних типів клітин та/або субстратів. Серед іншого, до цієї родини належить білок ERdj5, який також може стимулювати гідроліз АТФ під дією ВіР. Не виключено, що саме ERdj5 відіграє роль проміжної ланки регуляції процесів утворення нативної структури пептиду за участю ВіР та перегруповування дисульфідних зв'язків. Іншою фолдазою ЕПС є пептидилпропілізомераза.

Шаперони є важливим елементом системи "контролю якості" синтезу і згортання білків в грЕПС. З цією системою пов'язана й система *ретроградної транслокації (дислокація, або ретро-транслокація)*, яка дозволяє розпізнавати білки з неправильною структурою та повертати їх до цитозолу для подальшої деградації за механізмами убіквітинзалежного протеолізу.

Шлях деградації неправильно згорнутих білків ЕПС називають *деградацією, пов'язаною з ЕПС (ERAD)*. Важливим чинником, який визначає, чи зазнає неправильно згорнутий білок процедури ERAD, є взаємодія цього білка з шаперонами ЕПС. Якщо така взаємодія триває надто довго, а білок так і не набуває правильної нативної структури (що викликано, скажімо, мутацією), то така молекула буде "переправлена" через рет-

ротранслокон на цитоплазматичний бік поверхні мембрани ЕПС. Якщо неправильної структури набуває глікопротеїн, то сигнал для його деградації "дає" фермент α -манозидаза I, яка відщеплює у такого білка манозу.

Роль каналу ретротранслокону, принаймні в деяких випадках, грає комплекс Sec61p. Для багатьох неправильно згорнутих білків поліубіквітинування починається ще під час проходження через канал ретротранспозону, що є необхідним для нормального перебігу цього процесу. У випадку, якщо система убіквітинування з різних причин не працює, ретротранслокація не відбувається.

Крім поліубіквітинування для процесу ретротранслокації необхідна наявність зв'язаної з мембраною ЕПС (на її цитозольно-му боці) АТФази *p97*. Саме ця АТФаза зв'яже цитозольні кофактори, що взаємодіють з мішенню для ERAD, та "витягує" неправильно згорнутий білок з каналу ретротранслокону. Певну роль у цьому процесі може брати також невеликий білок *дерлін*, який утворює своєрідний "міст" між неправильно згорнутим білком та *p97* за посередництва іншого білка – VIMP.

Слід відзначити, що особливо великі білки іноді можуть бути "відібрані для деградації" навіть ще до закінчення свого синтезу та транслокації в грЕПС. Це дозволяє економити енергію, що має витратитися на переміщення такого білка, який із самого початку синтезу почав набувати такої неправильної конформації, яку неможливо виправити. Наприклад, аполіпропротеїн В (великий секреторний білок) на першому етапі збирання ліпопротеїнів низької щільності має зв'язатися з ліпідами та жирними кислотами. Якщо фермент у порожнині ЕПС не здійснює відповідних реакцій, аполіпропротеїн починає деградувати ще до моменту повного завершення синтезу та транслокації.

Після правильно згортання новоутворений білок зазнає *посттрансляційної модифікації*. Часто такі модифікації починаються ще в процесі надходження білка в люмен грЕПС. На відміну від цитозолу, де найчастішою модифікацією є фосфорилування залишків серину або треоніну, у порожнині грЕПС більшість білків зазнають *глікозилювання*. При цьому

олігосахарид, що містить у своєму складі залишки 14 моносахаридів (два залишки N-ацетилглюкозаміну, дев'ять манози та три глюкози) відщеплюється від доліхолу, на якому його було синтезовано, і приєднується до $-NH_2$ бічної групи амінокислоти аспарагіну (рис. 10.7). Тому таке глікозилювання називається N-глікозилюванням. Сигналом приєднання олігосахариду є послідовність амінокислот Asn-X-Ser або Asn-X-Thr (де X в апараті Гольджі молекули зазнають подальших модифікацій структури олігосахаридів, які будуть включати додавання та видалення олігосахаридних залишків – будь-яка амінокислота, крім проліну). У таких послідовностях радикали аспарагіну та треоніну (чи серину) утворюють між собою водневий зв'язок, що сприяє формуванню структури "шпилька", яка розпізнається відповідним ферментом. Пролін, на відміну від інших амінокислот, містить α -аміногрупу у складі гетероциклу, що призводить до конформаційних особливостей поліпептидної ділянки в зоні розташування цієї амінокислоти: у місці локалізації проліну виникають звивини, що запобігають, зокрема, формуванню α -спіралей, а також у даному випадку запобігають утворенню структури "шпилька". Цікаво, що подібних послідовностей менше саме в білках, які синтезуються на гРЕПС, тоді як у цитоплазматичних їх порівняно багато. Імовірно, зменшення у білків ЕПС кількості цих послідовностей було пов'язане зі складністю самого процесу згортання білків (важко згорнути білок, що має багато бічних N-глікозильних груп).

Глікозилювання може мати декілька функцій. По-перше, поки білки перебувають в ЕПС, приєднання до них залишків олігосахаридів сприяє набуттю ними нативної структури або полегшує їхню деградацію. По-друге, глікозилювання білків є механізмом зміни їхніх функцій. Так, секреція та активність ФСГ (фолітропіну) змінюються залежно від зміни ступеня глікозилювання. В інших випадках вуглеводні залишки можуть сприяти розчинності білків чи захищати їх від деградації позаклітинними протеазами.

Синтез проміжних продуктів для глікозилювання починається на Р-поверхні мембрани гЛЕПС (детальніше описано вище).

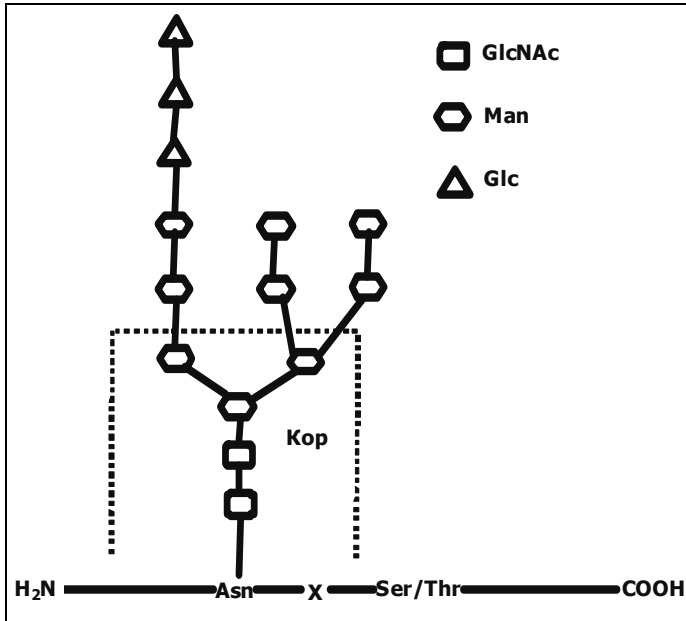


Рис. 10.7. Структура зв'язаного з аспарагіном олігосахариду, що додається до більшості білків на внутрішньому боці мембрани гРЕПС. GlcNAc – N-ацетилглюкозамін; Man – маноза; Glc – глюкоза; Asn – аспарагін; X – будь-яка амінокислота, крім проліну; Ser/Thr – серин або треонін. Пунктиром виділено моносахариди, що складають стабільний "кор" олігосахариду. Інші моносахариди є замінними

Перенесення розгалуженого вуглеводного фрагмента з доліхолфосфату на поліпептид відбувається за каталітичної участі складного мультисубодиночного ферментативного комплексу *олігосахаридтрансферази*. Дві субодиноці цього комплексу – *рибофорин I* та *II* пронизують мембрану ЕПС, взаємодіючи зі зв'язаною рибосомою (звідси їхня назва) та розташовуючи сам комплекс безпосередньо близько від каналу. Олігосахаридтрансфераза модифікує аспарагінові залишки дуже швидко після того, як сайт глікозилювання "виходить" з каналу (до початку модифікації в міжмембранний простір мають вийти 10–12 амінокислотних залишків). Залежно від умов ступінь глікозилювання може змінюватися.

По закінченні глікозилування в грЕПС і вдалого згортання синтезованого білка "пришиті" олігосахариди модифікуються: із них "видаляються" три залишки глюкози. У подальшому, уже в апараті Гольджі, молекули зазнають наступних модифікацій структури олігосахаридів (додавання та видалення певних вуглеводних залишків), що має велике функціональне значення (див. далі).

Усі білки й глікопротеїни, які повинні залишитися в порожнині ЕПС або у складі її мембрани, мають невелику амінокислотну послідовність, що отримала назву "*сигнал утримання*". Решта білків і олігосахаридів мають бути переправлені до апарату Гольджі, де вони зазнають нових модифікацій. Для цього "скручування" білка має бути визнано правильним певним контрольними механізмами ЕПС. Білок, що перевіряється, взаємодіє з "карго" – білком ERGIC-53 (належить до родини лектинів), який зв'язується з першим через манозу. Перенесення ERGIC здійснюється за допомогою везикул. Якщо фолдинг білка порушується, він стає вразливим для ендоглікозидаз Н апарату Гольджі й направляється в цьому випадку назад у ЕПС, де й руйнується. Навпаки, у разі правильного скручування резистентний до ендоглікозидази Н білок взаємодіє з фактором VIP36 (гомолог ERGIC-53) і може прямувати далі по вакуолярній системі.

ТРАНСПОРТ ВЕЗИКУЛ ВІД ЕПС ДО АПАРАТУ ГОЛЬДЖІ

Процес переправлення мембранних везикул до апарату Гольджі здійснює *проміжний ретикулум*, або *везикулярно-тубулярна група*, або *проміжний компартмент ЕПС-апарат Гольджі (ERGIC)* – позбавлена рибосом ділянка грЕПС, яка утворює мембранні вирости й від якої час від часу відшнуровуються невеликі мікропухирці. Останні вкриті білковим шаром, побудованим комплексом COP II, що складається з кількох гетеродимерів, зв'язаних з мембраною за допомогою білка Sar1p.

Від зони проміжного ретикулума до апарату Гольджі тягнеться велика кількість мікротрубочок, котрі забезпечують потрапляння мікропухирців до апарату Гольджі.

Після втрати білкової облямівки пухирці зливаються один з одним і транспортуються до *цис*-компартменту апарату Гольджі, з мембранами якого вони мають злитися. За точність злиття відповідають **SNARE-білки**. **V-SNARE** – інтегральний білок облямованих пухирців. На *цис*-компартменті апарату Гольджі розташовані білки **T-SNARE** та **SNAP25**, з якими V-SNARE має взаємодіяти для успішного злиття обох мембран. Детальніше ці процеси описано в розд. 12.

ПАТОЛОГІЯ ЕНДОПЛАЗМАТИЧНОЇ СІТКИ

Зміни грЕПС при патології

Найчастіше патологічні зміни ЕПС виражаються гіперплазією та атрофією. Зустрічаються також спрощення структури й дезагрегація (дисоціація) рибосом і полісом.

Гіперплазія грЕПС і рибосом – тобто збільшення кількості цистерн і рибосом – світлооптично визначається підвищенням базофілії цитоплазми і свідчить про підвищення інтенсивності білкового синтезу в клітині. При електронно-мікроскопічному дослідженні можна виявити підвищення синтезу та екскреції білка або на фоні посилення його синтезу, або гальмування виведення із клітини.

У клітинах, які інтенсивно секретують і екскретують білок, наприклад у активних фібробластах, спостерігається гіперплазія грЕПС, цистерни якої розширені й майже порожні. При цьому апарат Гольджі, що бере участь у виведенні із клітини синтезованого білка, добре розвинений. У клітинах, які інтенсивно секретують білок, але з порушенням його екскреції, у розширених гіперплазованих цистернах ЕПС, на яких розташована велика кількість рибосом і полісом, накопичується електроннощільний матеріал, іноді відбувається його кристалізація. Апарат Гольджі в таких випадках недостатньо розвинений.

Атрофія грЕПС – зменшення її розмірів – світлооптично виявляється зниженням базофілії цитоплазми, а електронно-мікроскопічно – зменшенням розмірів канальців і загального об'єму сітки, кількості та розмірів рибосом. Це свідчить про зниження білковосинтетичної функції клітини (і, як результат, про зниження його секретії) і виявляється при білковому дефіциті під час голодування, при хворобах печінки, старінні.

Спрощення структури грЕПС сітки клітин свідчить про недостатність клітинного диференціювання й зустрічається найчастіше в клітинах злякисних пухлин.

Дезагрегація (дисоціація) рибосом і полісом – виявляється в порушенні рибосомально-мембранних взаємовідносин, "неорганізованих" асоціації рибосом у полісоми. Ця патологія є виразом спрощення будови ЕПС. Зустрічається в недиференційованих і пухлинних клітинах, а також у диференційованих при кисневому голодуванні й дефіциті білка в організмі.

ЕПС і система оксигеназ зі змішаною функцією. Деякі чужорідні речовини, які зазнають метаболічних перетворень в ЕПС, здатні взаємодіяти з макромолекулами клітини, що приводить до її пошкодження. Каталізаторами таких метаболічних процесів в ЕПС є група споріднених NADH- і O_2 -залежних ферментів. Це – монооксигенази (гідроксилази) або оксигенази зі змішаною функцією (ОЗФ). Оксигенази – гемовмісні ферменти класу оксиредуктаз, що каталізують процеси вільного окиснення субстрату шляхом приєднання двох атомів кисню. Монооксигенази приєднують один атом кисню до субстрату, другий використовують для окиснення НАДФ·Н₂. Кисень включається до субстрату безпосередньо. Функція оксигеназ – пластична, її субстратами є холестерин, стероїди, ненасичені жирні кислоти.

Головною оксигеназою цієї системи є цитохром-Р450. Її знайдено в ЕПС клітин багатьох органів (печінка, легені, кишки, кора надниркових залоз, шкіра). Ця система може, крім гідроксилування стероїдів, утилізувати деякі ліпофільні ендогенні (жирні кислоти) та екзогенні (лікарські препарати, органічні розчинники, карциногени) речовини. Метаболізм сторонніх ліпофільних речовин потребує складної взаємодії ряду ферментативних про-

цесів, у яких система ОЗФ – цитохром P450 посідає центральне місце. Такий метаболізм не завжди викликає інактивацію метаболічних речовин. Можливим є утворення реакціноздатних оксигенованих продуктів, які взаємодіють з нуклеїновими кислотами й білками клітини, що викликає їхнє пошкодження. Основний механізм такого пошкодження – це генерація супероксидних радикалів O_2 і пероксиду водню, що індукують переокиснення ліпідів.

Патологія рибосом, пов'язаних з ЕПС. При патології рибосоми зазнають суттєвих морфологічних змін, набуваючи вигляду добре окреслених геометричних фігур. Так, у пухлинних клітинах лімфоми Беркіта вони мають вигляд спіралі. Аналогічні зміни спостерігаються в клітинах і при гіпотермії, кисневому голодуванні та дефіциті білка в організмі.

Муковіцидоз (кістозний фіброз). Це захворювання є результатом заміни однієї амінокислоти у молекулі муковіцидозного регулятора трансмембранного перенесення (CTFR). Унаслідок цього неправильно згорнуті поліпептиди накопичуються у ЕПС, а не транспортуються. Надалі в ЕПС відбувається руйнація цих поліпептидів. При муковіцидозі спостерігаються важкі порушення функціонування органів дихання та шлунково-кишкового тракту.

Зміни глЕПС при патології

Серед найпоширеніших патологічних змін органели визначають гіперплазію та атрофію.

Гіперплазія мембран глЕПС проявляється збільшенням і розширенням її каналців, при цьому спостерігається, як правило, посилення синтетичної активності. Цей процес часто супроводжується порушенням внутрішньоклітинного транспорту, у розширених каналцях ЕПС накопичуються продукти синтезу, апарат Гольджі при цьому редукований. Показано, що в разі дефіциту певних ферментів (при ферментопатіях) уповільнюється внутрішньоклітинний транспорт, що супроводжується накопиченням у розширених цистернах ЕПС води, спричинюючи гідрофічну дистрофію або жирову дистрофію ліпідів і ліпопротеїнів.

Біохімічно показано, що в каналцях глЕПС при отруєнні збільшується кількість ензимів, які відповідають за детоксикацію. Подібні зміни є неспецифічними й спостерігаються за дії афлотоксину, тетрахлористого вуглецю, ДДТ, диметилнітрозаміну, фосфору, прогестерону, при вірусних інфекціях або пухлинах (гепатома).

Атрофія, а потім і редукція глЕПС виникає при гострому або хронічному пошкодженні клітин різними отрутами й токсичними речовинами, а також при білковому голодуванні.

АПАРАТ ГОЛЬДЖІ

СТРУКТУРА Й ФУНКЦІЇ АПАРАТУ ГОЛЬДЖІ

Апарат Гольджі (або комплекс Гольджі) розташований біля клітинного центру та ядра. Це стос цистерн, проміжки між якими менші за товщину цистерн. Часто апарат Гольджі має форму кубка (рис. 10.8), зовнішнім боком якого є *цис-полюс*, або *поверхня формування*, а із внутрішнього боку містяться *транс-полюс* і секреторні пухирці. Основною його функцією є модифікація олігосахаридів, які входять до складу глікопротеїнів. Апарат Гольджі складається з трьох функціонально відмінних компартментів: *цис-*, *проміжного* та *транс-компартментів*. Також окремим функціональним компартментами є *транс-сітка Гольджі* (ТСГ) – трубчастий ретикулум, розташований біля транс-полюса апарату Гольджі та *цис-сітка Гольджі* (ЦСГ), аналогічне утворення біля цис-полюса органели. До складу комплексу входять також дрібні мембранні пухирці (пухирці Гольджі), які транспортують білки й ліпіди з одного компартменту в інший.

Усі компартменти апарату Гольджі мають біохімічні та функціональні особливості. Так, осмії забарвлює лише цистерни цис-компартменту, фермент нуклеозиддифосфатаза є маркерним

ферментом транс-компартменту, а кисла фосфатаза – ТСГ. Також у кожному з компартментів відбуваються притаманні лише йому реакції модифікації N-зв'язаних олігосахаридів (рис. 10.9). Саме тому в стосі апарату Гольджі (у рослин такий стос називають диктіосоною) не буває менше 3–4 цистерн. У тому разі, коли кількість цистерн перевищує 20, припускають, що один компартмент представлений кількома функціонально еквівалентними цистернами. Однак, можливо, що в цьому випадку має місце більш тонка спеціалізація окремих цистерн.

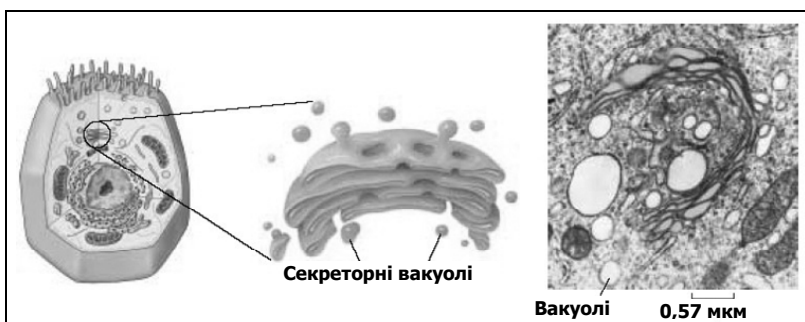


Рис. 10.8. Будова апарату Гольджі
(за Равеном П., Джонсоном Г., Сінгером С. та ін., 2005)

Перші етапи модифікації олігосахаридів відбуваються вже в цис-компартменті апарату Гольджі. Тут деякі з них зазнають фосфорилювання. Ця модифікація може кардинальним чином вплинути на подальшу долю глікопротеїну.

Частина глікопротеїнів має втратити більшу частину молекули N-зв'язаного олігосахариду. У цьому разі від вихідної молекули залишається лише "кор" (два залишки N-ацетилглюкозаміну й три – манози (рис. 10.9). Натомість до олігосахариду в наступних компартментах приєднується цілий ряд різноманітних олігосахаридів. У такий спосіб формуються "складні олігосахариди". Фосфорилювання окремих залишків може унеможливити процес утворення "складного олігосахариду", і тоді утвориться "олігосахарид, багатий на манозу", що зазнає порівняно мало змін під час свого утворення.

У проміжному компартменті локалізовані ферменти, які починають радикально переробляти олігосахаридний компонент глікопротеїнів (у першу чергу "складні олігосахариди"). Тут від олігосахариду відщеплюються декілька залишків манози. Замість неї до олігосахаридного остова приєднуються залишки N-ацетилглюкозаміну.

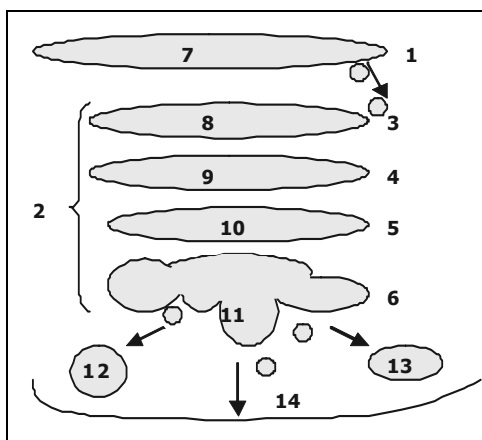


Рис. 10.9. Місця перебігу деяких реакцій модифікацій N-зв'язаних олігосахаридів: 1 – ЕПС; 2 – апарат Гольджі; 3 – цис-, 4 – проміжний і 5 – транс-компарменти апарату Гольджі; 6 – транс-сітка Гольджі; 7 – синтез білка; 8 – фосфорилування лізосомних олігосахаридів; 9 – видалення манози й додавання N-ацетилглюкозаміну; 10 – додавання галактози й сіалової кислоти; 11 – сортування; 12 – лізосома; 13 – секреторний пухирець; 14 – плазматична мембрана

Завершується утворення "складного олігосахариду" у транс-компаратменті апарату Гольджі, де до молекули олігосахариду додається галактоза й сіалова (N-ацетилнейрамінова) кислота. Остання є надзвичайно важливою для глікопротеїнів, оскільки є єдиним їхнім компонентом, що має власний негативний заряд.

У транс-сітці Гольджі відбувається сортування молекул білків і глікопротеїнів, їхній розподіл на такі, що ввійдуть до складу лізосом; що мають негайно покинути клітину завдяки механізму

конститутивного екзоцитозу (див. нижче); що ввійдуть до складу секреторних гранул і залишать клітину лише у відповідь на певний зовнішній сигнал.

Також у ТСГ відбувається процес *обмеженого протеолізу* білкових продуктів. Такої процедури зазнають невеликі молекули, скажімо, енкефаліни, що просто не можуть бути синтезовані на рибосомах у дозрілій олігопептидній формі. Обмеженому протеолізу піддаються також активні ферменти, які мають почати працювати лише за межами клітини. У деяких білках, наприклад інсуліні, значна частина молекули на початкових етапах відіграє структурну роль і забезпечує правильне її згортання та утворення дисульфідних містків. Для активації ж дозрілого продукту потрібно видалити більшу частину молекули. Активна форма інсуліну складається із двох невеликих поліпептидів, з'єднаних між собою двома дисульфідними містками. Саме утворення цих містків є можливим лише за наявності великої молекули, у якій обидва поліпептиди інсуліну з'єднані великим поліпептидним ланцюгом (рис. 10.10).

Обмежений протеоліз може приводити також до синтезу кількох різних молекул з різною функціональною активністю. Так, АКТГ, α - і β -МСГ, мет-енкефалін, β -ліпотропін і деякі інші біологічно активні молекули синтезуються шляхом протеолізу молекули-попередника проопіомеланокортину.

В апараті Гольджі відбуваються також інші реакції, зокрема О-глікозилювання (приєднання олігосахаридних залишків до -ОН груп серину та треоніну). Також тут утворюються сфінголіпіди: приєднання холінового залишку до кераміду приводить до утворення сфінгомієліну, а глікосфінголіпіди виникають у результаті глікозилювання кераміду. Також у апараті Гольджі відбувається збирання протеогліканів позаклітинного матриксу.

Окремою проблемою є перенесення білків і глікопротеїнів із одного компартменту в інший. Установлено, принаймні для деяких речовин, що загальним правилом (*по замовчанню*) є постійне перенесення білків і глікопротеїнів за маршрутом: ЕПС → цис-компартмент → проміжний компартмент → транс-компартмент → ТСГ → облямовані пухирці → плазмолема.

Пройшовши цей шлях, глікопротеїн виводиться назовні внаслідок *конститутивного екзоцитозу* – процесу, який відбувається у клітині постійно. У результаті за межі клітини виводяться молекули, які є складовими позаклітинного матриксу (муцини та глікопротеїни), білки й глікопротеїни глікокаліксу та плазмолемі, спеціальні білки, які забезпечують приєднання клітини до субстрату, а також дефектні чи аномальні форми білків.

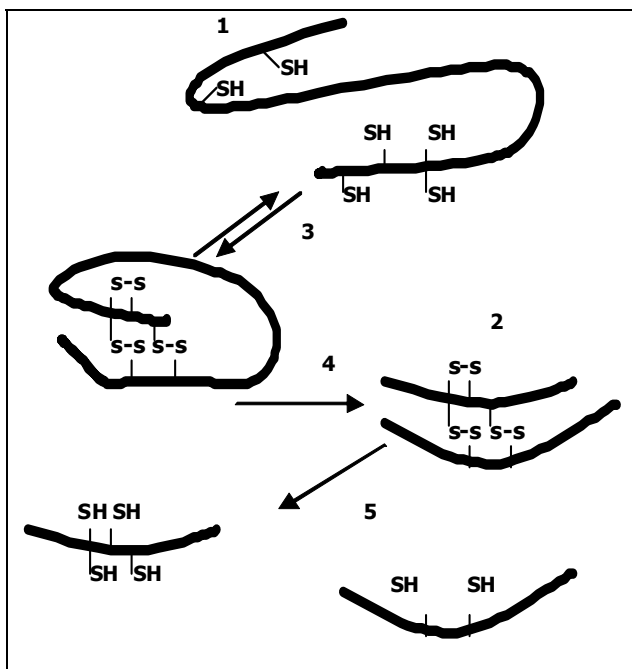


Рис. 10.10. Посттрансляційний процесинг молекули інсуліну:

- 1 – проінсулін; 2 – інсулін; 3 – згортання білкової молекули з утворенням конформації, яка стабілізується дисульфідними зв'язками;
- 4 – видалення сполучного пептиду дає готову молекулу інсуліну, що складається із двох ланцюгів; 5 – відновлення приводить до необоротного розділення двох ланцюгів

(за Альбертсом Б., Джонсоном А.,
Левісом Дж. та ін., 2002)

Разом з описаним нерегульованим шляхом існують і такі, для проходження по яких необхідний той чи інший сигнал та/або маркер. Так, білки, що мають потрапити в лізосоми фіброblastів, повинні нести на своїй поверхні манозо-6-фосфатну (М-6-Ф) групу. Цей маркер утворюється у цис-компартменті апарату Гольджі при фосфорилуванні N-зв'язаного олігосахаридного залишку.

Якщо ж із якихось причин цей маркер не може утворитися (скажімо, при дефекті ферменту, який здійснює фосфорилування, або мутації в гені самого лізосомного білка, або при дефекті в рецепторних молекулах ТСГ, що мають розпізнати М-6-Ф), лізосомні білки не потрапляють у лізосоми, проте їх можна виявити в зовнішньому середовищі. Тобто в цьому разі молекули виводяться назовні шляхом конститутивного екзоцитозу. Цікаво, що при І-клітинній хворобі (від англ. *inclusion cell disease*), викликаній саме пошкодженням ферменту, що утворює М-6-Ф, N-зв'язаний олігосахарид, який у нормі залишається багатим на манозу, зазнає перетворень, як "складний".

За нормальних умов М-6-Ф-маркер розпізнається у ТСГ специфічними рецепторами, які збираються разом і переносять лізосомні білки та глікопротеїни до складу *клатринових облямованих пухирців*. Після розбирання клатринової облямівки ці пухирці можуть злитися з лізосомами і передати їм пул необхідних білків і глікопротеїнів. При цьому М-6-Ф-рецептори не залишаються у складі лізосом назавжди, а знову "об'єднуються разом" і відокремлюються від лізосоми з утворенням нового клатринового пухирця, який здатен перенести М-6-Ф-рецептори назад до ТСГ. Механізм такого "повернення мембран" зображено на рис. 10.11.

Слід зауважити, що М-6-Ф є не єдиним маркером лізосомних білків. Під час І-клітинної хвороби, про яку йшлося вище, порушується транспорт ферментів лише в лізосоми фіброblastів, але не в лізосоми клітин печінки. З іншого боку, аналогічні порушення виявляються і при інших хворобах накопичення, наприклад при хворобі Тея – Сакса, за якої у клітинах відсутній фермент гексозамінідаза А. Це свідчить про множинність механізмів адресування білків у АГ.

Завдяки іншим сигналам білки та глікопротеїни можуть опинитися в секреторних гранулах. Ще один тип маркера потребу-

ють клітини, у яких різні частини плазмолемми розрізняються за хімічним складом і специфікою функціонування. Прикладом подібних клітин є епітеліальні. У них чітко розрізняється апікальна (звернена до порожнин, скажімо, до порожнини кишки) і базолатеральна (що контактує з внутрішнім середовищем організму) поверхні. При цьому, якщо на одну з поверхонь ще можна виводити продукти конститутивним шляхом, то для виведення речовин на іншу потрібен спеціальний сигнал. Наявність розбіжностей між цими двома поверхнями демонструють віруси, котрі використовують білоксинтезуючу систему клітини для утворення і виведення в зовнішнє середовище своїх копій. Так, вірус грипу виводиться лише на апікальну поверхню, а вірус везикулярного стоматиту – лише на базолатеральну.

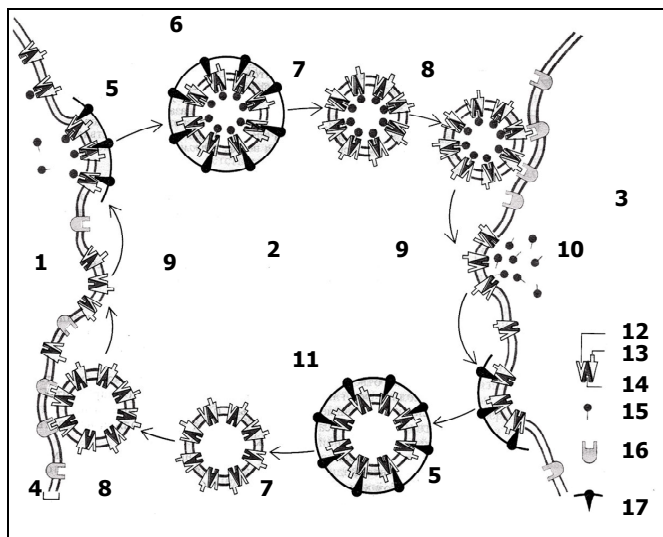


Рис. 10.11. Механізм перенесення лізосомних гідролаз від ТСГ до лізосом і повернення рецепторів М-6-Ф на мембрани ТСГ:

- 1 – порожнина апарату Гольджі; 2 – цитозоль; 3 – порожнина лізосоми;
 - 4 – ліпідний бішар; 5 – відокремлення; 6 – завантажений облямований транспортний пухирець; 7 – "роздягання"; 8 – стикування; 9 – злиття;
 - 10 – доставлений вантаж; 11 – порожній облямований транспортний пухирець;
 - 12 – клатриновий акцептор; 13 – маркер стиковки; 14 – рецептор для молекули "вантажу"; 15 – молекула "вантажу";
 - 16 – акцептор для маркера стиковки; 17 – молекула клатрину
- (за Альбертсом Б., Джонсоном А., Левісом Дж. та ін., 2002)

Іноді необхідно, щоб білок залишився в певному компартменті. У цьому разі його молекула повинна містити той чи інший "сигнал утримання", що розпізнається рецепторами в потрібному компартменті. Це явище отримало назву **механізм селективного утримання**.

Більшість білків АГ є трансмембранними білками, що мають N-кінцевий домен з цитоплазматичного боку (на Р-поверхні мембрани) та каталітичний домен у порожнині органели (на Е-поверхні). Утриманню таких білків у АГ може сприяти утворення ними олігомерних комплексів, які унеможливають їхнє потрапляння до везикул. Іншим сприятливим фактором є довжина гідрофобної ділянки трансмембранного білка. У межах секреторного шляху (від ЕПС до плазмолеми) у мембранах поступово збільшується вміст холестеролу. Серед іншого, це викликає поступове зростання товщини мембрани, зокрема її внутрішньої гідрофобної частини. Транспорт трансмембранних білків у межах цієї системи буде йти доти, поки довжина гідрофобної ділянки трансмембранного білка не зрівняється з товщиною гідрофобної зони мембрани. Подальший рух буде заблокований гідрофільними амінокислотами, що обмежують гідрофобний трансмембранний домен, оскільки їхнє включення до гідрофобної ділянки бішару є енергетично не вигідним процесом.

За точність потрапляння та утримання відповідних білків у різних субкомпартментах АГ відповідають два механізми. Перший механізм забезпечується Ras-подібними ГТФазами (Rabs), відповідниками яких у ссавців є Rab-білки, другий – **білками утримання**.

Rab-білки, як і інші молекулярні перемикачі, існують у ГТФ та ГДФ-зв'язаних формах. Активною при цьому є ГТФ-зв'язана форма. Зауважимо, що для кожного компартменту притаманна своя форма Rab-білка, що забезпечує специфічність розпізнавання мембран.

Білки утримання є ефекторами Rab. Вони відповідальні за початкові етапи зв'язування везикули та мембрани-мішені. Часто мають фібрилярну форму. Прикладами таких білків є *джіантин* (на везикулі) та GM130 (на мембрані-мішені). Поряд з утримувальними білками з фібрилярною структурою існує родина великих мульти-

протеїнових комплексів, що також відповідають за адресування везикул. Це, зокрема, TRAPP, розташований на цис-боці АГ, комплекс COG, відповідальний за транспортні процеси між окремими цистернами АГ. Подібним до них є комплекс *екоцист*, що міститься на плазмалемі та відповідає за взаємодію пухирців, які пройшли АГ та "дійшли" до плазмалеми.

ЗМІНИ АПАРАТУ ГОЛЬДЖІ ПРИ ПАТОЛОГІЇ

Морфологічні прояви порушень секреторної функції апарату виявляються у вигляді гіпертрофії, гіперплазії або атрофії.

Гіпертрофія апарату Гольджі виявляється у збільшенні площі його мембран і кількості секреторних гранул за рахунок гіперплазії мембран, через що підвищується секреція білків, глікопротеїнів і полісахаридів. При цьому зростає кількість секреторних гранул і везикул у цитоплазмі за межами апарату Гольджі. Як правило, гіпертрофія останнього поєднується з гіперплазією ЕПС. Коли ж синтез тих або інших речовин є більшим за можливість їхньої секреції та виведення, ці речовини вибірково накопичуються в гіпертрофованому апараті Гольджі, що може спричинити його пошкодження. Таким є, наприклад, накопичення жовчі в апараті Гольджі гепатоцитів при холестазі (зупинці виведення жовчі із жовчних протоків).

Атрофія апарату Гольджі супроводжується зниженням його функціональної активності та редукцією (зменшенням) кількості й навіть повною втратою секреторних гранул і вакуоль. Однією із причин такого зниження може бути недостатність білкових запасів у організмі (білкове голодування), за якого спостерігається також атрофія ЕПС. Іншою причиною зниження функції апарату Гольджі є пошкодження клітинного конвеєра, тобто порушення взаємодії з ЕПС. У таких випадках розвивається гіперплазія ЕПС і підвищується її функціональна активність, а в цитоплазмі з'являється багато секреторних гранул і вакуоль.

ЛІЗОСОМИ

СТРУКТУРА, ФУНКЦІЇ ТА ТИПИ ЛІЗОСОМ

Структура лізосом

Лізосомами називають одномембранні органели – невеликі мембранні везикули, наповнені гідролітичними ферментами, необхідними для контрольованого внутрішньоклітинного розщеплення макромолекул. Понад 40 ферментів, виявлених у лізосомах (це різноманітні нуклеази, протеази, глікозидази, ліпази, фосфатази, сульфатази, фосфоліпази тощо) належать до групи кислих гідролаз, найактивніших при рН 5,0. Саме такий рівень рН виявляється в "робочих" лізосомах. Необхідність підтримання кислого середовища у лізосомах зумовлює наявність у їхніх мембранах специфічних протонних насосів, що працюють з використанням енергії АТФ. Такі витрати виправдані, оскільки при порушенні цілісності лізосомної мембрани більш лужне середовище в цитозолі автоматично "вимикає" гідролітичні ферменти, які за інших умов були б для клітини дуже небезпечними.

Захист від перетравлення лізосомними протеазами своїх власних, лізосомних, білків забезпечується високим рівнем глікозилюваності останніх. До того ж деякі гідролітичні ферменти зв'язані з мембраною лізосоми у такий спосіб, що не можуть досягти своїми активними центрами мембранних білків.

Лізосоми є складною, гетерогенною популяцією цитоплазматичних структур, які мають на перший погляд відносно просту будову, яка нагадує вакуолю. Поліморфізм лізосом визначається їхнім призначенням – виконанням функції своєрідної внутрішньоклітинної травної системи, характерними рисами якої є дискретний характер, постійна мінливість та безперервна взаємодія. Крім того, лізосоми тісно пов'язані з процесами ендо- й екзоцитозу, аутофагії, секреції та кринофагії.

Сучасні уявлення про генез лізосом ґрунтуються на численних дослідженнях, виконаних за допомогою різних методологічних

підходів, що об'єднують як методи електронної мікроскопії, цитохімії та радіоавтографії, так і прийоми біохімічного аналізу.

Класифікація лізосом

За класифікацією Де Дюва (1971) лізосоми можна поділити на три головні підгрупи – прелізосоми, власне лізосоми та пост-лізосоми.

До *прелізосом* відносять утворені шляхом ендоцитозу гетерофагосоми (фагосоми, ендоцитозні вакуолі, периферійні ендосоми, ранні ендосоми, фагоцитозні, піноцитозні, травні вакуолі в одноклітинних) та утворені в процесі аутофагії аутофагосоми (аутофагічні та аутолітичні вакуолі, аутофагічні тільця, сегресоми, цитосегресоми, цитолізосоми, ділянки вогнища розпаду). Їхньою характерною рисою є відсутність лізосомних ферментів: як гетеро-, так і аутофагосоми містять лише речовини, призначені для перетравлення, але не мають у своєму складі гідролаз (рис. 10.12).

Власне лізосоми поділяють на дві великі підгрупи – первинні та вторинні.

Первинні лізосоми (протолізосоми, перинуклеарні ендосоми, гранули накопичення, щільні тільця, цитоплазматичні гранули лейкоцитів, кортикальні гранули овоцитів, інколи пухирці Гольджи тощо) є новоутвореними структурами, які містять лише недавно синтезовані ферменти (гідролази), але не залучені до процесу перетравлення певних речовин.

Вторинні лізосоми, на відміну від первинних, мають у своєму складі як гідролази, так і речовини, призначені для перетравлення, частково перетравлені речовини або їхні рештки. Оскільки речовини, що залучаються до процесу перетравлення, можуть бути екзогенного та ендогенного походження, то й вторинні лізосоми відповідно поділяють на *вторинні лізосоми гетерофагічного типу* (гетеролізосоми, гетерофаголізосоми, фаголізосоми, перетравлювальні вакуолі) та *аутофагічного типу* (аутолізосоми, аутофаголізосоми, цитолізосоми, аутофагічні вакуолі).

Аутофаголізосоми мають особливості формування. Якщо інші типи вторинних лізосом утворюються шляхом злиття пер-

винних лізосом та ендосом, то аутофагосоми – за рахунок об'єднання первинних лізосом та складного комплексу, що формується навколо матеріалу, що зазнає аутофагії (мітохондрії тощо). Оболонка аутофагосоми утворюється шляхом злиття невеликих мікропухирців, що відшнуровуються від АГ навколо матеріалу, що зазнає автолізу. Іншим донором мембран для аутофагосом може виступати гЛЕПС.

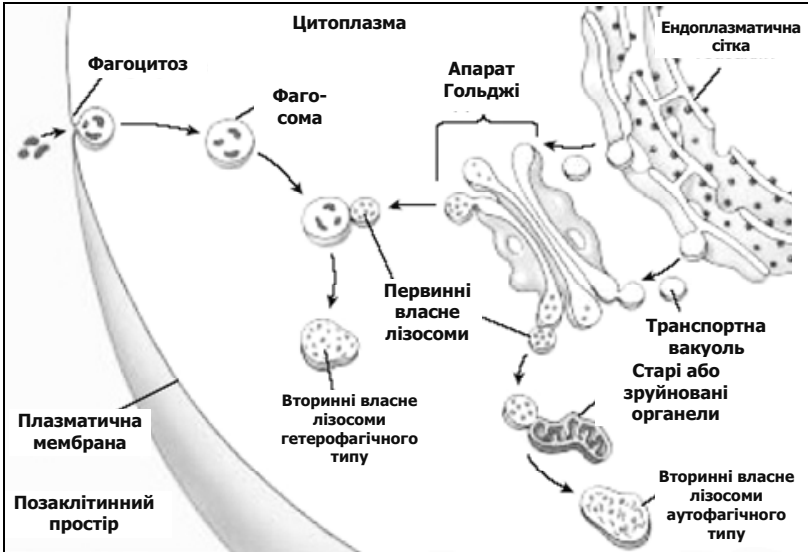


Рис. 10.12. Біогенез лізосом

(за Равеном П., Джонсоном Г., Сінгером С. та ін., 2005)

Вторинні лізосоми як гетеро-, так і аутофагічного типу також диференціюють залежно від стадії перетравлення замкненого в них матеріалу на *ранні* та *пізні гетеро-* й *аутолізосоми*. При цьому, якщо в ранніх вторинних лізосомах, особливо аутолізосомах, ще чітко розпізнається структура перетравлюваного матеріалу (у випадку аутолізосом – структура сегрегованих мітохондрій, фрагментів ендоплазматичного ретикулума тощо), то в пізніх вторинних лізосомах їхні структурні особливості вже неможливо диференціювати. Необхідно відмітити, що пізні ге-

теро- та аутолізосоми внаслідок численних взаємодій як одна з одною, так і з первинними лізосомами часто набувають вигляду **мультивезикулярних тілець**.

Найпізніша стадія морфогенезу вторинних лізосом обох типів характеризується поступовим накопиченням у них неперетравлених решток. На цій стадії вторинні лізосоми прийнято називати **телолізосомами**.

До **постлізосом** (третинних лізосом, мультивезикулярних тілець) належать вакуолеподібні структури, які мають у своєму складі лише неперетравлений матеріал як екзогенного, так і ендогенного походження й не містять гідролітичних ферментів (залишкові тільця, інколи – щільні тільця, мієліноподібні фігури, ліпофусцинові гранули).

Фізіологічні функції лізосом

Нині є безсумнівним, що лізосоми залучені до численних внутрішньоклітинних процесів і виконують при цьому важливі фізіологічні функції. До функцій, пов'язаних з гетерофагічним процесом, відносять участь лізосом у внутрішньоклітинному перетравленні біополімерів, у лізисі мікроорганізмів і вірусів (захисна функція), у початковій стадії імуногенезу та в біосинтезі біологічно активних речовин. А до функцій, пов'язаних з аутофагічним процесом – участь лізосом у ферментативному "очищенні" клітин від структур і макромолекул, які втратили функціональне значення, у процесах ембріонального та постембріонального розвитку (у процесах клітинного диференціювання, регресії, інволюції тощо), у регуляції рівня секреції (кринографія), в утилізації надлишку акумуляованих у клітині поживних речовин, в ендогенному живленні при дефіциті поживних речовин (реконструктивна функція), у початковій стадії імуногенезу.

Розглядаючи лізосоми в еволюційному плані, можна переконалися, що в найпростіших одноклітинних переважають явища гетерофагічного типу, а з їхнім розвитком поступово зростає значення аутофагічних процесів у клітинах високо розвинених організмів.

Мембрани лізосом мають ряд унікальних властивостей, що відповідають специфічним функціям цих органел. З одного боку, у межах лізосом мають перетравлюватися фрагменти клітин

та цілі клітини, включно з мембранами, що входять до їхнього складу. З іншого боку, необхідно забезпечувати цілісність мембран самих лізосом. Серед білків мембрани лізосом виділено дві групи (розмірами близько 100–120 кД), які отримали назви Igp A та Igp B. Це монотопні інтегральні білки, більша частина яких спрямована до порожнини лізосоми. Їхньою особливістю є високий ступінь глікозилюваності. Само по собі глікозилювання не забезпечує абсолютний захист мембрани, але суттєво зменшує ступінь руйнування білка, захищаючи мембрану від дії ферментів, що не мають специфічності до розкладання глікозидних частин Igp A та Igp B. Ферменти, які мають таку специфічність розташовуються безпосередньо у мембранах лізосом, що унеможлиблює її руйнування.

ЗМІНИ ЛІЗОСОМ ПРИ ПАТОЛОГІЇ

Фізіологічна і патологічна активність лізосом залежить головним чином від двох факторів:

- стану (стабільності) мембран лізосом;
- активності їхніх ферментів.

Патологія лізосом пов'язана з дестабілізацією лізосомних мембран і лізосомними ферментопатіями, які приводять до накопичення у клітині деяких початкових або проміжних продуктів обміну речовин.

Дестабілізація мембран лізосом. Дестабілізацію (лабілізацію) мембран лізосом можуть зумовити впливи різних речовин і агентів – *лабілізаторів* мембран лізосом (скажімо, вітамінів А, D, К тощо). Пошкоджуючий вплив на мембрани лізосом можуть справляти деякі мікотоксини, різні канцерогенні речовини, фосфоліпази, активатори і продукти перекисного окиснення, діоксид кремнію. Дестабілізацію мембран лізосом можуть викликати гіпоксія, порушення кислотно-лужної рівноваги, голодування, білкова недостатність, зміни гормонального статусу, шок, травми, а також великі оперативні втручання.

Дестабілізація (лабілізація) лізосомних мембран визначається появою тріщин і розривів. У цих випадках гідролази дифундують у клітину, що приводить до її некрозу або прогресуючого руйнування шляхом самоперетравлення.

Антагоністами лабілізаторів лізосомних мембран є їхні **стабілізатори**, які захищають їх від зовнішнього впливу. До них належать холестерол, кортикоїди, вітамін Е в малих дозах, антигістамін, речовини, які здатні підвищувати резистентність клітин.

Серед патологічних станів, пов'язаних із пошкодженням лізосомних мембран, найбільш вивченими є хвороби суглобів. Важливу роль у їхньому патогенезі відіграють комплекси ферментів, які вивільнюються з лізосом. Здебільшого це кислі гідролази, передусім протеази типу катепсину Д, які здатні руйнувати глікопротеїнові структури хряща, а також глюкуронідази, колагенази і катіонні білки. Речовини, що стабілізують лізосомні мембрани (до них належать, наприклад, саліцилати – солі саліцилової кислоти, і серед них – аспірин), значно зменшують ступінь запалення.

Одним із перспективних напрямків лікування пухлин є розробка лікарських препаратів, які діють на лізосомні ферменти. Так, при застосуванні цитотоксину або його комбінацій з вітаміном А виявлено збільшення кількості лізосом у клітинах, активація кислої фосфатази та вихід її в цитоплазму, що приводить до виникнення дистрофічних змін у клітинах пухлин і затримує їхній ріст.

Хвороби накопичення. Серед спадкових хвороб, пов'язаних із порушенням функції лізосом, які називають **лізосомними хворобами**, перш за все слід назвати спадкові лізосомні ензимопатії. Вони є наслідками первинних генних мутацій і проявляються недостатністю чи повною відсутністю певного ферменту або синтезом білкових молекул із зниженою біокаталітичною активністю. Дефект (або відсутність) одного чи декількох лізосомних ферментів приводить до накопичення у клітині речовин. Тому спадкові лізосомні ензимопатії віднесені до групи **хвороб накопичення, або тезаурисмозів.**

Група спадкових лізосомних ензимопатій досить велика. Вона включає глікогенози (хвороба Помпе), гангліозидози (хвороби Тея – Сакса, Сандхофа, ювенільний гангліозидоз), гепатози (хвороби печінки, за яких виявляється дистрофія паренхіми внаслідок первинного порушення обміну речовин у гепатоцитах), ожиріння (недостатність ліпаз адипоцитів).

Спадкові паренхіматозні диспротейнози. До групи паренхіматозних диспротейнозів належить ряд дистрофій, в основі яких лежать порушення внутрішньоклітинного метаболізму деяких амінокислот через спадкову недостатність ферментів, тобто внаслідок спадкової ферментопатії. Такі дистрофії відносять також до хвороб накопичення. Найяскравішими прикладами спадкових дистрофій, пов'язаних з порушенням внутрішньоклітинного метаболізму амінокислот, є цистиноз, тирозиноз, фенілпіровиноградна олігофренія (фенілкетонурія) (табл. 10.3).

Таблиця 10.3

Види спадкових дистрофій, пов'язаних з порушенням внутрішньоклітинного метаболізму амінокислот

Назва	Дефіцит ферменту	Локалізація накопичень амінокислоти
Цистиноз	Невідомий	Печінка, нирки, селезінка, очі, кістковий мозок, лімфатичні вузли, шкіра
Тирозиноз	Тирозинамінотрансфераза, або оксидаза параоксифенілпіровиноградної кислоти	Печінка, нирки, кістки
Фенілпіровиноградна олігофренія	Фенілаланін-4-гідроксилаза	Нервова система, м'язи, шкіра, кров, сеча

Спадкові ліпідози. До групи спадкових ліпідозів слід віднести системні ліпідози, які виникають унаслідок спадкового дефіциту ферментів, що беруть участь у метаболізмі певних ліпідів (табл. 10.4). Системні ліпідози належать до спадкових ферментопатій (хвороби накопичення), оскільки дефіцит ферменту означає накопичення субстрату, тобто ліпідів, у клітинах.

Залежно від типу ліпідів, накопичуваних у клітинах, розрізняють: цереброзидліпідоз (хвороба Гоше), сфінгомієлінліпідоз (хвороба Німанна – Піка), гангліозидліпідоз (хвороба Тея – Сакса), генералізований гангліозидоз (хвороба Нормана – Ландінга) та ін. Найчастіше ліпіди накопичуються в печінці, селезінці, кістковому мозку, ЦНС і нервових сплетеннях. При цьому з'являються характерні для того чи іншого типу ліпідозу клітини (клітини Гоше, Піка), що має діагностичне значення при вивченні біопатів.

Таблиця 10.4

Хвороби, пов'язані з накопиченням ліпідів у клітинах

Назва хвороби	Дефіцит ферменту	Локалізація	Діагностичний критерій при біопсії
Гоше – цереброзидліпідоз	Глюкоцереброзидаза	Печінка, селезінка, кістковий мозок, ЦНС (у дітей)	Клітини Гоше
Німанна – Піка (сфінгомієлінліпідоз)	Сфінгомієліназа	Печінка, селезінка, кістковий мозок, ЦНС	Клітини Піка
Тея – Сакса (гангліозидліпідоз)	Гексозамінідаза	ЦНС, нервові сплетення, печінка, селезінка	Зміни сплетення Мейснера
Норманна – Ландінга (генералізований гангліозидоз)	β -галактозидаза	ЦНС, нервові сплетення, печінка, селезінка, кістковий мозок, нирки	Відсутній
Фабрі (або Андерсона – Фабрі)	α -галактозидаза А	Шкіра, рогівка, серце, нирки	Клітини нирки, лізосоми яких заповнені субстратом, що не розкладається

Спадкові глікогенози. Спадкові вуглеводні дистрофії, в основі яких лежать порушення обміну глікогену, називаються глікогенозами. Вони зумовлені відсутністю або недостатністю ферменту, який бере участь у розщепленні глікогену, що депонується (тому глікогенози відносять до спадкових ферментопатій, або хвороб накопичення). На сьогодні добре вивчено шість

типів глікогенозів, зумовлених спадковою недостатністю шістьох різноманітних ферментів. Це хвороби Гірке (I тип), Помпе (II тип), Мак-Ардля (V тип) і Герса (VI тип), за яких структура глікогену, що накопичується у тканинах, не порушується, і хвороби Форбса – Корі (III тип) та Андерсена (IV тип) – у цьому разі вона різко змінюється.

Морфологічна діагностика глікогенозу того чи іншого типу можлива при дослідженні біопсії за допомогою гістоферментних методів, а також з урахуванням локалізації накопичень глікогену (табл. 10.5).

Таблиця 10.5

Типи глікогенозів

Назва хвороби	Дефіцит ферменту	Локалізація накопичень глікогену
Без порушення структури глікогену		
Гірке (I тип)	Глюкозо-6-фосфатаза	Печінка, нирки
Помпе (II тип)	Кисла α -глюкозидаза	Гладенькі та скелетні м'язи, міокард
Мак-Ардля (V тип)	Система фосфорилаз м'язів	Скелетні м'язи
Герса (VI тип)	Фосфорилаза печінки	Печінка
Із порушенням структури глікогену		
Форбса – Корі, ліміт-декстриноз (III тип)	Аміло-1,6-глюкозидаза	Печінка, м'язи, серце
Андерсена, амілопектиноз (IV тип)	Аміло-(1,4-1,6)-трансглюкозидаза	Печінка, селезінка, лімфатичні вузли

Вираз "лізосомні хвороби" відображає генетичний дефіцит лізосомних ферментів, а не власне пошкодження лізосом. Існує рідкісна хвороба Шедіака – Хігачі, у хворих на неї виявляються великі гранули в пошкоджених лізосомах нейтрофілів крові. Феномен накопичення в лізосомах міді й феритину при гемохроматозі лежить в основі хвороби Вільсона. Серед інших форм лізосомних хвороб слід згадати різні мукополісахаридози (синдром Гурлера, синдром Гурлера – Шая, синдром Гунтера, недостатність β -глюкуронідази); глікопротеїнози (фукозидоз, недоста-

тність α -манозидази та β -нейроамінідази, сіалоліпідоз, галактосіалідоз, аспартилглюкозамінурія); порушення транспорту лізосомних ферментів (*i*-клітинна хвороба, псевдополідистрофія Гурлера) та лізосомної мембрани (дитяча хвороба накопичення вільної сіалової кислоти), а також інші порушення (хвороба Волмана, хвороба накопичення ефірів холестеролу, недостатність кислої мальтази, або хвороба Помпе).

Запитання для самоперевірки

1. Які види ендоплазматичної сітки ви знаєте? Які їхні функції?
2. Що таке саркоплазматична сітка? У яких клітинах вона є? Опишіть її функції в цих клітинах.
3. Що таке тигроїд?
4. Дайте порівняльну характеристику гладенької та гранулярної ендоплазматичної сітки.
5. Що таке проміжний ретикулум (проміжна ендоплазматична сітка)?
6. Що таке ергастоплазма? Про що свідчить її наявність у клітині?
7. Як на електроннограмі відрізнити гранулярну ендоплазматичну сітку від гладенької, а також від інших органел клітини?
8. У клітині сильно розвинена гладенька ендоплазматична сітка. Про яку функцію клітини це свідчить?
9. Яка роль гладенької ендоплазматичної сітки у процесах детоксикації?
10. Синтез яких речовин активується у клітині при збільшенні кількості мембран гладенької ендоплазматичної сітки? Відповідь обґрунтуйте.
11. Поясніть, про що свідчить збільшення товщини й кількості цистерн гранулярної ендоплазматичної сітки.
12. Чим відрізняється синтез білків "на експорт" від синтезу трансмембранних білків плазмолемі?
13. У чому полягає різниця між синтезом білків "домашнього господарства" і синтезом білків для плазмолемі?
14. Чим відрізняється синтез білків "домашнього господарства" від синтезу білків на "на експорт"?
15. Яка будова та функції сигнал-розпізнавальної частки (СРЧ-частки)?
16. Що таке N-сигнальна послідовність? Яка її функція?
17. Як зміниться подальша доля пептиду, якщо під час його синтезу видалити N-сигнальну послідовність?
18. Як відбувається фіксація рибосом на ендоплазматичній сітці?

19. Із якими органелами пов'язаний синтез білкових гормонів у клітині? Відповідь обґрунтуйте.
20. У яких органелах клітини відбувається синтез мембранних ліпідів і збирання біомембран? Опишіть цей процес.
21. Які посттрансляційні модифікації білків відбуваються у гранулярній ендоплазматичній сітці?
22. Які сучасні уявлення про механізм транспорту поліпептидного ланцюга через мембрану гранулярної ендоплазматичної сітки?
23. Яких змін зазнає глЕПС при патології?
24. Яких змін зазнає грЕПС при патології?
25. Будова диктіосоми апарату Гольджі.
26. Які функції виконує комплекс Гольджі?
27. За допомогою мікроманіпулятора із клітини видалили апарат Гольджі. Що трапиться?
28. Як забезпечується компартменталізація апарату Гольджі?
29. Як розрізнити апарат Гольджі на електронограмі?
30. Що таке цис- та транс-полюси апарату Гольджі? Яка між ними різниця?
31. Чому в апараті Гольджі не може бути менше 3–4 цистерн?
32. Яка мінімальна кількість цистерн може бути у складі диктіосоми апарату Гольджі? Чому?
33. Біогенез апарату Гольджі.
34. Які процеси відбуваються у цис-компартменті апарату Гольджі?
35. Як здійснюється транспорт білків між цистернами апарату Гольджі?
36. Які процеси відбуваються у проміжному компартменті апарату Гольджі?
37. Які процеси відбуваються у транс-компартменті апарату Гольджі?
38. Які процеси відбуваються у транс-сітці апарату Гольджі?
39. Опишіть механізм сортування білків у апараті Гольджі.
40. Яка роль клатринових облямованих пухирців?
41. Які посттрансляційні модифікації білків відбуваються в апараті Гольджі?
42. Які органели беруть участь в утворенні секреторних гранул?
43. У яких компартментах клітини відбувається приєднання олігосахаридів до білків та їхня модифікація?
44. Яких змін зазнає апарат Гольджі при патології?
45. Як утворюються аутофагосоми? Яку функцію вони виконують?
46. Класифікація лізосом.
47. Чим відрізняються лізосоми різних типів?
48. Біогенез лізосом.
49. Які зміни відбуваються у клітині при порушенні мембрани лізосом?

50. Який рівень рН у лізосомах? Завдяки якому механізму він підтримується на цьому рівні? Яке це має значення для забезпечення функціонування лізосом?
51. Навіщо в мембрані лізосом є H^+ -насос (H^+ -помпа)?
52. Як відбувається руйнування пошкоджених чи старих частин клітини (органел, мембран тощо)?
53. Що таке первинні та вторинні власне лізосоми? Як вони утворюються?
54. Що таке постлізосоми? Як вони утворюються?
55. Чому при порушенні цілісності однієї чи декількох лізосом лізису клітини не відбувається?
56. У клітині виявлено велику кількість вторинних лізосом, залишкових тілець, фагосом. На якій функції спеціалізується ця клітина?
57. Які є порушення у клітині, якщо в ній накопичуються постлізосоми?
58. Як зміниться подальша доля пептиду, якщо в цис-цистерні апарату Гольджі до нього помилково не буде приєднаний манозо-6-фосфатний маркер?
59. У лізосомах клітин хворої людини немає кислих гідролаз. Проте вони виявляються в міжклітинній речовині. Яка можлива причина цього явища? Як воно називається?
60. У кровоносну судину щура ввели трипановий синій. У яких видах лізосом і в яких клітинах можна буде знайти цей барвник? Відповідь обгрунтуйте.

Рекомендована література

Фаллер Д. М. Молекулярная биология. Руководство для врачей / Д. М. Фаллер, Д. Шилдс. – М. : БИНОМ, 2006. – 256 с.

Загальна цитологія і гістологія: підручник / М. Е. Дзержинський, Н. В. Скрипник, Г. В. Островська та ін. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2010.

Клетки / под ред. Б. Льюина и др. ; пер. с англ. – М. : БИНОМ, Лаборатория знаний, 2011.

Ast T. All roads lead to Rome (but some may be harder to travel): SRP-independent translocation into the endoplasmic reticulum / T. Ast, M. Schuldiner // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. – 2013. – Vol. 48, № 3. – P. 273–288.

Behnke J. BiP and its nucleotide exchange factors Grp170 and Sil1: mechanisms of action and biological functions / J. Behnke, M. J. Feige, L. M. Hendershot // J. Mol. Biol. – 2015. – Vol. 427, № 7. – P. 1589–1608.

Lagace T. A. The role of phospholipids in the biological activity and structure of the endoplasmic reticulum / T. A. Lagace, N. D. Ridgway // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – Vol. 1833, № 11. – P. 2499–2510.

Melnyk A. Co-chaperones of the mammalian endoplasmic reticulum / A. Melnyk, H. Rieger, R. Zimmermann // *Subcell. Biochem.* – 2015. – Vol. 78. – P. 179–200.

Molecular Biology of the Cell / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis et al. – N. Y., 2013.

Molecular cell biology / H. Lodish, A. Berk, A. Kaiser et al. – N. Y., 2013.

Protein transport into the human endoplasmic reticulum / J. Dudek, S. Pfeffer, P. H. Lee et al. / *J. Mol. Biol.* – 2015. – Vol. 427. – P. 1159–1175.

Shao W. Expanding roles for SREBP in metabolism / W. Shao, P. J. Espenshade // *Cell. Metab.* – 2012. – Vol. 16, № 4. – P. 414–419.

Willett R. The Golgi puppet master: COG complex at center stage of membrane trafficking interactions / R. Willett, D. Ungar, V. Lupashin // *Histochem. Cell. Biol.* – 2013. – Vol. 140, № 3. – P. 271–283.

Розділ 11

ПЕРОКСИСОМИ

СТРУКТУРА Й ФУНКЦІЇ ПЕРОКСИСОМ

Пероксисоми (мікротільця) – це невеликі кулеподібні одно-мембранні органели, які на поодиноких зрізах мають вигляд мембранних пухирців діаметром до 0,5 мкм, проте часто можуть виявляти розгалужену будову, що було показано при дослідженні серійних зрізів. Характерною особливістю цієї групи органел є наявність *нуклеоїда* – електронощільної кристалоїдної структури всередині органели. Незважаючи на назву, ця структура не містить нуклеїнових кислот. Вона складається з ферменту уратоксидази та мікротрубочок (рис. 11.1). Відкриті пероксисоми були в 1965 р. К. де Дювом.

Пероксисоми є постійною складовою практично всіх еукаріотичних клітин. Проте їхні функції можуть суттєво відрізнятися в різних організмів і в різних типах тканин.

Подібно до мітохондрій, пероксисоми є одним із центрів утилізації кисню в клітині. Тут є декілька окиснювальних ферментів – *каталаза*, *оксидаза D-амінокислот*, *уратоксидаза*. Вважається, що пероксисоми є залишком давньої органели, що в анаеробних безмітохондріальних предків еукаріотів виконувала функції "захисту" від кисню. У цих організмів протопероксисома переводила кисень у пероксид водню (H_2O_2), який потім утилізувався в реакціях окиснення різних органічних речовин, у першу чергу – в окисненні кінцевих продуктів гліколізу. При цьому енергія, що виділялась під час подібних реакцій, для клітини втрачалася.

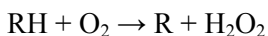
Наступна поява мітохондрій зробила протопероксисоми певною мірою непотрібними, оскільки більшість реакцій, які відбувалися в них без вироблення енергії, тепер за допомогою

окисного фосфорилювання в мітохондріях були спряжені з творенням АТФ. Однак, незважаючи на часткову втрату функцій, пероксисома залишилась важливою клітинною органелою, змінивши в процесі еволюції свою роль у клітинному метаболізмі.

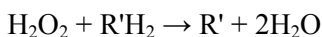


Рис. 11.1. Пероксисоми у клітині печінки щура (електронограма)
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Левісом Дж. та ін., 2002)

Пероксисома, як і її еволюційний попередник, опікується в клітині передусім реакціями синтезу й утилізації пероксиду водню. H_2O_2 утворюється у пероксисомі в результаті реакції



Потім каталаза (фермент, що становить до 40 % від загальної маси білка пероксисом) використовує H_2O_2 для окиснення різноманітних субстратів (фенолів, мурашиної кислоти, формальдегіду, спиртів) у реакції



Реалізація пероксисомою цих реакцій дає змогу знешкодувати отруйні для організму речовини й залучатися до реакцій

детоксикації. Відмітимо, що пероксисоми в зазначеному процесі тісно взаємодіють із глЕПС і мітохондріями. У клітинах печінки, які спеціалізуються на реакціях детоксикації, саме ці три органели виявляються в найбільшій кількості. Наприклад, у такий спосіб алкоголь у пероксисомах гепатоцитів перетворюється на оцтовий альдегід.

Слід зауважити, що коли в клітині накопичується надлишок H_2O_2 , пероксисома перетворює його в реакції



у якій утворюється кисень, проте він організму не загрожує, оскільки утилізується мітохондріями, з якими пероксисома, як правило, перебуває "в тісному контакті".

Залежно від потреб пероксисома може перемикатися з виконання однієї функції на виконання іншої. Клітини дріжджів, що вирощуються на середовищі з підвищеним вмістом метанолу, мають великі пероксисоми, які окиснюють метанол за описаною вище схемою. Якщо ж вирощувати дріжджі на культурі з високим вмістом жирних кислот, то пероксисоми починають розщеплювати їх на два фрагменти, які потім можуть перетворюються на ацетил-СоА. Продукти цього процесу (який називається β -окиснення ліпідів) можуть залишити пероксисому й бути використані для побудови інших необхідних клітині речовин.

У рослинному насінні пероксисоми виконують подібну функцію, беручи участь у гліюксилатному циклі (серії реакцій модифікованого циклу Кребса, які забезпечують перетворення жирів на цукри). Такий спеціалізований тип пероксисом називають *гліюксисомами* (рис. 11.2). Під час гліюксилатного циклу дві молекули ацетил-СоА, отримані під час розщеплення жирних кислот у процесі β -окиснення ліпідів, перетворюються на сукцинат, який потім виводиться із пероксисоми у цитозоль і там із нього синтезується глюкоза.

Загалом у пероксисомах міститься близько 50 ферментів, котрі беруть участь у різних метаболічних шляхах організму. Зокрема, там відбуваються перші два початкові етапи синтезу найбільш поширеного класу ліпідів мієліну – плазмалогенів (різновид фосфоліпідів, у яких у першому положенні наявна

не жирна кислота, а залишок спирту з довгим аліфатичним ланцюгом), що у високих концентраціях містяться у клітинах головного мозку та серця.

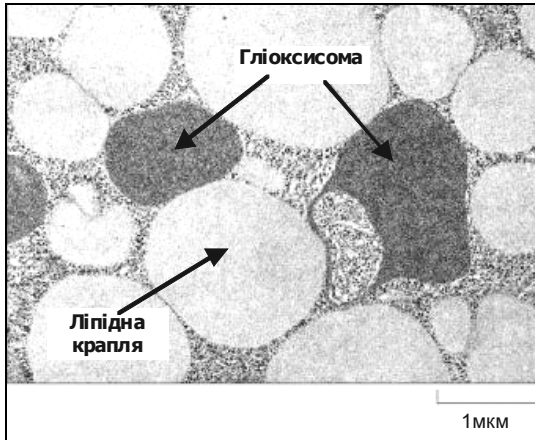


Рис. 11.2. Гліоксисоми в клітині сім'ядолі насіння томата (електронограма)
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Левісом Дж. та ін., 2002)

Унікальною є участь пероксисом у процесі фотодихання в рослин. Цей процес викликаний "помилкою" ферменту РуБіс-Ко, відповідального за фіксацію CO_2 . Іноді цей фермент помилково приєднує O_2 замість CO_2 . Виправляється помилка серією реакцій, що відбуваються у хлоропласті, мітохондрії та пероксисомі (рис. 11.3), які перебувають у функціональній взаємодії (так звана "тріада").

Отже, сучасні пероксисоми виконують ряд спеціалізованих функцій, пов'язаних з метаболізмом кисню та пероксиду водню, окисненням жирних кислот, детоксикацією отруйних речовин.

Пероксисоми не містять власного генетичного й білоксинтезуючого апарату, а також не входять до складу вакуолярної системи, оскільки не пов'язані процесами везикулярного транспорту з її органелами (ЕПС, апаратом Гольджі, лізосомами). Водночас показано, що нові пероксисоми утворюються шляхом поділу.

Ліпіди пероксисоми отримують завдяки діяльності білків-переносників ліпідів, здатних екстрагувати ліпіди з мембра-

ни глЕПС і переносити їх до інших органел. Фосфатидилхолін (чи фосфатидилсерин) надходить до пероксисоми безпосередньо від глЕПС, а фосфатидилетаноламін попередньо проходить обробку на зовнішній мембрані мітохондрії.

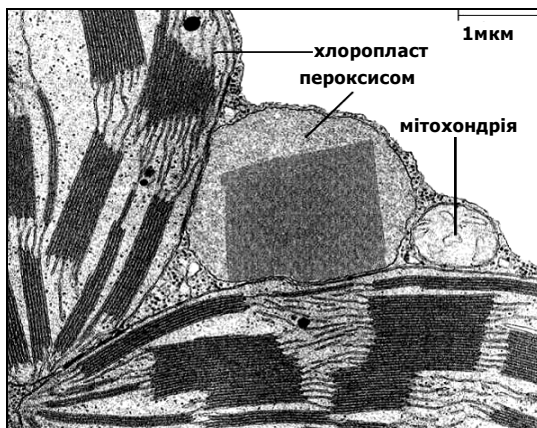


Рис. 11.3. Пероксисома, хлоропласт і мітохондрія у клітині листа тютюну (електронограма)
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Левісом Дж. та ін., 2002)

Білки пероксисоми отримують із цитозолу завдяки специфічним білкам-рецепторам для імпорту. Білки пероксисом (у тому числі й самі рецептори) утворюються на рибосомах у цитозолі. Усі вони містять специфічну послідовність амінокислот (у більшості випадків: серин-лізін-лейцин на С-кінці молекули), яка розпізнається рецепторами пероксисоми. На мембранах пероксисом містяться **білки-пероксини**, яких тепер відомо 23 види. Комплекс із шести різних пероксинів утворює мембранний **транслокон**. Після цього білок або "протягується" в порожнину пероксисоми, або вбудовується в її мембрану. Окремим випадком є пероксин Pex5, розчинний рецептор імпорту, який здатен проносити свій вантаж до пероксисоми, а потім, після його звільнення, повертатися до цитозолу. Традиційно вважалося, що пероксисома не може

утворитися *de novo*. Щоб почалося її збирання, потрібна хоча б одна пероксисома, яка спочатку збільшиться в розмірах, завдяки описаним процесам, а потім поділиться (рис. 11.4).

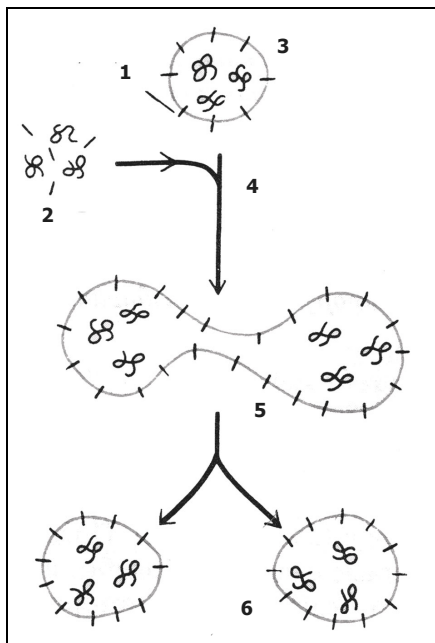


Рис. 11.4. Збирання й поділ пероксисом:

- 1 – специфічний білок-рецептор, який каталізує імпорт білків;
- 2 – захоплення специфічних білків цитозолу;
- 3 – пероксисома;
- 4 – ріст; 5 – поділ; 6 – дочірні пероксисоми

(за Альбертсом Б., Джонсоном А.,
Левісом Дж. та ін., 2002)

Останнім часом почали з'являтися нові дані, які вказують на можливість утворення пероксисом з ендоплазматичної сітки шляхом відокремлення окремих пухирців, що містять початковий набір необхідних для даної органели компонентів (своєрідна *пероксисомна везикула-попередник*). Однак блокування транспортних процесів через апарат Гольджі не запобігає потраплянню до пероксисоми принаймні деяких білків, а отже, поповнення пулу пероксисомальних білків може здійснювати-

ся без участі цієї органели. Дослідження білків-транслоконів пероксисоми показало, що ці трансмембранні білки мають ряд унікальних особливостей, зокрема здатність переносити окремі білки через мембрану у згорнутому стані. Завдяки наявності таких транслоконів є можливим наповнення практично пустих пухирців, утворених на ЕПС усім комплексом білків матриксу пероксисоми, що є необхідними для виконання цією органелою своїх функцій.

Отже, нові пероксисоми можуть утворюватися в результаті відокремлення та наступного злиття мікропухирців зі специфічними транслоконами, від ЕПС із наступним наповненням матриксу відповідними білками. У подальшому збільшена за розмірами пероксисома може поділитися.

Процес утворення пероксисом може бути "простимульований", скажімо, введенням препаратів, що знижують вміст деяких різновидів ліпідів (зокрема, ліпопротеїнів низької щільності) у тканинах організму. Припускають, що ці препарати можуть бути подібні до цитоплазматичних факторів, здатних переміщуватись у ядро і зв'язуватися з певними промоторними ділянками генів, які кодують цитоплазматичні рецептори стероїдних гормонів, ретиноевої кислоти та гормонів щитоподібної залози, а також генів, що кодують багато пероксисомних ферментів. Як наслідок, збільшується синтез цих білків та їхнє цілеспрямоване перенесення до існуючих пероксисом. Саме збільшення кількості білків в органелі й призводить до її наступного поділу.

ЗМІНИ ПЕРОКСИСОМ ПРИ ПАТОЛОГІЇ

При багатьох хворобах людини виявлено як кількісні, так і якісні зміни пероксисом.

Збільшення кількості пероксисом і підвищення каталазної активності в гепатоцитах і нефроцитах спричинюється цілим рядом медикаментозних препаратів з гіполіпопротеїнемічними властивостями, а в кардіоміоцитах – у разі тривалого вживання етанолу. Збільшення кількості пероксисом у гепатоцитах описано також при вірусному гепатиті.

Зменшення кількості пероксисом (особливо в гепатоцитах) спричинюється використанням речовин, які гальмують синтез каталаз, у людини виявляється при запальних та пухлинних процесах. Значні дефекти пероксисом виявлені при гіперліпідемії та гіперхолестеринемії (руйнування пероксисом відбувається шляхом аутолізу або аутофагії).

Зміни нуклеоїду та матриксу пероксисом. У людини патологічні зміни матриксу пероксисом виявляють при ішемічному некрозі та вірусному гепатиті. Стосовно нуклеоїду, то можлива як його деградація (при гепатоцеребральній дистрофії), так і новоутворення (при ідіопатичному холестази).

Пероксисомні хвороби. Сьогодні відомо ряд синдромів, які розглядають як спадкові пероксисомні хвороби: акаталаземія, цереброгепаторенальний синдром Целвегера, системна недостатність карнітину тощо.

Цереброгепаторенальний синдром Целвегера (Zellweger) характеризується відсутністю пероксисом у гепатоцитах; зниженням каталазної активності печінки до 20 і більше відсотків; редукцією ендоплазматичного ретикулума; атрофією і зменшенням кількості мітохондрій; збільшенням у гепатоцитах кількості гранул глікогену та ліпідних вакуоль. Головним клінічним проявом недостатності пероксисом є порушення синтезу жовчних кислот. Причиною захворювання може бути мутація гена, який кодує пероксин Pex2, інтегральний білок, що входить до складу транслокону. Відсутність білкового компонента пероксисом є важким порушенням. Пацієнти із синдромом Целвегера гинуть у дитячому віці. Також до важких порушень, що призводять до недостатності численних пероксисомних ферментів, належать дитяча хвороба Рефсума, гіперпіпеколова ацидемія, неонатальна форма адренолейкодистрофії.

У разі *цельвегероподібних порушень* вміст білків у пероксисомах є дещо більшим, а прояви порушень – зменшуються. Подібні порушення можуть бути викликані мутацією N-кінцевого сигнального пептиду деяких пероксисомних білків. Нестача кількох пероксисомних ферментів спостерігається також при ризомелічній точковій хондродисплазії.

Менш важкими є порушення, що захоплюють лише один із пероксисомних ферментів. Так, *акаталаземія* – захворювання, в основі якого лежить різке зниження активності каталази у клітинах печінки та інших органах унаслідок зниження її термостабільності. Основним клінічним проявом цього захворювання є гангренозна ротова порожнина, укрита виразками. Нестача одного ферменту (лігноцерил-СоА-лігази) є причиною аденолейкодистрофії. Іншими хворобами цієї групи є гіпероксалурія І типу, недостатність біфункціонального ферменту, недостатність глутарил-СоА-оксидази, синдром псевдо-Цельвегера (недостатність 3-оксоацил-СоА-тіолази), псевдонеонатальна аденолейкодистрофія (недостатність ацил-СоА-оксидази).

Система недостатності карнітину (вітамінної сполуки) характеризується міопатією з періодичними порушеннями функції печінки та головного мозку. Значний дефіцит карнітину виявляється у скелетних м'язах, печінці, плазмі крові, що супроводжується окисненням жирних. У клініці спостерігається міопатія з періодичними порушеннями функції печінки й головного мозку.

Запитання для самоперевірки

1. Які функції виконують пероксисоми?
2. Як можна на електронограмі відрізнити пероксисоми від лізосом у клітині?
3. Назвіть відомі вам ферменти пероксисом. Які функції вони виконують?
4. Який вигляд має нуклеоїд у пероксисомі на електронограмі? Із чого складається нуклеоїд?
5. Як відбувається окиснення субстратів у пероксисомах?
6. Яка роль пероксисом у β -окисненні ліпідів?
7. Яка роль пероксисом у процесах детоксикації?
8. Що таке гліоксилатний цикл? Де він відбувається?
9. Яку роль виконують пероксисоми в нейтрофілах?
10. Що таке пероксисомні хвороби?
11. Які пероксисомні хвороби ви знаєте?

Рекомендована література

Загальна цитологія і гістологія : підручник / М. Е. Дзержинський, Н. В. Скрипник, Г. В. Островська та ін. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2010.

Клетки / под ред. Б. Льюина и др. : пер. с англ. – М. : БИНОМ, Лаборатория знаний, 2011.

A central role for the peroxisomal membrane in glyoxylate cycle function / M. Kunze, I. Pracharoenwattana, S. M. Smith, A. Hartig // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – Vol. 1763, № 12. – P. 1441–1452.

Evaluation of the role of the endoplasmic reticulum-Golgi transit in the biogenesis of peroxisomal membrane proteins in wild type and peroxisome biogenesis mutant CHO cells / A. Toro, C. Arredondo, G. Cordova et al. // *Biol. Res.* – 2007. – Vol. 40, № 2. – P. 231–249.

Ma C. Peroxisome assembly: matrix and membrane protein biogenesis / C. Ma, G. Agrawal, S. Subramani // *J. Cell. Biol.* – 2011. – Vol. 193, № 1. – P. 7–16.

Molecular Biology of the Cell / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis et al. – N. Y., 2013.

Molecular cell biology / H. Lodish, A. Berk, A. Kaiser et al. – N. Y., 2013.

Origin and evolution of the peroxisomal proteome / T. Gabaldon, B. Snel, F. van Zimmeren et al. // *Biol. Direct.* – 2006. – Vol. 23, № 1. – P. 8–22.

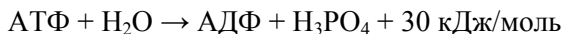
Розділ 12

СИСТЕМИ ЕНЕРГОЗАБЕЗПЕЧЕННЯ КЛІТИН

Відповідно до закону збереження енергії всі функції живого організму реалізуються за рахунок зовнішніх джерел енергії, які можуть бути двох типів. **Автотрофні організми** (прокаріоти й рослини) можуть утворювати органічні сполуки (насамперед вуглеводи з CO_2 і води) із неорганічних сполук, використовуючи як додаткове джерело енергії світло (фотосинтез у зелених рослин) або окиснення неорганічних сполук (хемосинтез у бактерій). **Гетеротрофні організми** (багато видів грибів і бактерій, а також усі тварини) самі не можуть створювати органічні сполуки з неорганічних, а повинні споживати органічні сполуки, створені автотрофними організмами, і використовувати енергію перенесення електронів при окисненні органічних субстратів (*дихання*).

Енергія не використовується у клітинах одразу, а спочатку запасастся у вигляді високоенергетичних (*макроергічних*) молекул, як правило, у формі **АТФ** (*аденозинтрифосфату*). АТФ складається із аденіну (пуринова сполука), рибози (5-вуглецевий цукор) та трьох молекул фосфорної кислоти (рис. 12.1). Фосфатні групи поєднані між собою так званими "високоенергетичними" зв'язками. Один такий зв'язок віддає під час його гідролізу 25–30 кДж/моль енергії – набагато більше, ніж при роз'єднанні звичайного фосфатного ефірного зв'язку (8–13 кДж/моль).

У результаті гідролітичного відщеплення однієї (кінцевої) фосфатної групи від молекули АТФ утворюється **аденозиндифосфат** (АДФ):



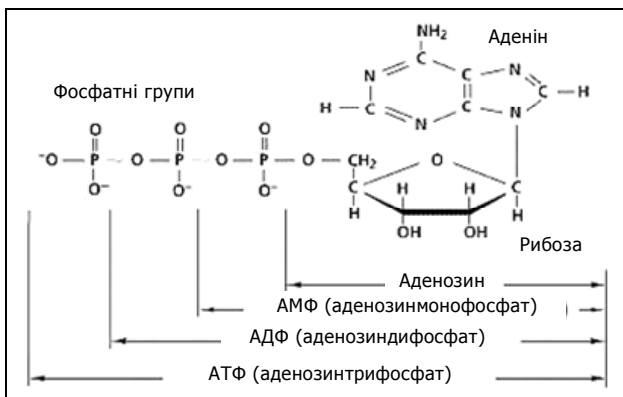
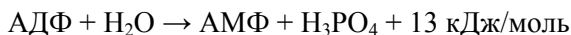


Рис. 12.1. Формула молекули аденозинтрифосфату (АТФ)

При відщепленні другої фосфатної групи утворюється **аденозинмонофосфат (АМФ)**, причому при від'єднанні останньої фосфатної групи вивільняється лише 13 кДж/моль:



АТФ є універсальним носієм енергії для забезпечення будь-яких клітинних процесів: активного транспорту речовин, синтетичних процесів, механічної роботи тощо. АТФ здатна до дуже швидкого відновлення. У людини кожна молекула АТФ розщеплюється й знову відтворюється 2 400 разів на добу, отже, середня тривалість її життя становить менше 1 хвилини.

У клітинах тварин синтез АТФ відбувається у спеціальних органах – **мітохондріях**. У рослинних клітинах, крім мітохондрій, в енергозабезпеченні велику роль відіграють **хлоропласти** – один із видів пластид. Мітохондрії та хлоропласти загалом подібні за структурою, виконують подібні енергетичні функції та, імовірно, мають спільне походження.

Подібним у їхній будові є те, що вони відділені від цитозолу двома мембранами – **зовнішньою** та **внутрішньою**. Тому в мітохондрій і пластид розрізняють дві порожнини (простори): **міжмембранну** – між зовнішньою і внутрішньою мембранами та **матрикс**, обмежений внутрішньою мембраною. У мітохондрій і пластид внутрішня мембрана утворює в матриксі впини,

складки різної форми, на яких локалізуються поліферментні комплекси, відповідальні за виконання основних функцій: окисного фосфорилування в мітохондріях або фосфорилування у хлоропластах.

Існують свідчення, що хлоропласти й мітохондрії виникли еволюційним шляхом із вільноіснуючих аеробних прокариотів, які утворили симбіотичний комплекс із першими еукаріотичними клітинами (*гіпотеза ендосимбіозу*). Так, у матриксі мітохондрій і пластид містяться власні елементи авторепродукції цих органел: кільцева ДНК, РНК, рибосоми, які певною мірою визначають їхні автономні властивості. У внутрішній мембрані мітохондрій і пластид є фосфоліпід *кардіоліпін*, який зустрічається лише в плазмолемі бактерій. Крім того, розмножуються обидві органели поділом навпіл, відносно незалежно від поділу клітини.

За іншими уявленнями, мітохондрії та пластиди утворились із впинів плазмолем, які оточили або плазміди (короткі кільцеві позагеномні подвійні спіралі ДНК), або частини примітивного геному клітини (*автогенетична гіпотеза*), але на сьогодні така думка не знаходить підтримки у вчених.

МИТОХОНДРІЇ

Мітохондрії, або хондріосоми (від грец. *mitos* – нитка, *chondrion* – зернівка, *soma* – тільце), – двомембранні органели енергетичного обміну, які зустрічаються практично в усіх еукаріотичних клітинах. Хоча мітохондрії настільки великі, що їх можна спостерігати у світловому мікроскопі, їхні функції були визначені лише після 1948 р., коли була розроблена методика отримання інтактних мітохондрій.

Кількість, форма, розміри мітохондрій, їхня структура, конформація крист залежать як від типу клітин, так і від їхнього функціонального стану. Так, великі найпростіші містять до 500 000 мітохондрій, тоді як у гепатоциті печінки щура може бути до 1 000 мітохондрій, а при стимулюванні функціональної активності печінки ця кількість збільшується вдвічі.

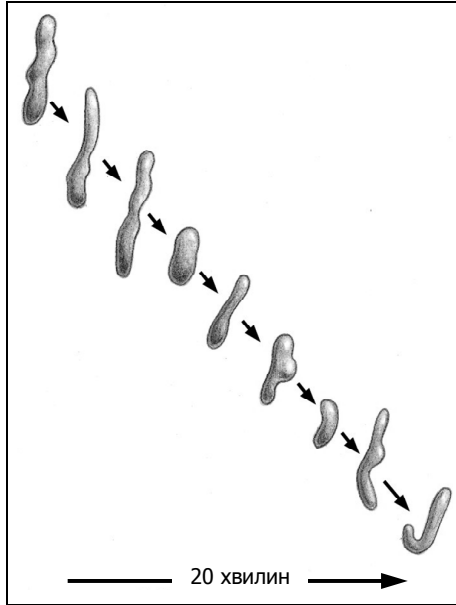


Рис. 12.2. Пластичність мітохондрій.
 При спостереженні окремої мітохондрії
 в живій клітині часто спостерігаються швидкі зміни її форми
 (за Альбертсом Б., Джонсоном А.,
 Льюїсом Д. та ін., 2013)

Розміри мітохондрій, хоча й варіюють, однак у більшості клітин товщина цих структур відносно стала (близько 0,5 мкм), а довжина змінюється, досягаючи в нитчастих форм десятків мікрометрів. Форма мітохондрій є дуже різноманітною: кулястою, ниткоподібною тощо. Крім того, досить часто мітохондрії галузяться. Необхідно підкреслити, що достовірно оцінювати кількість і розміри мітохондрій у клітині дуже складно. У світловому мікроскопі на забарвлених препаратах далеко не завжди можна дослідити реальні розміри мітохондрій. Вивчаючи мітохондрії за допомогою електронного мікроскопа на ультратонких зрізах, також важко визначити їхню справжню довжину, оскільки на зріз потрапляє лише незначний об'єм певної (конкретної) органели. Більше того, на зрізі можна одночасно побачити декілька площин перерізу однієї й тієї самої міто-

хондрії. Сьогодні лише просторова тривимірна реконструкція (засобами електронної мікроскопії або томографії з використанням комп'ютерної обробки зображень) дозволяє відповісти, чи маємо ми справу з багатьма простими мітохондріями, чи з однією органелою складної форми.

Крім того, мітохондрії є надзвичайно рухливими та пластичними органелами, що постійно змінюють свою форму (рис. 12.2). Вони переміщуються у цитозолі за допомогою мікротрубочок цитоскелета (швидкість такого переміщення може бути досить високою – до 0,6 мкм/с).

Розміщені мітохондрії в клітинах, як правило, у тих місцях, де виникає особлива потреба в АТФ. Наприклад, у скелетних м'язах мітохондрії містяться безпосередньо серед міофібрил, у сперматозоїдах і джгутикових найпростіших мітохондрії утворюють скупчення біля основи джгутика – це пов'язано з необхідністю використання АТФ для руху джгутиків і війок (рис. 12.3). У секреторних клітинах, які синтезують велику кількість білків, мітохондрії тісно пов'язані із зонами ергастоплазми, оскільки, найпевніше, вони постачають АТФ для активації амінокислот і синтезу білка на рибосомах. В аксонах нервових клітин мітохондрії розміщуються біля синапсів, де відбувається процес передачі нервового імпульсу.

У прокаріотів мітохондрій немає, а вивільнення енергії при окисненні субстратів відбувається в плазматичній мембрані та її структурованих впинах, або тилакоїдах.

УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ОСОБЛИВОСТІ МІТОХОНДРІЙ

Мітохондрія оточена двома мембранами, між якими міститься міжмембранний простір. Внутрішній вміст мітохондрії називається матриксом (рис. 12.4).

Зовнішня мітохондріальна мембрана, товщина якої становить близько 7–10 нм, відокремлює мітохондрію від цитозолу. Вона замкнена сама на себе, оскільки не пов'язана з іншими мембранами

клітини, має рівні контури, не утворює впинів і складок. За хімічним складом подібна до інших мембран еукаріотичної клітини (за винятком плазмолемі): містить 40 % ліпідів (багато холестеролу, фосфатидилетаноламіну, лецитину, фосфатидилінозитолу, не містить кардіоліпіну), 60 % білків.

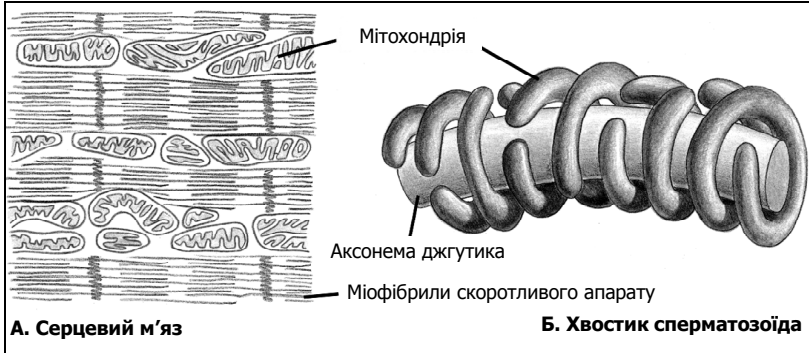


Рис. 12.3. Локалізація мітохондрій поблизу ділянок високого використання енергії АТФ в серцевому м'язі та джгутику сперматозоїда (за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2013)

Зовнішня мембрана містить багато білків **поринів**, між молекулами яких утворюються гідрофільні канали, через це вона нагадує сито, проникне для досить великих молекул масою до 10 000 Д (іони, амінокислоти, АДФ, АТФ, сахароза, проміжні продукти дихання). Крім того, зовнішня мембрана містить ферменти обміну фосфоліпідів і активації жирних кислот (ацил-СоА-синтетаза), а також моноаміноксидазу.

Основною функцією зовнішньої мітохондріальної мембрани, про що вже згадувалося вище, є відокремлення внутрішніх частин мітохондрії (у тому числі й внутрішньої мембрани) від цитозолу.

Міжмембранний (перимітохондріальний) простір має товщину близько 10–20 нм, але може розширюватись або звужуватись. Оскільки зовнішня мембрана мітохондрії проникна для невеликих молекул та іонів, їхня концентрація

у міжмембранному просторі така сама, як у цитозолі. А великим білкам для проходження через зовнішню мембрану необхідно мати специфічні сигнальні послідовності, тому білковий склад дещо відрізняється від такого в цитозолі. Тут є декілька АТФ-залежних ферментів фосфорилування нуклеотидів (нуклеозид-дифосфатів, креатиніну, АМФ), а також цитохром *c*.

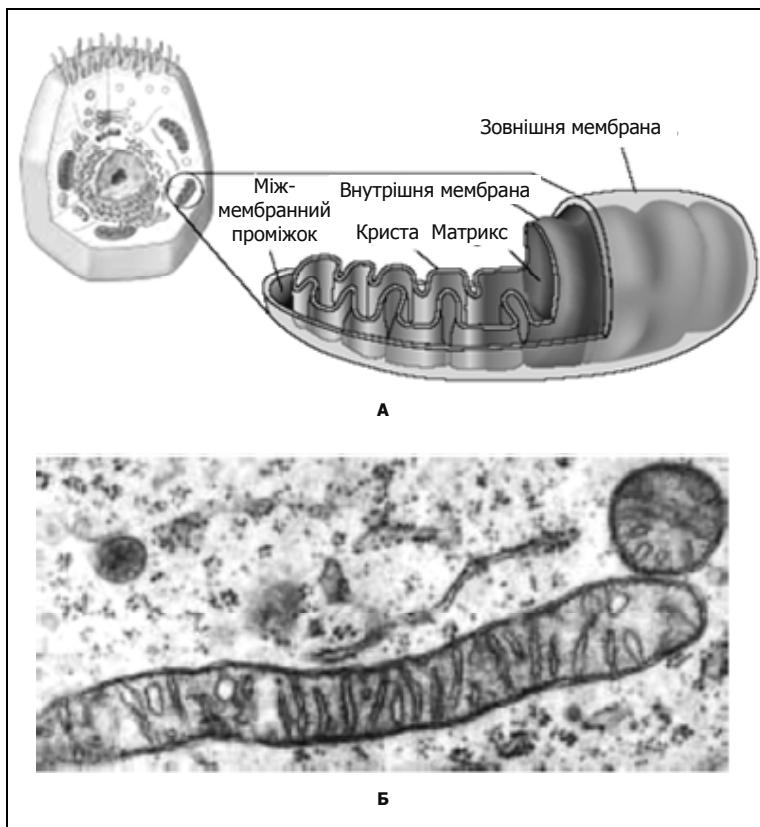


Рис. 12.4. Схема будови (А) та електроннограма (Б) мітохондрії (за Равеном П., Джонсоном Г., Сінгером С. та ін., 2005)

Внутрішня мітохондріальна мембрана (її товщина близько 7 нм) утворює численні випини – **кристи**, – які збільшують загальну площу поверхні мембрани. У 1953 р. вперше було опубліковано електронні мікрофотографії мітохондрій і описано кристи. Орієнтація крист щодо довгої осі мітохондрії є різною в різних клітинах: вона може бути перпендикулярною в клітинах печінки, нирок, тоді як у серцевому м'язі – повздовжньою. Часто кристи можуть галузитись або утворювати пальцеподібні відростки, звиватись і не мати вираженої орієнтації. У найпростіших, одноклітинних водоростей, у деяких клітинах вищих рослин і тварин кристи мають вигляд трубок (рис. 12.5).

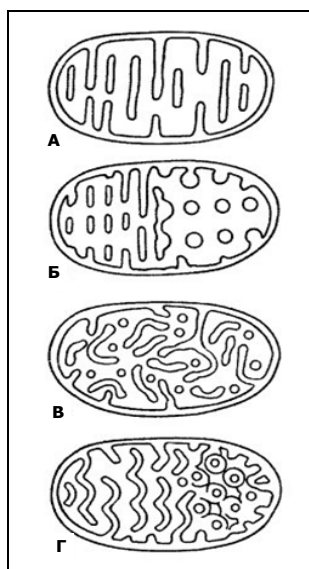


Рис. 12.5. Варіанти будови крист мітохондрій:
 А – пластинчасті кристи в гепатоцитах, Б – перфоровані кристи (летальний м'яз мухи), В – трубчасті кристи, Г – хвилясті кристи (амеба)
 (за Ченцовим Ю., 2010)

Внутрішня мембрана дуже багата на білки (до 75 %, із яких 2/3 – інтегральні), містить мало холестеролу, фосфатидилетаноламіну, дуже багато фосфоліпиду **кардіоліпіну** (він зустрічається

ще тільки в мембранах тилакоїдів пластид і в прокаріотів) і *лецитину*, майже нема фосфатидилінозитулу – цим вона подібна до мембран бактерій (табл. 12.1). Кардіоліпін робить мембрану непроникною для іонів. У цілому внутрішня мітохондріальна мембрана майже непроникна для речовин із масою понад 100 Д, тому вона містить транспортні білки для активного (енергозалежного) транспорту (іонів, глюкози, проміжних продуктів дихання, амінокислот, АТФ і АДФ, фосфату тощо). До складу внутрішньої мембрани та крист входять також:

- система структурно та функціонально пов'язаних трансмембранних білків і переносників електронів – *дихальний ланцюг*;
- АТФ-синтазний комплекс: білкові частки 8–10 нм діаметром на ніжці та 4 нм завдовжки, їх може нараховуватися до 400 на 1 мкм²;
- транспортні білки, що регулюють транспорт речовин у матрикс і з нього.

Матрикс має тонкозернисту гомогенну будову й містить деякі ферменти циклу трикарбонових кислот (циклу Кребса, або лимонної кислоти) та окиснення жирних кислот, а також проміжні продукти обміну. Оскільки інші ферменти окисного фосфорилування є периферичними білками внутрішньої мембрани, то всі процеси відбуваються безпосередньо поблизу неї, тоді як у центральній частині матриксу здійснюється дегідрогенізація пірувату, що передує циклу Кребса, а також мітохондріальний біосинтез (синтез білків, амінокислот, стероїдів).

Отже, мітохондрії, спеціалізовані для продукції енергії (наприклад, у м'язових клітинах), багаті на кристи, тоді як мітохондрії з високою інтенсивністю біосинтетичних процесів (скажімо, у печінці) бідні на кристи й багаті на матрикс.

У матриксі спостерігаються округлі гранули розміром до 20–50 нм, які містять білок, фосфоліпіди, фосфат, іони кальцію й магнію та, як вважають, пов'язані з накопиченням цих іонів.

Крім того, у матриксі міститься *генетична система мітохондрій*: декілька (2–6) ідентичних копій мітохондріальної ДНК, рибосоми, тРНК, рРНК, мРНК.

Таблиця 12.1

Морфологічна, фізична й хімічна характеристика внутрішньої та зовнішньої мембран мітохондрій клітин печінки

	Внутрішня мембрана	Зовнішня мембрана
Морфологічні особливості		
Товщина	5–7 нм	
Форма	Складчаста	Гладенька
Поверхня	Зовнішня поверхня гладенька; внутрішня складається з регулярно розташованих фрагментів	Зовнішня поверхня гладенька; внутрішня поверхня має нерегулярно розташовані канали
Вплив екстракції фосфоліпідів	Двошарова структура залишається незачепленою	Двошарова структура руйнується
Фізичні властивості		
Щільність	1,192–1,230	1,094–1,122
Проникність	Селективна	Навіть великі молекули проникають вільно
Рентгеноструктурні дані	Цілком подібні	
Хімічні властивості		
Масове співвідношення фосфоліпідів і білків	0,27	0,82
Вміст кардіоліпіну	Високий	Низький
Вміст фосфатидилінозиту	Низький	Високий
Вміст холестеролу	Низький	Високий
Убіхінон	Присутній	Відсутній
Цитохромоксидаза	Присутня	Відсутня
Моноаміноксидаза	Відсутня	Присутня

Мітохондріальна ДНК дволанцюгова, кільцева, не містить гістонів (у деяких дріжджів наявні інтрони). Розміри ДНК широко варіюються – від 6000 п. о. у *Plasmodium falciparum* (малярійний паразит людини) до більш ніж 300 тис. п. о. у вищих рослин. У людини мітохондріальна ДНК містить приблизно 16 500 п. о., що приблизно в 10^5 разів менше за ядерну ДНК. Причому розмір геному мітохондрій не залежить прямо від кількості білків, що він кодує. Так, мітохондріальна ДНК лю-

дини кодує 13 білків, а *Arabidopsis* – 32 (у 2,5 рази більше), хоча її розміри переважають людську мітохондріальну ДНК у 22 рази. Найбільше генів – 98 – має мітохондріальна ДНК найпростішого *Recliomonas Americana*.

Як і в бактерій, мітохондріальна ДНК зібрана в окрему зону – нуклеоїд, яких у великих мітохондріях може нараховуватися від 1 до 10. Вважають, що нуклеоїди прикріплені до внутрішньої мембрани.

Порівняно з ядерним, хлоропластним та бактеріальним геномом, мітохондріальний геном людини має особливості:

1. **Щільна упаковка генів.** На відміну від ядерного геному, майже всі нуклеотиди входять до складу кодуєчих послідовностей (як і у прокаріотів). Ці послідовності переходять одна в одну, а отже, місця для регуляторних послідовностей майже не залишається.

2. **Вільне використання кодонів.** Тоді як у цитозолі амінокислоти транспортуються 30 та більше тРНК (про що детально йшлося у розд. 9), то для синтезу мітохондріальних білків необхідно всього 22–23 тРНК. "Нормальні" правила спарювання кодону та антикодону ослаблені, тобто більшість молекул тРНК впізнають будь-який із чотирьох нуклеотидів у третьому (неоднозначному) положенні. Таке спарювання "2 з 3" дає змогу одній з тРНК взаємодіяти з будь-яким із чотирьох кодонів. А отже, для синтезу білка необхідна менша кількість тРНК.

3. **Генетичний код, що відрізняється від "універсального".** 4 із 64 кодонів мітохондрій мають відмінності в кодуванні амінокислот (табл. 12.2). Так, у мітохондріях людини кодон AUA замість ізолейцину в стандартному коді кодує амінокислоту метіонін, кодони AGA та AGG, які зазвичай кодують аргінін, є стоп-кодонами, а кодон UGA, який у стандартному коді є стоп-кодом, кодує амінокислоту триптофан. Що стосується мітохондрій рослин, то вони використовують універсальний генетичний код.

Блоксинтезуюча система мітохондрій також має особливості: мітохондріальні рРНК і рибосоми різко відрізняються від

цитозольних. Якщо в цитозолі наявні 80S рибосоми, то рибосоми мітохондрій рослинних клітин належать до 70S (складаються з 30S і 50S субодиниць, містять 16S і 23S рНК, що характерно для прокаріотичних клітин), а в мітохондріях тваринних клітин знайдено ще дрібніші рибосоми (близько 50S).

Таблиця 12.2

Відмінності між "універсальним" та мітохондріальним генетичними кодами

Кодон	"Універсальний" код	Мітохондріальний код			
		ссавці	безхребетні	дріжджі	рослини
UGA	STOP	триптофан	триптофан	триптофан	STOP
AUA	ізолейцин	метіонін	метіонін	метіонін	ізолейцин
CUA	лейцин	лейцин	лейцин	треонін	лейцин
AGA AGG	аргінін	STOP	серин	аргінін	аргінін

рРНК мітохондрій синтезуються на мітохондріальних ДНК. У матриксі на рибосомах відбувається синтез білків. Мітохондріальний геном забезпечує синтез 2 рРНК, 22 тРНК і 13 білків. Незважаючи на наявність начебто всіх компонентів, необхідних для синтезу білків, невеликі молекули мітохондріальної ДНК не можуть кодувати всі білки мітохондрії, а лише невелику їхню частину. Так, ДНК розміром 15 т. п. н. може кодувати білки із сумарною молекулярною масою близько 6×10^5 . Водночас, сумарна молекулярна маса білків частки дихального ансамблю мітохондрії досягає близько 2×10^6 . Беручи до уваги, що крім білків окисного фосфорилування мітохондрії містять ферменти циклу трикарбонових кислот, ферменти синтезу ДНК і РНК, ферменти активації амінокислот тощо, зрозуміло, що для кодування цих численних білків, а також рРНК і тРНК, кількості мітохондріальної ДНК явно не вистачає.

Відомо, що більша частина білків мітохондрій перебуває під генетичним контролем клітинного ядра й синтезується поза мітохондріями. Так, цитохром *c* утворюється в цитозолі, а з дев'яти поліпептидних ланцюгів у складі АТФ-синтази лише один синтезується в матриксі мітохондрій тварин. Мітохондріальна ДНК кодує лише деякі мітохондріальні структурні білки мембран, відповідальні за правильну інтеграцію в мітохондріальних мембранах окремих функціональних компонентів. Більшість мітохондріальних білків синтезується на рибосомах у цитозолі. Ці білки мають на N-кінці спеціальні сигнальні послідовності (що складаються із 12–80 амінокислот), за якими вони розпізнаються та імпортуються в мітохондрію із цитозолу спеціалізованими білками *транслоказами* зовнішньої (ТОМ – Translocase of the Outer Membrane) і внутрішньої (ТІМ – Translocase of the Inner Membrane) мембран. До зовнішньої мембрани мітохондрії білки транспортуються в частково розгорнутому стані в асоціації з білками *шаперонами* (а саме hsp70). Після перенесення через зовнішню та внутрішню мембрани в місцях їхніх контактів, білки знову зв'язуються з шаперонами, але вже власного мітохондріального походження, які сприяють їхньому просуванню в мітохондрію, а також контролюють процес правильного згортання поліпептидного ланцюга.

Більшість ліпідів мітохондрій також синтезується в цитоплазмі. Тваринні клітини синтезують фосфоліпіди фосфодитилсерин та фосфодитилхолін на ендоплазматичній сітці, а потім транспортують до зовнішньої мембрани мітохондрій. Після переходу фосфоліпідів (у місцях злиття мембран) у внутрішню мембрану, із них утворюється кардіоліпін – "подвійний" фосфоліпід, що містить чотири жирнокислотні хвости.

Мітохондрії живуть декілька днів і розмножуються поперечним поділом або відокремленням, яким передують реплікація ДНК. Перед поділом мітохондрій відбувається збільшення маси мітохондріальних мембран з усіма специфічними компонентами за рахунок синтезу та вбудовування в них білків і ліпідів та нарощення маси білків матриксу. При поділі ж клітини у клітинному циклі, реплікація мітохондріальної ДНК відбувається в інтерфазі, що частково синхронізовано з реплікацією ДНК у ядрі.

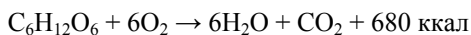
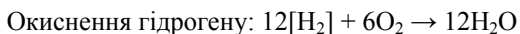
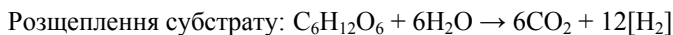
ФУНКЦІЇ МІТОХОНДРІЙ

Основною функцією мітохондрій є аеробний синтез АТФ, який відбувається в результаті окиснення органічних субстратів (*дихання*).

Дихання полягає в аеробному окисненні субстрату (у першу чергу вуглеводів, а також жирів і білків) до бідних енергією неорганічних сполук і спрямоване на утилізацію енергії, яка при цьому вивільнюється.

Щоб забезпечити себе енергоємним "паливом", клітина запасє жири як джерело жирних кислот, глікоген (тваринні клітини) або крохмаль (рослинні клітини) як джерело вуглеводів (глюкози). При окисненні жирів вивільнюється в шість разів більше енергії, ніж при окисненні рівної кількості глікогену. Запасів глікогену в організмі дорослої людини середньої ваги вистачає на один день нормальної активності, тоді як запасів жирів вистачить на місяць. Однак основним субстратом дихання є вуглеводи, а запаси жирів використовуються під час голодування (навіть після нічного голодування відбувається мобілізація запасів жиру). Надлишок вуглеводів іде на поповнення запасів глікогену й жирів. Слід відмітити, що, хоча вуглеводи у клітинах тварин легко перетворюються на жири, зворотне перетворення неможливе.

Фактично дихання зводиться до двох процесів. Перший із них – це поступове *розщеплення субстрату* з відбиранням гідрогену $[H_2]$, який зв'язується з коферментами. Другий – поступове *окиснення гідрогену* $[H_2]$ у результаті перенесення його на окисген. Сумарне рівняння дихання виглядає так (для вуглеводів):



Процеси окиснення та накопичення енергії у клітині здійснюються в декілька етапів.

Жири перетворюються на жирні кислоти за допомогою ферментів, розташованих на зовнішній і внутрішній мембрані мітохондрій, і переносяться в її матрикс. Тут молекула жирної кислоти поступово піддається повному розщепленню в циклі реакцій, за один оберт якого вона втрачає два вуглецеві атоми з утворенням однієї молекули ацетил-СоА. Далі відбувається подальше окиснення ацетил-СоА в циклі *лимонної кислоти*.

Початкові процеси окиснення *вуглеводів* проходять у цитозолі й не потребують участі кисню. Вони називаються анаеробним окисненням, або гліколізом. **Гліколіз** – окиснення шестивуглецевої молекули глюкози до двох тривуглецевих молекул пірувату.

У результаті гліколізу глюкоза розпадається до тріоз, при цьому витрачається дві молекули АТФ, і синтезується чотири молекули АТФ. У кінцевому результаті клітина отримує дві молекули АТФ. В енергетичному відношенні цей процес малоефективний: із 680 ккал, які є у зв'язках 1 моля глюкози, вивільнюється менше 10 % енергії, тому піруват бере участь у подальшому окисненні, яке відбувається в мітохондріях.

Наступний етап здійснюється в матриксі мітохондрій. Спочатку піруват (трикарбонова сполука) окиснюється до ацетил-СоА (двокарбонової сполуки), втрачаючи молекулу CO_2 . Ацетил-СоА вступає в **цикл лимонної кислоти** (цикл Кребса, або цикл трикарбонових кислот (рис. 12.6).

Цикл названо на честь Ганса Кребса, який описав багато із цих реакцій, за що в 1953 р. отримав Нобелівську премію. Ацетил-СоА, зв'язуючись з оксалоацетатом (чотирикарбонова сполука), утворює лимонну кислоту (шестикарбонову сполуку). Далі проходить цикл окиснення її до чотирикарбонового оксалоацетату, який знову зв'язується з ацетил-СоА, і цикл повторюється. При цьому окисненні виділяються дві молекули CO_2 , а електрони, які звільнились при окисненні, переносяться на акцепторні молекули коферментів (НАД – нікотинамідаденіндинуклеотид і ФАД – флавінаденіндинуклеотид), які передають їх до ланцюга перенесення електронів (дихального ланцюга).

Отже, у циклі трикарбовоних кислот нема самого синтезу АТФ, а відбувається окиснення молекул, перенесення електронів на акцептори й виділення CO_2 .

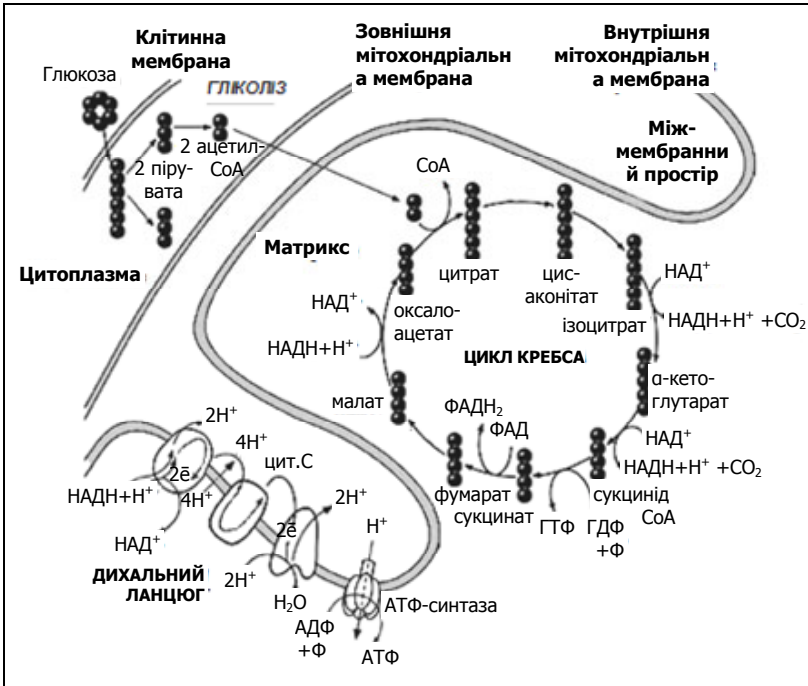


Рис. 12.6. Схема окиснення глюкози та синтезу АТФ

Електрони й протони водню переносяться за допомогою молекули НАД до *дихального ланцюга* (до кисню) (рис. 12.7). Дихальний ланцюг – система структурно та функціонально пов'язаних трансмембранних білків і переносників електронів. Він є головною системою перетворення енергії в мітохондріях і транспорту електронів у міжмембранний простір. Складається він із чотирьох комплексів:

- **Комплекс I (НАД·Н-дегідрогеназа)** окиснює НАД·Н, відбираючи у нього два електрони, і переносить їх на розчинений

- у ліпідах убіхінон, який дифундує в мембрані до комплексу III. Водночас, комплекс I перекачує два протони з матриксу в міжмембранний простір мітохондрії;
- **Комплекс II (сукцинатдегідрогеназа)** не прокачує протони, але забезпечує входження до ланцюга додаткових електронів за рахунок окиснення сукцинату;
 - **Комплекс III (цитохром bc_1 -комплекс)** переносить електрони з убіхінону на 2 водорозчинні цитохроми c , що розташовані на внутрішній мембрані мітохондрії. Убіхінон при цьому передає 2 електрони, а цитохроми за один цикл переносять по одному. При цьому туди також переходять 2 протони убіхінону й перекачуються комплексом у міжмембранний простір;
 - **Комплекс IV (цитохром- c -оксидаза)** каталізує перенесення 4-х електронів із 4-х молекул цитохрому на O_2 та перекачує при цьому 4 протони в міжмембранний простір. Комплекс складається із цитохромів a та a_3 , які, крім гему, містять іони міді.

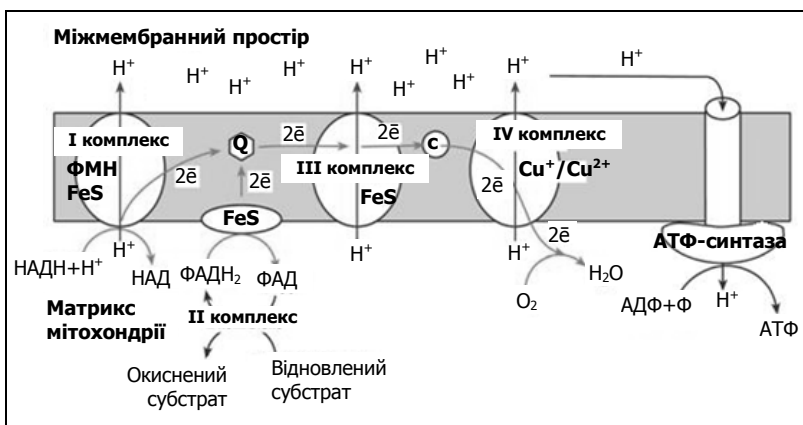


Рис. 12.7. Схема електронотransпортного (дихального) ланцюга. Дихальний ланцюг включає в себе три білкові комплекси (I, III і IV) та дві рухливі молекули-переносники – убіхінон (кофермент Q) і цитохром c . Комплекс II (сукцинатдегідрогеназа) належить до цитратного циклу

На дихальному ланцюзі відбувається окиснення гідрогену (а не вуглеводів, як при гліколізі). Цьому процесу передують розщеплення водневих атомів на електрони й протони. Атом гідрогену (H) складається з одного електрона (e^-) і одного протона (H^+). Електрони переходять на перший із численних переносників електронів, розміщених у внутрішній мітохондріальній мембрані. На цьому етапі електрони мають велику енергію, яка поступово зменшується під час їхнього проходження через ланцюг різних переносників у дихальному ланцюгу. Найчастіше електрони переходять від одного атома металу до іншого. Кожен із металів міцно пов'язаний із білковою молекулою, яка, власне, впливає на його спорідненість до електронів; кожному наступному комплексу властива більша спорідненість до електронів, ніж попередньому. Електрони передаються по ланцюгу доти, поки не з'єднаються з молекулярним киснем, який є найбільш спорідненим до них, і внаслідок цього утворюється вода.

Отже, у результаті перенесення електронів по дихальному ланцюгу відбувається перехід позитивно заряджених іонів гідрогену (протонів) через внутрішню мітохондріальну мембрану з матриксу в міжмембранний простір і, відповідно, виникнення електростатичного градієнта протонів на мембрані (внутрішній бік мембрани заряджений негативно, а зовнішній – позитивно).

Енергія електронів запасується за участю ланцюга перенесення електронів, локалізованого на внутрішній мембрані, у вигляді енергії трансмембранного електростатичного протонного градієнта. Цей градієнт, у свою чергу, використовується специфічним білковим комплексом внутрішньої мембрани **АТФ-синтазою** для синтезу АТФ з АДФ (аденозиндифосфат) і неорганічного фосфату.

Фермент АТФ-синтаза є білковим комплексом, через який протони "перетікають" назад у матрикс, і який використовує енергію протонного току для синтезу АТФ. В електронному мікроскопі АТФ-синтази мають вигляд грибоподібних тіл, що вистеляють поверхню мембран, обернену до матриксу. Ці тільця мають "ніжку" і голівку діаметром 8–9 нм. АТФ-синтазу можна розділити на дві структурно-функціональні субодиниці: F_0 та F_1 (рис. 12.8).

F_0 -компонент АТФ-синтази є гідрофобним білковим комплексом, що пронизує мембрану наскрізь та має всередині два півканали для проходження протонів. До складу комплексу F_0 входить одна білкова субодинаця типу a (повністю занурена в мембрану), дві субодинаці b (лише невеликий фрагмент яких занурений у мембрану), а також 9–12 копій дрібних субодинаць c (які повністю занурені в мембрану і утворюють структуру, за формою схожу на циліндр).

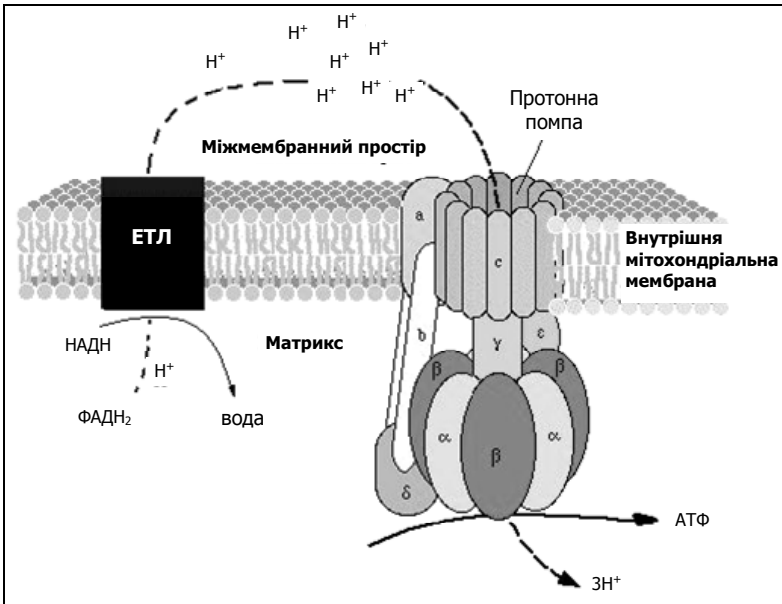


Рис. 12.8. Схема будови АТФ-синтазного комплексу
(за Фенюком, Б.А., Сузукі, Т., Йошидою, М., 2006)

F_1 -комплекс (фактор спряження F_1) – це сферичний компонент білкового комплексу висотою 8 нм та шириною 10 нм, обернений у бік матриксу. Він складається із дев'яти субодинаць, які представлені п'ятьма видами білків. Білки трьох субодинаць α та β утворюють гексамер $3(\alpha\beta)$ і упаковані в глобули, схожі на щільно упаковані часточки апельсину. У центрі цього гексамеру міститься субодинаця γ , яка напра-

влена в бік комплексу F_0 . Також усередині гексамеру знаходиться субодинаця ϵ , зв'язана з γ . Дев'ята субодинаця δ розташована на зовнішньому боці F_1 .

У структурі АТФ-синтази можна виділити два функціональні відділи: *нерухомий* (включає в себе гексамер $3(\alpha\beta)$, субодинацю δ , а також субодинаці a і b мембранного комплексу F_0) та *рухомий* (складається із субодинаць γ та ϵ , які, помітно виступаючи із комплексу $3(\alpha\beta)$, з'єднуються із заглибленим у мембрану кільцем і субодинаць c).

Рушійною силою для роботи АТФ-синтази є протонний потенціал, що створюється на внутрішній мембрані мітохондрій унаслідок роботи дихального ланцюга. Потік електронів, що протікає через канал F_0 -комплексу, приводить до повороту субодинаці γ та одночасної зміни конформації всіх субодинаць β , що й забезпечує роботу ферменту. При синтезі АТФ рухома частина АТФ-синтази повертається за годинниковою стрілкою зі швидкістю чотири оберти за секунду, причому повний оберт відбувається стрибкоподібно по 120° , і кожен із цих "стрибків" супроводжується утворенням однієї молекули АТФ. Вона утворюється на β -субодинацях комплексу F_1 з АДФ та фосфату.

Отже, енергія електрохімічного протонного градієнта, що утворилася в результаті перенесення протонів H^+ по елементах дихального ланцюга, використовується для синтезу АТФ із АДФ і фосфату. Тому говорять, що процес окиснення (перенесення електронів) спряжений із фосфорилуванням ($ADP + P_n \rightarrow ATP$), тобто відбувається процес *окиснювального фосфорилування*.

АТФ, що утворюється в мітохондріях, переноситься у цитозоль завдяки *обмінній дифузії*. Мітохондріальна мембрана містить високоспецифічний переносник АДФ/АТФ-транслоказу, яка спряжує перенесення однієї молекули АТФ із матриксу в цитоплазму з одночасним перенесення однієї молекули АДФ в іншому напрямку (антипорт) (рис. 12.9).

Завершуючи розгляд головних функцій мітохондрій, слід підкреслити, що крім описаних процесів у мітохондріях відбувається синтез деяких амінокислот (глутаміну, цитруліну), стероїдних гормонів, а також активне накопичення неорганічних

іонів. Мітохондрії відіграють ключову роль у депонуванні іонів кальцію, що вкрай важливо для реалізації кальційопосередкованої внутрішньоклітинної сигналізації. За дегенеративних змін у клітинах мітохондрії можуть виступати основним джерелом вільних радикалів і деяких сигнальних молекул (АТФ, глутамат, цитохром *c*), поява яких спричиняє апоптоз.

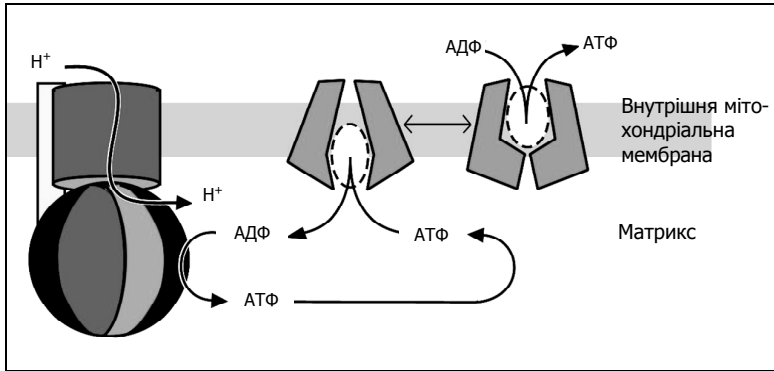


Рис.12.9. Схема роботи АДФ/АТФ-транслокази
(за Альбертсом Б., Джонсоном А.,
Льюїсом Д. та ін., 2013)

ХОНДРІОМ

Хондріом – це сукупність усіх мітохондрій в одній клітині. У багатьох клітинах він представлений розрізненими численними мітохондріями, які розкидані досить рівномірно по всій цитоплазмі. В інших випадках мітохондрії локалізуються групами в місцях інтенсивного витрачання АТФ. В обох випадках вони функціонують поодиноці, проте їхня кооперативна робота координується (можливо, якимись сигналами із цитоплазми).

Однак існує і зовсім інший тип хондріома, коли замість дрібних розрізнених мітохондрій у клітині наявна одна гігантська розгалужена мітохондрія. У цьому разі йдеться не про окремі мітохондрії, а про складну мітохондріальну систему,

або мітохондріальний ретикулум. За *хеміосмотичною теорією*, електрохімічний протонний градієнт, який виник на поверхні внутрішньої мембрани, рівномірно розподіляється по поверхні внутрішньої мембрани мітохондрій. Тому в будь-якій точці поверхні внутрішньої мембрани такої розгалуженої мітохондрії може здійснюватися синтез АТФ, яка буде надходити в будь-яку точку цитоплазми, де є в цьому необхідність. Мітохондріальний ретикулум є електричним провідником, що сполучає віддалені точки такої системи.

Мітохондріальний ретикулум може бути корисним не лише для дрібних рухомих клітин, таких як хлорела, але й для більших, там, де необхідна кооперація та синхронізація в роботі багатьох структурних одиниць, таких як, наприклад, міофібрили в скелетних м'язах. Відростки м'язових мітохондрій галузяться на великі відстані, при цьому оточують кожен міофібрилу в м'язовому волокні, утворюючи типовий мітохондріальний ретикулум. Уздовж міофібрили розміщуються й нитчасті мітохондрії, які об'єднують мітохондріальний ретикулум. Між розгалуженими й нитчастими мітохондріями існують спеціальні міжмітохондріальні контакти (ММК), утворені щільно прилягаючими мітохондріальними мембранами контактуючих мітохондрій. Через ці структури відбувається об'єднання сусідніх мітохондрій і мітохондріального ретикулума в єдину енергетичну систему. Усі міофібрили у м'язовому волокні скорочуються синхронно по всій довжині, отже, і АТФ повинна надходити на будь-якій ділянці цієї складної машини синхронно, а це може відбуватись лише в тому разі, якщо величезна кількість розгалужених мітохондрій буде зв'язана між собою контактами (ММК).

ММК виявлені й у волокнах скелетних м'язів, і в кардіоміоцитах. Їхня кількість у кардіоміоцитах змінюється залежно від функціонального навантаження на серце: збільшення їхньої кількості спостерігається при підвищенні фізичних навантажень на серце, і навпаки, при обмеженні навантаження на серцевий м'яз відбувається різке зменшення. Узагалі наявність ММК характерна для хондріомів скорочувальних структур.

ПАТОЛОГІЯ МІТОХОНДРІЙ

Мітохондрії певною мірою можна вважати індикаторами функціонального стану клітин: вони найбільш чутливі до дії патологічних чинників, тобто першими реагують на агресію зміною своєї ультраструктури. Відомо, що однією з перших ознак аутолізу (смерті) клітини є вакуолізація мітохондрій.

Популяція мітохондрій у різних клітинах варіює, але є відносно стабільною, тому що відбувається їхнє постійне поновлення. Деструкція (руйнування) зайвої кількості мітохондрій здійснюється за допомогою аутофагії.

Причини альтерації мітохондрій

Гіпоглікемія – це стан, при якому виявляється низький рівень глюкози в крові. Глюкоза є головним субстратом для синтезу АТФ у більшості клітин, зокрема у нейронах ЦНС глюкоза – це єдине джерело енергії. При гіпоглікемії різко порушується синтез АТФ, що є найбільш відчутним у головному мозку.

Гіпоксія – це патологія, викликана нестачею кисню в клітинах. Вона може виникати за наявності механічної перепони для дихання або хвороб легень, що супроводжується порушенням оксигенації крові; ішемії, або порушенні припливу артеріальної крові до тканин у результаті загальних порушень циркуляції або виникнення місцевої перепони для течії крові; анемії (тобто при зниженні кількості еритроцитів і/або рівня гемоглобіну в крові), що призводить до зниження транспорту кисню кров'ю; порушенні структури гемоглобіну (скажімо, при отруєнні чадним газом (СО) утворюється карбоксигемоглобін, нездатний переносити кисень).

Пригнічення ферментів. Спостерігається, наприклад, при отруєнні ціаністим калієм. Останній пригнічує кінцевий фермент у дихальному ланцюзі – цитохромоксидазу, що спричинює гострий дефіцит АТФ в усіх клітинах органів і швидко смерть.

Роз'єднання окиснювального фосфорилування. Відбувається або шляхом хімічних реакцій, або шляхом фізичного відо-

кремлення ферментів від мітохондріальної мембрани. Так, мітохондріальне набухання, яке є загальною ознакою для більшості типів пошкоджень, викликає роз'єднання окислювального фосфорилування.

Структурні зміни мітохондрій

Розрізняють наступні структурні зміни мітохондрій: зміни кількості й розмірів; зміна розмірів мітохондрій та утворення мегамітохондрій; зміна форми; зміни структури крист мітохондрій; зміна структури щільних гранул мітохондріального матриксу.

Збільшення кількості мітохондрій (гіперплазія). Хоча відомо, що кількість мітохондрій у клітині не зовсім постійна, суттєве відхилення їхньої кількості є ознакою патології. Гіперплазія мітохондрій відображає посилення окиснювального фосфорилування у клітині. Збільшення числа мітохондрій у світловому мікроскопі виявляється появою в цитоплазмі клітин оксифільних гранул. Це явище має місце при гіпертрофії, проліферації та трансформації клітин, особливо після пошкодження тканини. Значне число мітохондрій виявляють часто в онкоцитах щитоподібних, парашитоподібних, слинних, бронхіальних і молочних залоз. Клітини, цитоплазма яких багата мітохондріями, зустрічаються і за інших патологічних станів, скажімо при запаленні.

Зменшення кількості мітохондрій характерне для гіпобіотичних процесів, ознакою яких є зниження як метаболізму, так і регенерації, проліферації тощо. Спостерігається при старінні клітин та їхній атрофії.

Зміна розмірів мітохондрій. Розміри мітохондрій у клітинах різних тканин коливаються в широких межах – від гігантських до різко редукованих форм. Мітохондрії здатні до аутореплікації, як і пластиди рослинних клітин. Вони можуть рости й ділитися, досягати гігантських розмірів, інколи вони бувають більші за ядро – це і є *мегамітохондрії*. У світловому мікроскопі їх можна побачити у вигляді світлих круглих, дуже оксифільних гранул.

Мегамітохондрії зустрічаються в гепатоцитах при алкоголізмі та при цирозах печінки, в епітеліальних клітинах каналців нирок при нефротичному синдромі, при інтоксикації бромідами та при деяких м'язових захворюваннях. Однак відомо й те, що після усунення інтоксикації вже через декілька годин відбувається повернення гігантських мітохондрій до нормальних розмірів.

Зміна форми мітохондрій найчастіше пов'язана з їхнім набряканням, що є проявом проникнення у мітохондрію води. Такі зміни спостерігаються при голодуванні, гіпоксії, інтоксикаціях, пропасниці, м'язових захворюваннях, при вживанні тироксину, тощо. Мутний набряк, описаний як зерниста дистрофія клітини, також супроводжується набряком мітохондрій. При цьому конденсація і набряк мітохондрій можуть відображати функціональну напругу клітини, але частіше такі зміни, що нерідко є оборотними, пов'язані з кисневим голодуванням. Однак, коли процес прогресує, це призводить до тяжкої деструкції мітохондрій і загибелі клітини: у мітохондріях відбувається ущільнення вмісту внутрішньої камери, деформація крист, гомогенізація матриксу і поява в ньому пластинчастого матеріалу, кальцифікація матриксу (на внутрішній мембрані можуть утворюватись преципітати фосфату кальцію), потім зникають мітохондріальні гранули, і у фіналі виникають розриви зовнішньої мембрани мітохондрій.

In vitro констатовано два типи набухання: перший тип – незначне набухання, за якого можливі оборотні зміни (тобто мітохондрії можуть повертатися до нормального стану), другий тип – необоротне набухання, що виникає в результаті збільшення проникності внутрішньої мембрани. Наслідком цього є розгладження та фрагментація крист. За умов *in vivo* при набуханні мітохондрій відбувається руйнування гранул мітохондріального матриксу, які спочатку просвітлюються, потім ущільнюються і утворюють пластівці у внутрішній камері. Завершальний етап загибелі мітохондрій характеризується тим, що обидві мембрани, внутрішня та зовнішня, розриваються.

Зміни структури крист мітохондрій. Зміни такого роду стосуються розмірів, форми й кількості крист: деформація крист і зменшення їхньої кількості зустрічається за пониженої активності мітохондрій; збільшення кількості крист мітохондрій є доказом зростаючих функціональних потреб клітини.

Зміна структури щільних гранул мітохондріального матриксу. Однією із важливих функцій мітохондрій є участь у регуляції вмісту кальцію в нем'язових клітинах. Кальцій може накопичуватися мітохондріями в значній кількості разом із неорганічним фосфатом та іншими іонами у вигляді гранул діаметром від 20 до 50 нм. Матрикс щільних гранул може бути утворений також протеїнами і ліпідами. Фізіологічно нормальним є існування таких клітин, як остеокласти й остеобласти, що мають значну кількість гранул, оскільки вони залучені до активного транспорту кальцію у зв'язку з процесами кальцифікації та резорбції кісткового матриксу. Навпаки, при деяких хворобах (коронарна хвороба серця, скажімо), синдромах (хронічна ниркова недостатність) і патологічних станах (отруєння гіоацетатамідом, папаїном, йодоформом тощо) клітини відповідають на пошкодження появою в мітохондріальному матриксі численних великих щільних гранул кальцію. Цей патологічний процес отримав назву *кальцифікація (ваннування)*. При цьому кальцифікація мітохондрій може призвести до смертельного пошкодження клітини, але часто цей процес є оборотним. Гіперплазія цих гранул виявлена при ішемії міокарда, у гепатоцитах – при інтоксикації чотирихлористим вуглецем, у м'язових клітинах при тетанусі (комплекс симптомів, які виявляються у вигляді судом, нападів, порушенні ЦНС, ПНС). Зменшення або зникнення щільних гранул відбувається в онкоцитах, гепатоцитах і клітинах кишкового епітелію при ішемії.

Внутрішньомітохондріальна кальцифікація може бути пов'язана як з надмірним надходженням кальцію в клітину внаслідок первинного пошкодження плазматичної мембрани, так і з первинними порушеннями транспорту кальцію мітохондріями. У випадках первинного пошкодження плазматичної мембрани надмірне надходження кальцію в клітину приводить до накопичення його в мітохондріях, що порушує синтез АТФ. Первинні

порушення мітохондріального транспорту кальцію зустрічаються при захворюваннях скелетних м'язів – міопатіях (хвороба Люффа, синдром Кирнса – Сейра). Незважаючи на високий рівень ендogenous кальцію, при цих хворобах мітохондрії можуть додатково накопичувати значну його кількість. У таких випадках можна говорити про *"хвороби" порушеного мітохондріального транспорту*, які є проявом *мітохондріальних хвороб*.

Мітохондріальні хвороби

Серед патологій мітохондрій виділяють мітохондріальні хвороби, зумовлені мутаціями ядерної та мітохондріальної ДНК.

Установлено, що мутації ядерних і мітохондріальних генів, які контролюють мітохондріальні білки, як правило, не смертельні для клітин, оскільки останні можуть перейти до анаеробного метаболізму. Однак у тканинах з високою потребою в кисні (м'язова, нервова) виникають значні порушення функції клітин, що мають клінічне значення. При цьому внаслідок посиленого гліколізу формується метаболічний ацидоз (порушення кислотно-лужної рівноваги, накопичення органічних кислот, зокрема молочної кислоти). Ці порушення описані у людини як група *"мітохондріальних хвороб"*. Існують мітохондріальні хвороби з порушенням транспорту субстратів та його утилізацією в мітохондріях (дефіцит карнітину, піруватоксидази), порушенням запасання АТФ (дефіцит АТФази) і дефектами дихального ланцюга (дефіцит цитохромів).

Вважають, що у людини мітохондріальні хвороби нерідко спадкуються цитоплазматично по материнській лінії через яйцеклітину. Ці патологічні стани можуть проявлятися в самому різному віці – від дитинства до старості.

Як правило, спадковій мітохондріопатії викликають ураження головного мозку і м'язів. При дефіциті цитохрому *c* або піруватдегідрогенази переважають явища некротичної енцефалопатії (синдром Лея): розвиваються симетричні некрози в головному і спинному мозку, що приводить до атаксії, судом, затримки розумового розвитку та гіпотонії. Відомий метаболічний ацидоз із накопиченням у мозку лактату і пірувату. При дефіциті цитохромоксидази з'являються прояви міопатії (слабкість м'язів,

стомлюваність), міоглобінурія і дихальна недостатність. Порівняно м'якшими наслідками для здоров'я характеризується дефіцит сукцинилдегідрогенази. При цих захворюваннях розвивається інтолерантність до фізичного навантаження, що варіює від задишки і серцебиття – при помірних, і до рабдо-міолізу (руйнування посмугованої скелетної мускулатури) – за важких навантажень.

Отже, оскільки мітохондрії одні із перших реагують на агресію, їхню роль у процесі альтерації клітин недооцінити неможливо. Їхня деструкція є вирішальною подією при смерті клітини від гіпоксії, яка розвивається за більшості патологічних станів організму як на початку захворювання, так і в прикінцевих стадіях перебігу хвороби.

ПЛАСТИДИ

Пластиди – мембранні органели, які наявні у фотосинтезуючих еукаріотичних організмах (вищі рослини, водорості, деякі одноклітинні організми). Подібно до мітохондрій, вони оточені двома мембранами, у їхньому матриксі є власна геномна система, функції пластид пов'язані з енергозабезпеченням клітини.

Ембріональні клітини містять незрілі незабарвлені *пропластиди*, які мають неправильну форму, дві мембрани та здатні до амебоїдних рухів. Під дією світла вони, залежно від типу тканини, розвиваються в зелені *хлоропласти* або в їхні похідні, філогенетично більш пізні форми пластид – у жовті чи червоні *хромопласти* або в безбарвні *лейкопласти*.

ХЛОРОПЛАСТИ

Містяться у клітинах рослин, які перебувають на світлі: у листі, біля поверхні стебла, у молодих плодах тощо. Ці клітини мають зелені пігменти *хлорофіли* й зазвичай самі зелені, якщо цей колір не маскується іншими наявними пігментами (як, скажімо, у бурих чи червоних водоростей).

В основі організації хлоропластів лежать ті самі принципи, що і в будові мітохондрій. Як правило, хлоропласти досить численні (десятки й сотні на клітину), різної форми, розміром 3–10 мкм. У клітинах деяких зелених водоростей зустрічаються поодинокі гігантські хлоропласти (хроматофори), що сягають у довжину 50 мкм.

Хлоропласти, як і мітохондрії, є структурами, оточеними двома мембранами – зовнішньою та внутрішньою, завтовшки близько 7 мкм кожна. Мембрани відділені одна від одної *міжмембранним простором*, що сягає близько 20-30 нм. Зовнішня мембрана, як і в мітохондрій, дуже проникна, внутрішня – менш проникна, містить спеціальні транспортні білки. Внутрішня мембрана оточує велику безбарвну центральну область – *stromu*, яка аналогічна матриксу мітохондрій і містить велику кількість розчинних ферментів. Крім них, у стромі хлоропластів є молекули ДНК, рибосоми; у ній відбувається первинне відкладання основного запасного полісахариду *крохмалю* у вигляді крохмальних зерен.

На відміну від мітохондрій, в еукаріотичних клітинах внутрішня мембрана хлоропластів не утворює кристи, на ній нема ланцюга перенесення електронів. Фотосинтезуюча, поглинаюча світло система, електротранспортний ланцюг і АТФ-синтаза локалізовані у третій мембрані, що формує групу сплосчених дископодібних зелених мішків (цистерн) – *тилакоїдів*, які пронизують строму. Розрізняють *тилакоїди стром* та *тилакоїди гран*; останні є групою тилакоїдів, які утворюють щільні стопки (*гран*) розміром 0,3–0,5 мкм. Їхня кількість у гранах дуже варіює: від декількох до 50 і більше. Внутрішні порожнини більшості (або навіть усіх) тилакоїдів поєднані між собою, утворюючи третій компартмент хлоропласта – *тилакоїдний простір*. Розмір міжмембранного простору в них становить 20–30 нм (рис. 12.10).

Хлоропласти мають три мембрани – зовнішню, внутрішню і тилакоїдну, які ділять органелу на три внутрішні компартменти: міжмембранний простір, строму й тилакоїдний простір. У тилакоїдній мембрані містяться всі енергетичні системи хлоропласта. На електронній мікрофотографії ці мембрани

мають вигляд розбитих на окремі фрагменти, схожі на сплюснені пухирці, але у хлоропласті вони, можливо, поєднані в одну мембрану, що утворює численні складки.

Хлоропласти зелених водоростей, які не мають гран, містять *піреноїди* – круглі щільні ділянки строми, пронизані нечисленними тилакоїдами, у яких накопичуються крохмальні зерна або краплини жиру. Фотосинтезуючі прокаріоти не мають хлоропластів, але в них є численні тилакоїди, оточені плазматичною мембраною.

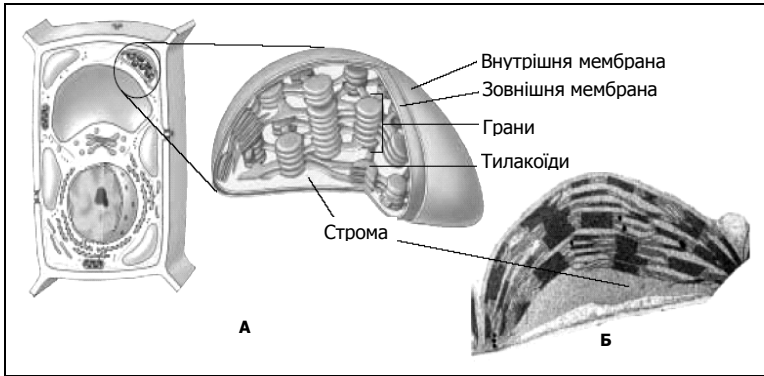


Рис. 13.10. Схема будови (А) та електроннограма (Б) хлоропласта
(за Равеном П., Джонсоном Г.,
Сінгером С. та ін., 2005)

Мембрани тилакоїдів завтовшки 7–12 нм, дуже багаті на білки (близько 50 %, понад 40 різних білків), серед ліпідів переважають гліколіпіди (*моногалактозилдигліцерид*), є також фосфоліпіди (у тому числі *кардіоліпін*) і специфічний сульфоліпід, зустрічаються різні хінони.

У мембранах тилакоїдів відбувається та частина реакцій фотосинтезу, із якою пов'язане перетворення енергії сонячного світла – *світлові реакції*. Тут є щільно розташовані комплекси інтегральних білків, які беруть участь у цих процесах:

- хлорофіловмісна *фотосистема II* (ФС II) і світлозбиральний комплекс (СЗК);

- хлорофіловмісна *фотосистема I* (ФС I);
- білки *ланцюга перенесення електронів* (у тому числі цитохроми);
- мембранна *АТФ-синтаза*, що продукує АТФ.

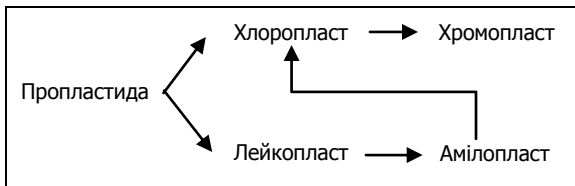
Слід звернути увагу, що в мембранах тилакоїдів сферична "головка" АТФ-синтази виступає в бік строми, тоді як у мітохондріях – із внутрішньої мітохондріальної мембрани в бік матриксу.

У **стромі** хлоропластів відбуваються біохімічні синтези – *темнові реакції* перетворення речовин, у результаті яких продукується "асиміляційний крохмаль", зерна якого тут і відкладаються.

Також у стромі знаходяться елементи *генетичної системи пластид*: ДНК, мРНК, тРНК, рРНК і 70S-рибосоми (гомологічні рибосомам прокаріотів). У кожному хлоропласті є 3–30 ідентичних копій кільцевих ДНК, які більші за мітохондріальні (50–150 мкм), несуть гени з інтронами та вільні від гістонів і негістонових хромосомних білків. ДНК пластид кодують рРНК, тРНК, ДНК- і РНК-полімерази, деякі білки рибосом, білки АТФази, цитохроми пластид і більшість ферментів темнових реакцій фотосинтезу. Однак більша частина білків пластид кодується у хромосомах у ядрі. Розмноження пластид пов'язане з реплікацією їхньої ДНК і подальшим поділом органели навпіл.

Перебудови пластид

Для пластид характерні порівняно легкі перетворення одного типу на інший. Цей процес розвитку різних пластид можна зобразити в такому вигляді:



Пропластиди

Пропластиди – дрібні (до 1 мкм), різноманітні за формою, обмежені двома мембранами, недиференційовані пластиди, що зустрічаються в меристемі клітин кореня та пагона. Із пропластид, залежно від їхнього місцезнаходження в рослині, можуть утворюватися різні типи пластид. Їхній подальший розвиток залежить також від умов існування рослин. При нормальному освітленні пропластиди перетворюються на хлоропласти (під час розвитку виникають трубчасті інвагінації внутрішньої мембрани). У разі відсутності світла замість гран і ламел строми утворюється *проламелярне тіло* – пухирці й канали. Проламелярними їх називають, щоб підкреслити той факт, що вони є попередниками ламел. Після стимуляції світлом структури проламелярних тіл змінюють свою орієнтацію і трансформуються в систему тилакоїдних мембран.

Пластиди, у яких є проламелярні тіла називають **етіопластами**. Їх можна розглядати як певну стадію розвитку хлоропластів. Етіопласти утворюються в первинних листках або сім'ядолях проростків до їхнього виходу на світло.

ЛЕЙКОПЛАСТИ

Лейкопласти – невеликі непігментовані пластиди круглої або видовженої форми, розміщені, як правило, у клітинах підземних частин рослин, насіння, серцевині стебла тощо. Вони відрізняються від хлоропластів відсутністю розвиненої ламелярної системи, мають ДНК, зерна крохмалю, саїнокі тилакоїди та **пластидні центри** (це скупчення пухирців або мережа розгалужених трубочок). На світлі лейкопласти здатні до утворення нормальних тилакоїдних структур, що приводить до їхнього перетворення на хлоропласти.

Частіше зустрічаються **амілопласти**, які синтезують крохмаль із глюкози й накопичують його (є в бульбах, кореневищах, ендоспермі тощо). Амілопласти можуть перетворюватися на хлоропласти, як це відбувається у картопляних бульбах на світлі.

ХРОМОПЛАСТИ

Хромопласти – це пластиди вищих рослин, які синтезують і накопичують пігменти. Вони зумовлюють жовтий, червоний, жовтогарячий, синій і фіолетовий колір квітів, плодів, пагонів, коренів, а також старого листя. Хромопласти можуть бути різної форми, не мають тилакоїдів, містять значну кількість *каротиноїдів* (понад 50 видів) у різних білкових структурах. Зазвичай ці органели утворюються із хлоропластів у ході дозрівання плодів рослин (шляхом руйнування тилакоїдів і хлорофілу та посиленого відкладання каротиноїдів) або з інших типів пластид (пропластид).

Процеси зміни хлоропластів та їхнє знебарвлення спряжені з поступовим зменшенням кількості мембран у пластиді й зникненням хлорофілу та крохмалю. Отже, хромопласти можна вважати дегенеруючою формою пластид, у якій спостерігається розпад ліпопротеїнових комплексів.

Біологічна роль хромопластів полягає в тому, що вони створюють візуальну кольорову принаду для тварин, чим сприяють запиленню квітів і розповсюдженню плодів рослин.

ФУНКЦІЇ ХЛОРОПЛАСТІВ (ФОТОСИНТЕЗ)

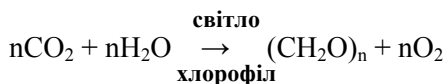
Хлоропласти – це структури, у яких відбуваються фотосинтетичні процеси, суть яких полягає в перетворенні енергії світла на хімічну енергію органічних речовин, насамперед вуглеводів, які синтезуються у хлоропластах з енергетично бідних сполук – із CO_2 і H_2O . Додатковим результатом цих реакцій є продукція молекулярного кисню (O_2).

Хлоропласти містять спеціальні зелені пігменти *хлорофіли*, здатні поглинати світло для фотосинтезу. Крім них, усі хлоропласти мають жовті, жовтогарячі або червоні *каротиноїди*, а також інші пігменти.

Поглинання світлових променів із певною довжиною хвилі викликає зміни в молекули хлорофілу, при цьому вона перехо-

дять у збуджений, активований стан. Енергія, яка вивільнюється з активованого хлорофілу, через ряд проміжних етапів передається певним синтетичним процесам, які приводять до синтезу АТФ і відновлення акцептора електронів **НАДФ (нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату)** з утворенням НАДФ·Н, які далі використовуються в реакції зв'язування CO₂ у синтезі вуглеводів.

Сумарна реакція фотосинтезу може бути виражена таким чином:



Отже, головний процес – це зв'язування двоокису вуглецю з використанням води для утворення різних вуглеводів і виділення кисню. Молекула кисню, що виділяється у процесі фотосинтезу, утворюється за рахунок фотолізу молекули води. Біохімічні дослідження показали, що процес фотосинтезу є складним ланцюгом подій, який складається із двох фаз – світлової й темної. Перша, що проходить лише на світлі, пов'язана з поглинанням світла хлорофілами з перебігом фотохімічної реакції (*реакція Хілла*). У другій фазі, яка може йти в темряві, відбувається фіксація й відновлення CO₂, що приводить до синтезу вуглеводів.

У результаті **світлової фази** енергія світла збуджує електрони в молекулах хлорофілу, що робить можливим перенесення цих електронів по окиснювальному ланцюгу в тилакоїдній мембрані, подібно до того, як електрони транспортуються по дихальному ланцюгу на внутрішній мембрані мітохондрій. Енергія, що вивільнюється під час такого перенесення електронів, використовується для перекачування протонів через тилакоїдну мембрану, а протонорушійна сила, яка виникає внаслідок цього, приводить у дію АТФ-синтазу, яка утворює АТФ. У ході описаного процесу високоенергетичні електрони врешті відновлюють НАДФ до НАДФ·Н. Джерелом електронів, які беруть участь у цих реакціях, є вода, при окисненні якої виділяється молекулярний кисень (O₂).

У **темнову фазу** здійснюється перетворення CO₂ на вуглеводи (*фіксація вуглецю*), причому як джерело енергії та відновник використовуються відповідно АТФ і НАДФ·Н, що були

синтезовані протягом світлової фази. Темнові реакції починаються у стромі хлоропластів і продовжуються в цитозолі. Хоча ці реакції залежать від продуктів світлової фази, їх називають темновими, оскільки вони не потребують прямої участі світла.

Отримані при фотосинтезі АТФ і НАДФ є джерелом енергії для різних біосинтетичних реакцій, які відбуваються у стромі, у тому числі й для життєво важливого циклу фіксації CO₂, що приводить до утворення вуглеводів. Ці вуглеводи у вигляді три-вуглецевих фосфоукрів разом з іншими продуктами метаболізму хлоропластів транспортуються в цитоплазму клітини.

Запитання для самоперевірки

1. Де в клітині розташовані мітохондрії?
2. Які функції виконують мітохондрії?
3. Як може змінюватись структура мітохондрій?
4. Охарактеризуйте зовнішню мітохондріальну мембрану. Яка її роль?
5. Дайте визначення зовнішньої мітохондріальної камери (між-мембранного простору).
6. Дайте визначення внутрішньої мітохондріальної мембрани. Які процеси відбуваються в ній?
7. Охарактеризуйте дихальні ансамблі мітохондрій.
8. Роль АТФ-синтазного комплексу в мітохондріях.
9. Охарактеризуйте внутрішню мітохондріальну камеру (матрикс мітохондрій). Які процеси відбуваються в матриксі мітохондрій?
10. Який хімічний склад матриксу мітохондрій?
11. Охарактеризуйте генетичний апарат мітохондрій.
12. Де синтезуються білки для мітохондрій?
13. Чим відрізняється генетичний апарат мітохондрій від генетичного апарату ядра?
14. Охарактеризуйте білоксинтезуючу систему мітохондрій.
15. Що таке порин? Як забезпечується транспорт речовин із цитоплазми до матриксу мітохондрій? Які речовини транспортуються таким чином?
16. Що таке кристи? Яка їхня роль? Яку форму вони можуть мати?
17. Про що свідчить наявність великої кількості крист у мітохондріях?
18. Які структури мітохондрії забезпечують існування електрохімічного градієнта? Відповідь обґрунтуйте.

19. За допомогою мікроманіпулятора із клітини видалили мітохондрії. Як це відобразиться на життєдіяльності клітини?
20. Яке значення має цикл трикарбонних кислот (цикл Кребса) у життєдіяльності клітин еукаріотів? Де він відбувається?
21. Порівняйте зовнішню та внутрішню мембрани мітохондрій, їхній хімічний склад.
22. Назвіть процеси, у яких бере участь мітохондрія.
23. Які ознаки в будові мітохондрій указують на їхнє ендосимбіотичне походження? Відповідь поясніть.
24. Охарактеризуйте мітохондріальний ретикулум і гігантський мітохондріон.
25. У мембранах крист мітохондрій клітин бурої жирової тканини присутній білок, що дозволяє протонам проходити крізь внутрішню мембрану, оминаючи АТФ-синтазний комплекс. Як змінюється при цьому функція мітохондрій? Відповідь поясніть.
26. Які процеси здійснюються у стромі хлоропластів?
27. Які процеси відбуваються на мембранах тилакоїдів?
28. Поясніть терміни: тилакоїд, ламела, грани, кристи.
29. Яке значення має цикл Кальвіна – Бенсона в життєдіяльності клітин рослин. Де він відбувається?
30. Яке значення має фотодихання в життєдіяльності клітин рослин. Із якими органелами пов'язаний цей процес?
31. Які типи включень можна побачити у хлоропласті на електроннограмі?
32. Де у хлоропласті містяться пігменти: хлорофіл і каротиноїди? Яку функцію вони виконують?
33. Порівняйте процеси, які відбуваються на мембранах тилакоїдів і крист.
34. Поясніть терміни: хлоропласт, хромoplast, лейкопласт.
35. На електроннограмі у стромі хлоропласта видно велику кількість дрібних гранул. Що це може бути? Яка їхня функція?
36. Опишіть загальну схему фотосинтезу.

Рекомендована література

Загальна цитологія і гістологія : підручник / М. Е. Держинський, Н. В. Скрипник, Г. В. Островська та ін. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2010.

Зенгбуш П. Молекулярная и клеточная биология / П. Зенгбуш. – М. : Наука, 1982.

Клетки / под ред. Б. Льюина и др.; пер. с англ. – М. : БИНОМ, Лаборатория знаний, 2011.

Мушкамбаров Н. Н. Молекулярная биология / Н. Н. Мушкамбаров, С. Л. Кезнецов. – М. : Мединформагентство, 2003.

Сиволоб А. В. Молекулярна біологія / А. В. Сиволоб. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2008.

Фаллер Дж. Молекулярная биология клетки / Фаллер Дж., Шилдс Д. – М. : Бином-пресс, 2004.

Ченцов Ю. С. Введение в клеточную биологию / Ю. С. Ченцов – М. : Академкнига, 2004.

Cooper G. M. The cell: a molecular approach / G. M. Cooper. – N. Y., 2000.

Molecular Biology of the Cell / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis et al. – N. Y., 2013.

Molecular cell biology / H. Lodish, A. Berk, A. Kaiser et al. – N. Y., 2013.

Розділ 13

ВІДТВОРЕННЯ КЛІТИН. КЛІТИННИЙ ЦИКЛ

У 1858 р. німецький патолог Рудольф Вірхов висловив відомий принцип, який увійшов до постулатів клітинної теорії: "Omnis cellula e cellula" ("всяка клітина від клітини"). Він стверджував, що будь-яка клітина може виникнути лише від попередньої, і збільшення кількості клітин відбувається тільки в результаті поділу вже існуючих клітин.

Закономірні зміни структурно-функціональних характеристик клітини в часі складають зміст їхнього життєвого циклу (клітинного циклу). **Клітинний цикл** – це період існування клітини від моменту її утворення шляхом поділу материнської клітини до власного поділу або смерті.

Клітини ростуть і діляться, щоб замінити клітини, які були втрачені в результаті нормального зносу або пошкодження. Різні клітини ростуть і живуть протягом різного періоду часу (табл. 13.1). Загальний час клітинного циклу в еукаріотів варіює від 30 хв у ростучих клітин дріжджів, 18–24 год у сперматогенних клітин, 10–30 год у клітинах рослинної меристеми до декількох тижнів у повільно регенеруючих тканинах. Деякі клітини, такі як нервові, ростуть повільно, набувають вираженої спеціалізації у виконанні функції і втрачають здатність до поділу.

Отже, здатність різних клітин до поділу в процесі життєвого циклу також різна:

- деякі клітини постійно діляться (наприклад стовбурові клітини, гематопоетичні клітини);
- деякі клітини перебувають у стані спокою, якщо вони не стимулюються до поділу (скажімо, епітеліальні клітини під час загоєння ран);

- деякі клітини вже не діляться, набуваючи високої спеціалізації (таким прикладом можуть послуговуватися нервові та м'язові клітини);
- деякі клітини перестають ділитися, досягаючи "реплікативного старіння" – після початку диференціації вони діляться лише 40–60 разів (ліміт Хейфліка), після чого їхня ДНК набуває змін, які обумовлюють ознаки старіння і запрограмовану клітинну смерть.

Таблиця 13.1

Тривалість життєвого циклу різних типів клітин ссавців

Тип клітини	Тривалість життя
Гранулоцити (еозинофіли, базофіли, нейтрофіли)	10- годин – 3 доби
Епітеліальні клітини шлунка	2 доби
Сперматозоїди	2–3 доби
Епідермальні клітини шкіри	2–4 доби
Клітини товстого кишечника	3–4 доби
Епітеліальні клітини тонкого кишечника	До 1 тижня
Тромбоцити	10 діб
Лімфоцити	2 місяці – > 1 року
Еритроцити	4 місяці
Макрофаги	Місяці – роки
Клітини ендотелію	Місяці – роки
Панкреатичні клітини	> 1 року
Остеоцити	25–30 років

Важливим компонентом життєвого циклу клітин є **мітотичний (проліферативний) цикл** – комплекс взаємопов'язаних і узгоджених у часі подій, що відбуваються в процесі підготовки клітини до поділу і протягом самого поділу. Крім цього, життєвий цикл включає період виконання клітиною багатоклітинного організму своїх специфічних функцій та періоди спокою. У періоди спокою найближча доля клітини є невизначеною: вона може або почати підготовку до мітозу, або почати спеціалізуватися в певному функціональному напрямку.

Тривалість циклу регулюється шляхом зміни тривалості всіх його періодів.

Біологічне значення мітотичного циклу полягає в тому, що він забезпечує спадкоємність хромосом у ряді клітинних поколінь, утворення клітин, рівноцінних за об'ємом та вмістом спадкової інформації. Таким чином, клітинний цикл є загальним механізмом відтворення клітинної організації еукаріотичного типу в індивідуальному розвитку.

Головні події мітотичного циклу полягають у *редуплікації* (самоподвоєнні) спадкового матеріалу материнської клітини і в *рівномірному розподілі* цього матеріалу між дочірніми клітинами. Указані події супроводжуються закономірними змінами хімічної та морфологічної організації хромосом, у яких зосереджено понад 90 % генетичного матеріалу еукаріотичної клітини (основна частина позаядерної ДНК тваринної клітини локалізована в мітохондріях).

КЛІТИННИЙ ЦИКЛ

Життєвий цикл клітини відраховується саме з утворення двох самостійних дочірніх клітин, одразу після завершення поділу материнської клітини.

Весь клітинний цикл складається з чотирьох періодів: *пресинтетичного* (G_1 , від англ. *gap* – проміжок), *синтетичного* (S) (від англ. *synthesis*) і *постсинтетичного* (G_2) періодів *інтерфази* і власне *мітозу* (M) (рис. 13.1).

У клітинному циклі постульовано існування так званих "*звірляльних точок*" (точок контролю, англ. *-checkpoints*), проходження яких можливе лише в разі нормального завершення попередніх етапів і відсутності молекулярних поломок. Виділяють щонайменше чотири такі точки: точка в G_1 , точка в S, точка в G_2 і "точка перевірки збірки веретена поділу" в мітозі.

Проходження молекулярного контролю в цих точках свідчить, що клітина є здатною завершити мітоз. Якщо клітина не відповідає молекулярним і біологічним вимогам певної контрольної точки, вона не може перейти до наступного етапу циклу. У таких клітинах, "заблокованих" на контрольній точці, можуть бути запущені механізми входу в апоптоз (запрограмовану загибель).

Зазвичай виділяють два найкритичніші переходи – між фазами G1 / S та G2 / M.

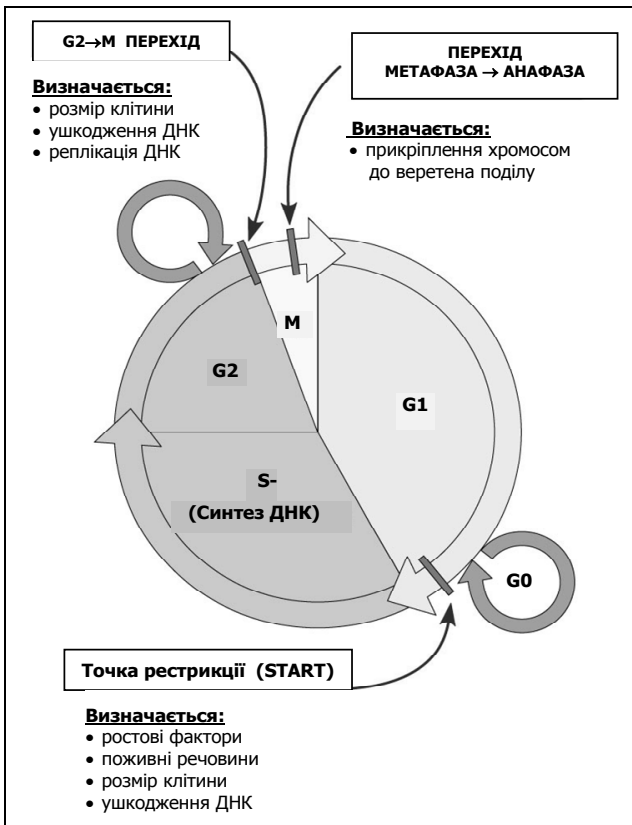


Рис. 13.1. Схема клітинного циклу з найважливішими контрольними точками (за Хардіном Дж.; Бертоні Дж.; Клейнсмїтом Л. Дж.; Бекером В. М., 2012)

Інтерфаза є найтривалішим періодом клітинного циклу (90 %), під час якого клітина має інтенсивну біосинтетичну активність (синтез ДНК, РНК, білків), забезпечуючи необхідні умови для своєї життєдіяльності, у тому числі й для здійснення клітинного поділу.

Інтерфаза підрозділяється на три періоди, відомі як періоди G1, S і G2.

Період G1 – пресинтетичний, або пост мітотичний період, під час якого:

- відновлюються процеси транскрипції й білкового синтезу, блоковані під час мітозу;
- відбувається деконденсація хроматину – важливий процес для активації транскрипції генів;
- відбувається реорганізація ядерця;
- клітина містить диплоїдний набір ($2n$) монохроматидних хромосом. У цей період кількість молекул ДНК ($2c$) у ній дорівнює кількості хромосом ($2n : 2c$).

Період S – синтетичний період, характеризується:

- напівконсервативною асинхронною реплікацією молекул ДНК, у результаті чого подвоюється кількість ДНК;
- формуванням двохроматидних хромосом – кожна хромосома містить тепер 2 копії молекули ДНК, загальна кількість ДНК у клітині в цей час позначається $4c$ ($2n : 4c$);
- паралельним синтезом гістонових і негістонових білків, що беруть участь у синтезі й упакуванні ДНК;
- подвоєнням центріолей.

Період G2 – постсинтетичний, або премітотичний період, у якому процеси транскрипції та білкового синтезу відбуваються з тією ж інтенсивністю, як і в періоді G1 (це забезпечує необхідні умови для мітозу).

У **G1-періоді**, що настає відразу після поділу, клітина перебуває дещо менше половини часу від тривалості всього клітинного циклу. Це найдовший період циклу, скоротити або подовжити який можуть умови мікрооточення і сигнали, отримані від інших клітин.

У G1-періоді завдяки інтенсивному синтезу відновлюється вміст цитоплазматичних білків і популяція цитоплазматичних мікротрубочок, збільшується розмір органел, розмір дочірніх клітин досягає материнського. При цьому різко підвищується активність ферментів, що беруть участь в енергетичному обміні.

Клітини мають диплоїдну кількість ДНК на одне ядро (2 *c*). У цей період починається підготовка клітини до синтезу ДНК.

Клітини деяких типів на певних стадіях диференціювання можуть припиняти поділ, повністю зберігаючи свою життєздатність. Такий стан клітин отримав назву **фази G0**, або стану **проліферативного спокою**. Клітини, які досягли стану термінального диференціювання, вже не можуть вийти з цієї фази. Водночас, клітини, для яких характерна надзвичайно низька здатність до поділу, можуть знову вступати в клітинний цикл за необхідності, зокрема при появі різних факторів росту. Наприклад, гепатоцити можуть переходити до поділів після видалення частини печінки.

Перехід клітин у стан спокою стає можливим завдяки функціонуванню високоспецифічних **інгібіторів клітинного циклу**. За участю цих білків клітини можуть припиняти проліферацію за несприятливих умов навколишнього середовища, при пошкодженні ДНК або появі грубих помилок її реплікації. Такі паузи використовуються клітинами для репарації отриманих ушкоджень.

Клітини хребетних у безсироватковому стандартному культуральному середовищі (тобто, *позбавленому ростових факторів*), у більшості випадків не вступають в S-фазу, хоча середовище й містить усі необхідні поживні речовини.

При досягненні повністю зімкненого моношару клітини, здатні до **контактного гальмування**, також виходять із клітинного циклу навіть у присутності сироватки крові. Клітини, які вийшли з мітотичного циклу на невизначений час, зберігаючи життєздатність і проліферативний потенціал, називають *спочиваючими клітинами*.

Сьогодні вважають, що стан проліферативного спокою (G0) має принципові відмінності від G1.

Відомо, що тривалість G1-фази у клітин, що діляться, значно коротший, ніж час переходу G0 / S. Численними дослідженнями показано, що клітини в G0-фазі містять інгібітори проліферації, що перешкоджають вступу в S-фазу, при цьому відсутні регуляторні білки, які "дозволяють" клітині такий перехід здійснити (відповідні циклінозалежні кінази). Для пере-

ходу клітин у S-фазу фактори росту мають індукувати в них синтез цих білків. Ці факти змушують думати, що клітина повинна здійснювати "спеціальну програму" для виходу із G0.

У період G1-фази, завдяки роботі регуляторних систем клітинного циклу, клітина проходить через особливу контрольну точку – так звану *точку рестрикції* ("обмеження"). У дріжджів вона має назву *точка START*. Це своєрідний Рубікон (*точка неповернення*), де вирішується функціональна доля клітини. До її проходження клітина може затриматися в G1-фазі або перейти в стан G0. Після того проходження клітини цієї точки, вона стає обмеженою в подальших процесах і обов'язково перейде до реплікації генетичного матеріалу в S-фазі.

У дріжджів перехід через START регулюється розміром клітини й наявністю в середовищі поживних речовин. Перехід через точку рестрикції вищих еукаріотів в основному залежить від наявності в зовнішньому середовищі факторів росту. Скажімо, вихід фібробластів шкіри із фази спокою і запуск їхнього клітинного циклу здійснюється за дії тромбоцитарного фактора росту (PDGF), який з'являється у середовищі при згортанні крові в зоні поранення.

S-фаза, яка у клітинах ссавців триває від 12 до 24 годин, як правило, значно менш варіабельна, ніж G0–G1 фази. Специфічні ділянки хромосом реплікуються в певний час, кластери одиниць реплікації запускаються синхронно, весь складний процес відбувається надзвичайно організовано. Під час S-фази вміст клітинної ДНК повинен збільшитися з 2 с до 4 с. При цьому відбувається інтенсивний синтез усіх фракцій гістонів, необхідних для забезпечення нуклеосомної упаковки синтезованої ДНК. Лише дуже невелика кількість клітин може фактично зупинити синтез ДНК до завершення S-фази. Їхня кінцева доля неясна, хоча цілком імовірно, що деякі з них можуть відновити S-фазу.

У першій половині S-періоду відбувається подвоєння центріолей. Це скоординований процес, який носить назву *центріоллярний цикл* (рис. 13.2). У цей час біля кожної із двох центріолей відбувається закладка нових центріолярних циліндрів – *процентріолей*. У ділянці проксимальних кінців кожної центріолі

перпендикулярно довгій осі закладається спочатку 9 синглетів (одиначних) мікротрубочок, потім вони перетворюються на 9 дуплетів, а потім – на 9 триплетів ростучих мікротрубочок нових центріольярних циліндрів.

Завдяки такому росту структур утворюється спочатку коротка дочірня центріоль – *процентріоль*, яка потім доростає до розмірів материнської. У S-періоді, під час дуплікації центріолей кожна материнська центріоль продовжує бути центром утворення цитоплазматичних мікротрубочок.

Важливо відмітити, що розмноження центріолей не пов'язано з їхнім поділом, брунькуванням чи фрагментацією, а відбувається шляхом утворення зачатка (процентріолі) поблизу й перпендикулярно до материнської центріолі.

Після завершення S-періоду у клітині наявні вже дві диплосоми (усього – чотири центріольярні циліндри).

Клітини, що завершили S-фазу, входять у наступний етап, що характеризується різким припиненням процесів синтезу ДНК.

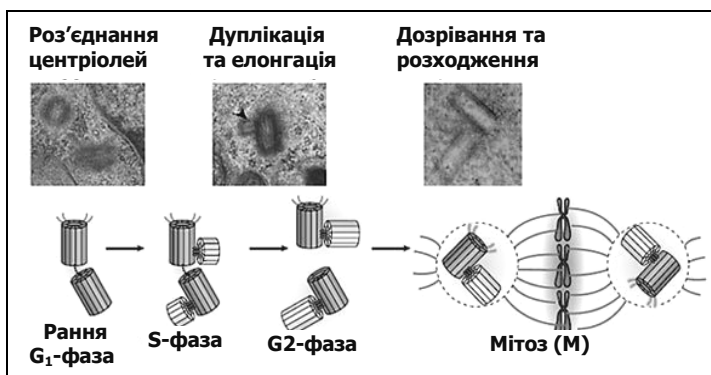


Рис. 13.2. Центріольярний цикл

Постсинтетична G₂-фаза називається також премітотичною, оскільки має велике значення для проходження наступної стадії – стадії мітотичного поділу. Вона значно коротша за інші фази (2–4 год). У цьому періоді відбувається синтез

мРНК, необхідний для проходження мітозу. Серед білків, що синтезуються в цей час, особливе місце посідають тубуліни – білки мікротрубочок мітотичного веретена.

У кінці G2-періоду синтез РНК різко спадає й повністю припиняється на початку мітозу. Водночас, синтез білка на початок мітозу не припиняється повністю, зберігаючись на рівні близько 25 % від вихідного рівня.

У кінці G2-періоду клітина проходить важливу контрольну точку перевірки – G2 / M. Суть молекулярного моніторингу на цьому етапі полягає в тому, щоб "підтвердити" відсутність нереплікованої ДНК і "гарантувати", що в даний час існують два ідентичні й неушкоджені набори геному, які в процесі мітозу можуть бути передані дочірнім клітинам.

Перевірка проводиться для виявлення молекулярних пошкоджень у ДНК, і визначення, чи буде геном збережений, репарований або видалений. Якщо буде "виявлена" наявність uszkodженої ДНК і можливість репарації, клітинний цикл призупиниться на необхідний для цього процесу час. Якщо ж репарація "буде визнана неможливою", сильно пошкоджені ДНК будуть визначені, і продукт гена p53 викличе запуск запрограмованої смерті (апоптозу).

ПОДІЛ КЛІТИН. МІТОЗ

Мітоз (M-фаза, *непрямий поділ*) – найбільш драматичний період клітинного циклу, який включає реорганізацію практично всіх клітинних компонентів, поділ її ядра (*каріокінез*) і цитоплазми (*цитокінез*).

Під час мітозу (поділу ядра), хромосоми конденсуються, ядерна оболонка більшості клітин "руйнується", цитоскелет реорганізується, формуючи мітотичне веретено, а подвоєний у інтерфазі набір хромосом чітко і скоординовано розподіляється між двома протилежними полюсами клітини. Остаточний розподіл тіла клітини (цитокінез) завершує клітинний цикл. Хоча багато із цих подій, які стосуються структури

й функції ядра та цитоскелета, описано в попередніх розділах, розглянемо їх ще раз у контексті скоординованих процесів М-фази.

ЗАГАЛЬНІ ПОДІЇ СТАДІЙ МІТОЗУ

Хоча багато деталей мітозу відрізняється залежно від організмів, однак основні процеси, які забезпечують точне розділення сестринських хроматид, зберігаються у всіх еукаріотів (рис. 13.3, 13.4). Ці основні події мітозу включають конденсацію хромосом, утворення мітотичного веретена, прикріплення хромосом до його мікротрубочок. Після цього сестринські хроматиди відокремлюються одна від одної й починають рухатися до протилежних полюсів веретена, із подальшим утворенням дочірніх ядер.

Мітоз – безперервний процес, проте його умовно поділяють на чотири етапи: профазу, метафазу, анафазу й телофазу (рис. 13.5).

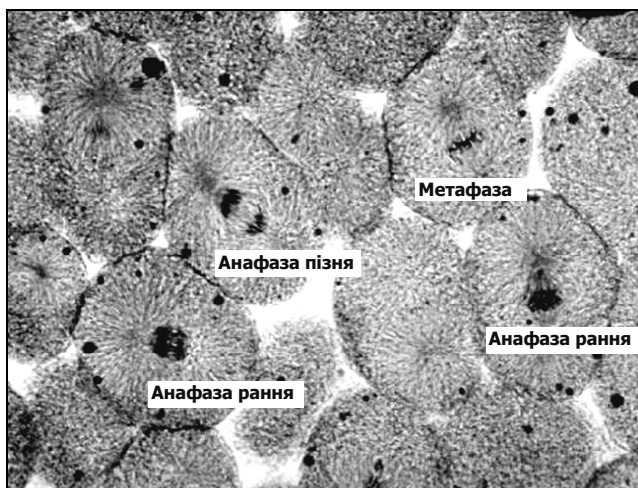


Рис. 13.3. Мітоз у клітинах бластули риби *Coregonuslavaretus*. Мікрофотографія

Профаза. Клітина припиняє виконувати специфічні функції в організмі. У профазі зміни відбуваються як у цитоплазмі, так і в ядрі клітини. Найважливіші ознаки профазы – конденсація хромосом, розпад ядерця і початок формування веретена поділу.

У результаті руйнування цитоплазматичної популяції мікротрубочок вивільнюються молекули тубуліну, із яких утворюється нова популяція значно більш динамічних мітотичних мікротрубочок – вони формують веретено поділу (*ахроматинове*, або *мітотичне*, веретено). Центріолі починають розходитися до полюсів клітини. Кожна пара центріолей стає частиною *мітотичного центру*, від якого променями розходяться мікротрубочки майбутнього веретена поділу.



Рис. 13.4. Мітоз у рослинних клітинах (кінчик корінця цибулі).
Мікрофотографія

Ядерна оболонка за дії регуляторних факторів і ферментів розпадається на дрібні вакуолярні фрагменти. Значна роль у цьому належить процесам фосфорилювання і подальшим структурним змінам білків ядерної ламіни. Ядерця поступово

зменшуються і зникають. Хромосоми в зоні колишнього ядра спіралізуються. Спочатку вони розташовуються хаотичним клубком, хоч уже помітно, що кожна з них складається із двох спіралеподібних ниток – хроматид, прилеглих одна до одної по всій довжині, але з'єднаних між собою лише в ділянці первинної перетяжки (центромери). Потім вони стають коротшими і товщими, через деякий час їх уже добре видно у світловий мікроскоп, і можна порахувати їхню кількість та розглянути форму.

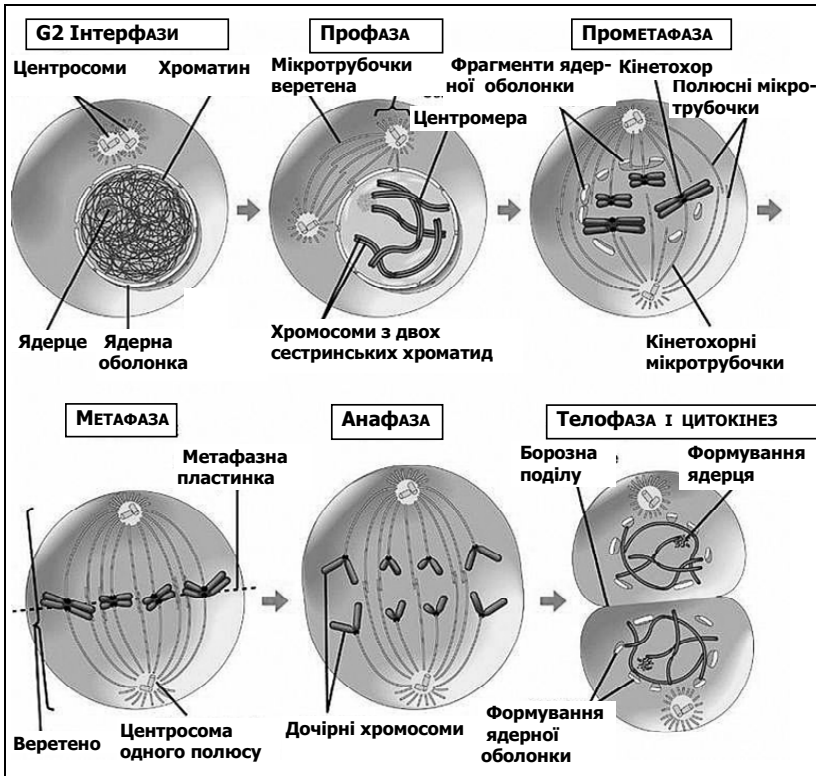


Рис. 13.5. Стадії мітозу. Схема

З обох боків центромери на кожній хромосомі утворюється спеціальна парна білкова структура – *кінетохор*, до якої потім кріпляться *кінетохорні* мікротрубочки веретена поділу в такий

спосіб, що кожна хромосома буде пов'язана з одним із полюсів. Центросоми (що подвоїлися під час інтерфази), розійшовшись до протилежних боків ядра, виступають як два полюси мітотичного веретена – завершується формування веретена поділу.

Пізня профаза, або **прометафаза** (рис. 13.5) – перехідний період між профазою і метафазою. Під час прометафази мікротрубочки мітотичного веретена прикріплюються до кінетохорів конденсованих хромосом. Кінетохори сестринських хроматид орієнтовані у протилежні боки хромосоми, тому вони контактують з мікротрубочками, що виходять із протилежних полюсів веретена. Оскільки мітотичні мікротрубочки надзвичайно динамічні (постійно вкорочуються – подовжуються), а їхнє прикріплення до кінетохорів кожної хромосоми відбувається неодноразово, у прометафазі хромосоми деякий час перетягуються назад-уперед між полюсами (це явище іноді називають "танок хромосом"), поки нарешті не стануть прикріпленими до мікротрубочок обох полюсів і вирівнюються в екваторіальній площині (посередині веретена поділу). На цій стадії клітини досягають метафази.

Метафаза. Ця стадія клітинного циклу триває досить недовго. Усі хромосоми перестають рухатися і розташовуються таким чином, що їхні центромери лежать в одній площині, утворюючи так звану "*метафазну пластинку*", перпендикулярну до осі веретена поділу.

Кожна хромосома утримується завдяки парі кінетохорних мікротрубочок, що йдуть до протилежних полюсів. Хромосоми в цей час мають найменші розміри, завдяки максимальному ступеню конденсації. Під мікроскопом добре видно, що вони складаються із двох хроматид, з'єднаних у центромері. Структура кожної хромосоми помітна в цей період особливо чітко. У клітинах організму людини найбільші хромосоми в метафазі мають розміри близько 10 мкм, а найдрібніші – близько 2 мкм. Для проведення каріотипування і цитогенетичного аналізу, які базуються на дослідженнях структурних особливостей хромосом, найчастіше використовують саме метафазні пластинки мітотичних клітин. Вивчення деталей будови хромосом метафазної пластинки має велике значення для діагностики захворювань людини, обумовлених порушеннями будови хромосом.

У кінці метафази завершується процес відділення сестринських хроматид одна від одної. Центромера є останнім місцем, де зберігається контакт між хромосомами. Після поділу центромери кожна хроматида стане самостійною дочірньою хромосомою. Метафаза закінчується різким відокремленням двох хроматид кожної хромосоми.

Анафаза. Це найкоротша фаза, що триває декілька хвилин. В'язкість цитоплазми знижується, парні хроматиди кожної хромосоми майже одночасно розділяються і починають порівняно швидко переміщатися до протилежних полюсів клітини. Кожна хроматида при цьому стає самостійною хромосомою. Хромосоми, що розходяться, мають форму зігнутих під гострим кутом тілець, причому місце згину розташовується на ділянці центромери і направлене до полюса клітини, а кінці хромосом – до її центру. Мікротрубочки веретена при цьому вкорочуються. У групах, що рухаються до протилежних полюсів, кількість хромосом та їхня структура однакові. Наприкінці анафази хромосоми починають поступово деспіралізуватися.

Телофаза. У цій останній фазі клітинного циклу завершуються процеси утворення двох дочірніх клітин з однієї материнської. Телофаза починається після того, як дочірні хромосоми, що складаються тепер знову з однієї хроматиди, досягають різних полюсів клітини і припиняють рух. Після цього вони деспіралізуються, хроматин набуває вигляду, характерного для ядра в період між поділами. Навколо кожного із клубків деспіралізованих хромосом виникає ядерна оболонка, з'являються нові ядерця. Таким чином формуються дочірні ядра і набувають будови, характерної для клітини до поділу.

Цитокінез. Цитокінез завершує процес поділу. Відбувається поділ цитоплазматичної маси і клітинних органел на дві половини. У результаті цитокінезу кожна дочірня клітина успадковує приблизно рівний набір клітинних компонентів. Збільшення кількості всіх компонентів материнської клітини не вимагає точного контролю. Якщо в ній є багато молекул або органел певного типу, то достатньо того, щоб їхнє число приблизно подвоїлося протягом циклу, і потім вони приблизно порівну розді-

лилися між двома дочірніми клітинами. Збільшення органел відбувається задовго до початку цитокінезу й реалізується різними шляхами. Мітохондрії ростуть і діляться напівавтономно, апарат Гольджі та ЕПС фрагментуються на везикули, які послугуються утворенню нових клітинних органел, тоді як рибосоми "розмножуються" у результаті активності ядра (синтез рРНК) і процесів трансляції рибосомальних білків.

Цитокінез тваринних клітин опосередковується **скоротливим кільцем** – структурою з філаментів актину і міозину II, яка формується під плазматичною мембраною (рис. 13.6, А). Розташування цього кільця визначається положенням мітотичного веретена. У результаті тіло клітини розділяється **борозною поділу** в площині, що проходить через метафазну пластинку, перпендикулярно до вісі веретена поділу. Розділення відбувається за рахунок скорочення актино-міозинових комплексів скоротливого кільця, яке стягує плазматичну мембрану всередину, до повного перетягування клітини навпіл.

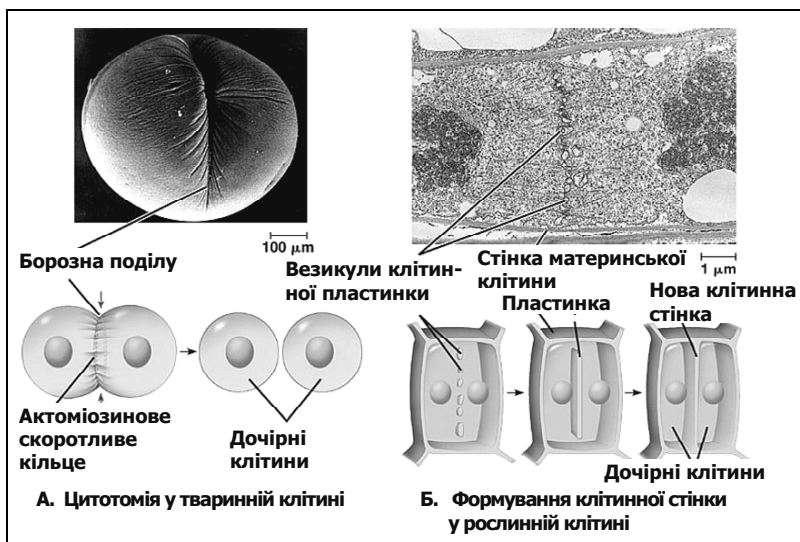


Рис. 13.6. Порівняння цитотомії тваринної (А) і рослинної (Б) клітини.
 А – яйцеклітина морського їжака (×30); Б – тваринна клітина;
 В – рослинна клітина

Мітотичні події в рослинних клітинах у цілому подібні до процесів, які спостерігаються у тваринних клітинах (рис. 13.5, Б). Хоча найбільш високоорганізовані рослинні клітини не містять видимих центріолей, аналогічна ділянка рослинної клітини діє як центр організації мікротрубочок, від якої радіально відходять мікротрубочки веретена. Крім того, порівняно з тваринною клітиною, форма рослинної клітини в мітозі значно не змінюється, тому що вона оточена твердою клітинною стінкою.

У рослинних клітинах не формується борозна поділу, розділення тіла материнської клітини на дві дочірніх відбувається без перетягування цитоплазми. Протягом телофази нова клітинна мембрана і клітинна стінка формуються з мембранних везикул, які зливаються у перпендикулярній площині в лінію, що розділяє два ядра. У цьому процесі задіяні залишкові мікротрубочки веретена поділу (див. нижче)

ДИНАМІКА МІТОТИЧНОГО АПАРАТУ В ПРОЦЕСІ МІТОЗУ

Мітотичний цикл розподілу хромосом пов'язаний із двома контрольними точками у клітинному циклі: "руйнування" ядерної оболонки під час пізньої профази і прикріплення мікротрубочок до кінетохорів сестринських хроматид для їхнього переміщення в метафазі й анафазі.

Помилки в цих процесах у мітозі можуть приводити до відсутності або появи додаткових хромосом, що викликає аномалії розвитку, якщо вони відбуваються під час ембріогенезу, та інші соматичні патології, якщо вони відбуваються після народження. Для гарантованого проходження безпомилкового мітозу в мільярдах клітинних поділів, які відбуваються протягом життя організму, розвинувся надзвичайно "організований" механізм цього процесу, який координує на кожному критичному кроці одночасну дію моторних білків мікротрубочок і динаміку збирання останніх.

Будова мітотичного апарату

Організація і структура мітотичного апарату в мітозі залежить від функціонування центросом і центріольного циклу (рис. 13.2). Як тільки кожна половина метафазного мітотичного апарату виходить від полярної центросоми, подальше збирання залежить від дуплікації центросоми і руху дочірніх центросом до протилежних половин клітини. Цей процес (*центріольний, або центросомний, цикл*) починається під час фази G1, коли центріолі та інші компоненти центросоми подвоюються.

Мітотичний апарат не має постійної фіксованої структури: він безперервно змінюється протягом мітозу, за винятком лише короткого моменту в метафазі, коли хромосоми розташовані по екватору клітини і мітотичний апарат здається статичним.

Мітотичний апарат у метафазі має дві основні частини (рис. 13.7):

(1) *центральне мітотичне веретено* – білатерально-симетричний пучок мікротрубочок, розділений по екватору клітини метафазною пластинкою хромосом;

(2) пара *зірок* – пучок мікротрубочок на кожному полюсі веретена.

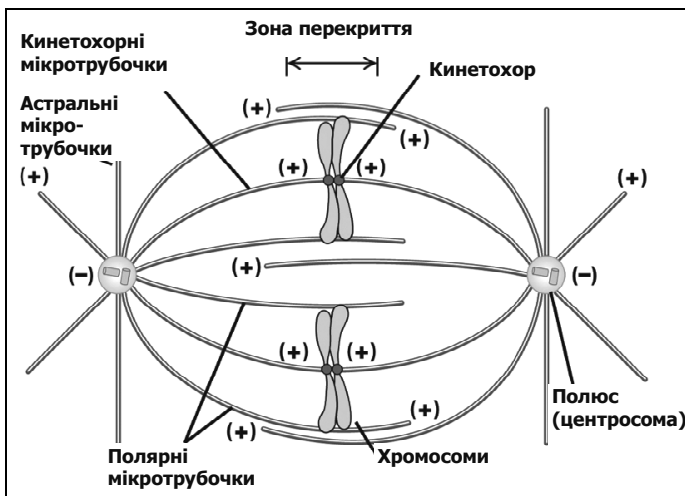


Рис. 13.7. Структура мітотичного апарату вищих еукаріотів
(за Лодішем І., Берком А., Кайзером К. та ін., 2008)

У кожній половині веретена окрема центросома на полюсі формує три функціонально різні набори мікротрубочок, мінус-кінці яких сходяться у центросомі (рис. 13.7).

Один набір (зіркові, або *астральні, мікротрубочки*) формує на кожному полюсі "зірку"; вони радіально виходять від центросоми до кортексу клітини, де допомагають розміщувати мітотичний апарат, утримувати його, а пізніше – сегрегувати групи хромосом і визначити розташування площини поділу клітини під час цитокінезу. Інші два набори мікротрубочок становлять веретено. *Кінетохорні мікротрубочки* (другий набір) приєднуються до кінетохорів. Третій набір, *полярні мікротрубочки*, не взаємодіють із хромосомами, але перекриваються з такими самими полярними мікротрубочками, що йдуть від протилежного полюса.

У *зоні перекриття*, на екваторі клітини, обидві половини веретена утримуються двома типами взаємодій з формуванням білатерально симетричного мітотичного апарату:

- (1) *латеральні взаємодії між (+)-кінцями полярних мікротрубочок*, що перекриваються в зоні екватора;
- (2) *взаємодії між кінцями кінетохорних мікротрубочок від кожного полюсу і кінетохорами сестринських хроматид.*

Подібна організація мітотичного апарату – основа мітозу в усіх організмів, але зовнішній вигляд мітотичного апарату (кількість мікротрубочок у веретені, загальний розмір мітотичного апарату), як і тривалість мітотичних рухів, може широко варіювати серед різних організмів. Крім того, різні групи організмів відрізняються довжиною або кількістю астральних мікротрубочок.

Сестринські хроматиди хромосом метафази транспортуються до кожного полюсу по кінетохорних мікротрубочках.

Прикріплення хромосоми до (+)-кінця кінетохорних мікротрубочок опосередковується великим білковим комплексом, *кінетохором*, який виконує кілька функцій:

- захоплення і прикріплення кінців мікротрубочок до хромосом;

- генерування сили руху хромосом уздовж мікротрубочок;
- регуляція розділення хромосом та їхня транслокація до полюсів.

Кінетохор уперше візуалізується під час пізньої профазі і являє собою пластинчасту структуру в зоні центромери (рис. 13.8). Він має внутрішній і зовнішній шар, занурені у фіброзну корону. Центромера – ділянка конденсованої хромосоми, де сестринські хроматиди пов'язані найтісніше. Локалізація центромери, а отже, і кінетохору, безпосередньо контролюється специфічною послідовністю хромосомної ДНК – *центромерною ДНК*.

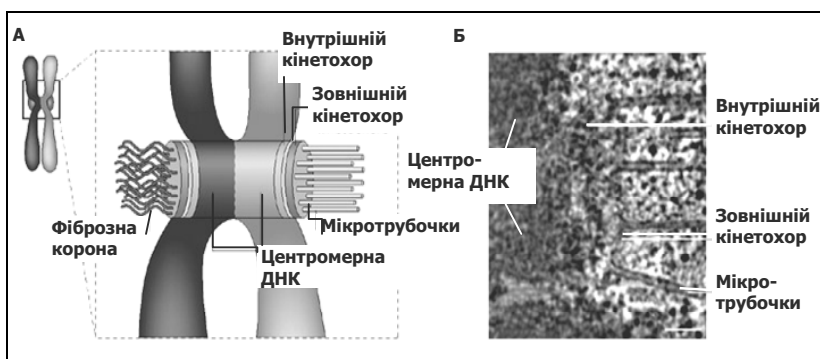


Рис. 13.8. Ультраструктура кінетохору хребетних: А – схема фрагмента мітотичної хромосоми з парними сестринськими хроматидами; Б – електронна мікрофотографія кінетохору мітотичної хромосоми (за Чизменом І. М., Десаєм А., 2008)

Зростання динамічної нестабільності мікротрубочок у мітозі

У мітозі спостерігається високий кругообіг тубуліну в мікротрубочках. Під час мітозу перші ознаки зміни у стабільності мікротрубочок відмічаються у профазі, коли довгі інтерфазні мікротрубочки зникають і замінюються на мітотичні. Мітотичні мікротрубочки, які зароджуються в новореplikованих центросомах, більш численні, коротші й менш стабільні,

ніж інтерфазні. Збільшення обороту тубуліну дозволяє мікротрубочкам швидше збиратися і розбиратися під час мітозу.

Швидко подовжуючи /вкорочуючи свій (+)-кінець, динамічна мікротрубочка діє подібно до щупа, який здатний обстежити оточення, що містить багато хромосом. У результаті відбувається приєднання (+)-кінця мікротрубочки до кінетохору, кінець мікротрубочки кепується, а отже, на певний час стабілізується. Врешті кожна із двох сестринських хроматид у хромосомі виявляється захопленою мікротрубочками, що виходять із найближчих полюсів. У міру прогресії мітозу до метафази кожен кінетохор виявляється приєднаним ще й до додаткових мікротрубочок.

Під час пізньої профазі (прометафази), хромосоми, що конденсуються, прикріплені до (+)-кінців кінетохорних мікротрубочок і рухаються до екватора веретена. При цьому хромосоми проявляють характерну поведінку, рухаючись туди-сюди між полюсом і екватором ("танок" хромосом). Такі рухи – результат змінної полімеризації / деполімеризації (+)-кінців кінетохорних мікротрубочок.

На момент настання метафази моторні білки, асоційовані з обома кінцями кінетохорних мікротрубочок і з дистальними кінцями полярних мікротрубочок, на плечах хромосом генерують протилежні сили, які підтримують положення захопленої хромосоми на рівній відстані від двох полюсів веретена (рис. 13.9).

Зміни мітотичного апарату в анафазі

Ті самі сили, які формують веретено протягом профазі і метафази, спрямовують сегрегацію хромосом до різних полюсів і в анафазі. Анафаза поділяється на дві різні стадії, анафаза А і анафаза В (або рання і пізня анафаза).

Анафаза А характеризується вкороченням кінетохорних мікротрубочок, які тягнуть хромосоми до полюсів (рис. 13.10, А).

У процесах укорочення (деполімеризації) (+)-кінців кінетохорних мікротрубочок та утриманні хромосом на них під час анафази задіяні кінетохор-асоційовані кінезини, такі як, наприклад, МСАК та CENP-E відповідно.

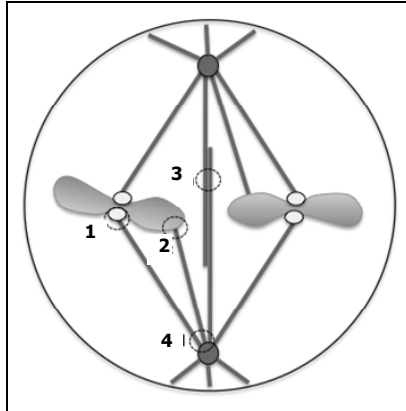


Рис. 13.9 . Сили, що утримують структуру мітотичного веретена і позицію хромосом під час метафази:

- 1 – моторні білки, асоційовані з кінетохором і (+)-кінцями мікротрубочок;
- 2 – контакти полярних мікротрубочок із плечами хромосом;
- 3 – латеральні взаємодії полярних мікротрубочок у зоні перекриття;
- 4 – моторні білки на мінус-кінцях мікротрубочок у центросомі

Протягом **анафази В**, ці два полюси відштовхуються один від одного, тягнучи із собою хромосоми в ділянки, які стануть двома дочірніми клітинами (рис. 13.10, Б).

Розштовхування полюсів включає три процеси:

- розштовхувальна сила, генерована кінезин-опосередкованим ковзанням полюсних мікротрубочок відносно одна одної;
- тягнуча сила, генерована кортекс-асоційованим цитозольним динейном;
- подовження полярних МТ на їхніх (+)-кінцях.

Подібні динамічні механізми можуть функціонувати і протягом інших мітотичних фаз.

Телофаза. У телофазі закінчується міграція хромосом до полюсів клітини, у кожного полюса міститься диплоїдний ($2n$) набір монохроматидних хромосом. Починається прогресуюча деспіралізація хромосом і повернення спадкового матеріалу у стан інтерфазного хроматину. Знову відновлюються ядерні мембрани навколо кожної групи хромосом, починають формуватися ядра.

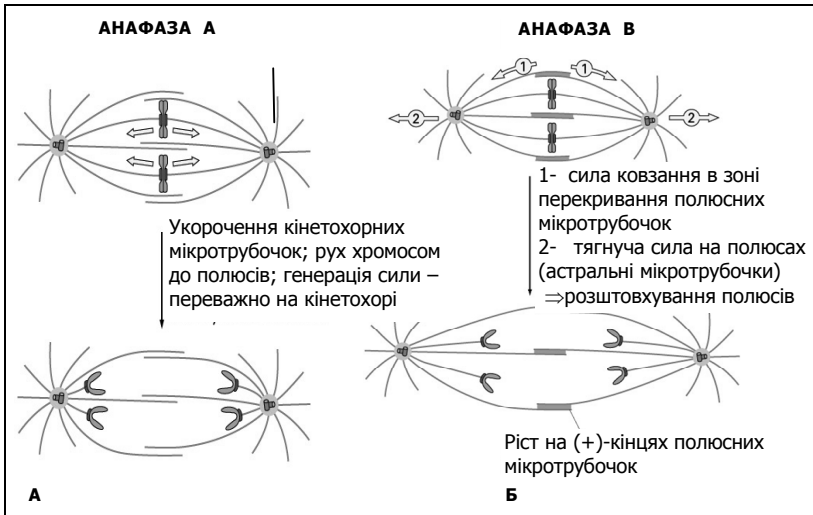


Рис. 13.10. Динаміка мікротрубочок в анафазі
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2002, зі змінами)

У телофазі починається і закінчується процес руйнування мітотичного апарату – дисоціація мікротрубочок веретена поділу. Процес іде від полюсів до екватора материнської клітини: саме в середній частині веретена мікротрубочки зберігаються найдовше (у вигляді залишкового тільця) (рис. 13.11). До цих мікротрубочок залучаються специфічні білки, які формують матрикс залишкового тільця і сприяють правильному завершенню цитокінезу, а також мембранні везикули від апарату Гольджі та, можливо, ендоплазматичної сітки, які фактично постачають мембранний матеріал для ділянки перетягування. Отже, залишкове тільце виступає як регулятор подій цитокінезу.

У рослинних клітинах у кінці телофазі також відбувається розбирання мікротрубочок у полярних ділянках, але вони ще залишаються між двома новими ядрами, крім того, утворюються ще й нові. З пучками цих мікротрубочок зв'язуються численні дрібні вакуолі, які є похідними апарату Гольджі й містять пектинові речовини. За допомогою мікротрубочок численні вакуолі рухаються до екваторіальної площини, де зливаються одна

з одною і утворюють усередині клітини сплюснену вакуоль – **фрагмопласт**, який розростається до периферії клітини, включаючи все нові й нові вакуолі. Так створюється первинна клітинна стінка. Урешті-решт мембрани фрагмопласта зливаються із плазматичною мембраною, відбувається відособлення двох нових клітин (рис. 13.11).

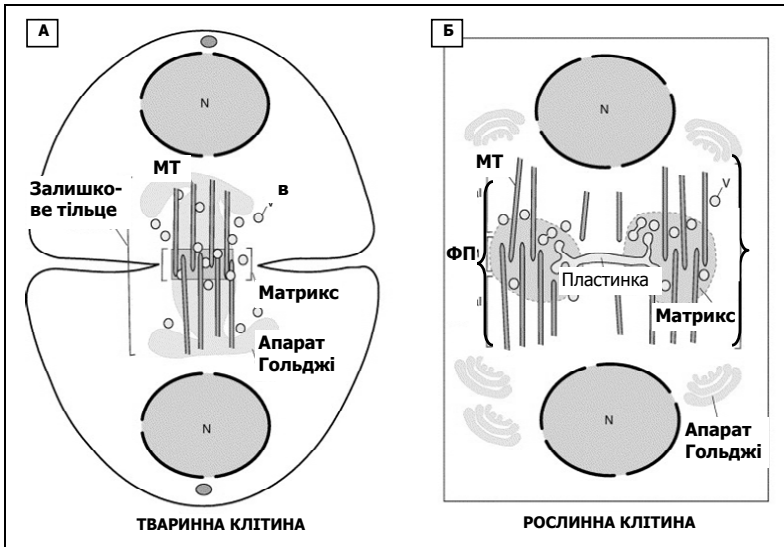


Рис. 13.11. Мікротрубочки в цитокінезі у тваринній (А) і рослинній (Б) клітинах: МТ – мікротрубочки; В – везикули, ФП – фрагмопласт, N – ядро
(за Отегуа М., Вербрюгом К. Ж., Скопом А. Р., 2005, зі змінами)

Біологічне значення мітозу полягає в тому, що він забезпечує точну передачу спадкової інформації від материнських клітин дочірнім протягом будь-якої кількості послідовних клітинних циклів. При цьому зберігається сталість як кількості хромосом, так і вмісту молекул ДНК в ядрах дочірніх клітин. Отже, мітоз забезпечує стабільність каріотипу і є умовою прояву спадковості й основою існування біологічних видів протягом зміни поколінь.

Крім розглянутого нами непрямого поділу клітин (мітозу), існують ще й інші способи – амітоз і ендорепродукція.

Амітоз– прямий поділ клітин, у результаті якого утворюються дві клітини з неоднаковою кількістю генетичного матеріалу. За такого поділу зазвичай відсутня реплікація ДНК, хромосоми не конденсуються, не формується веретено поділу. При амітозі спочатку відбувається поділ ядерця, а потім ядра на дві або декілька частин шляхом перетяжок; далі цитоплазма перешнуровується й утворюються дві або кілька дочірніх клітин. При цьому типі поділу часто спостерігається лише каріокінез: у цьому випадку можуть виникнути дво- і багатоядерні клітини. Якщо ж за поділом ядра йде поділ цитоплазми, то розподіл клітинних компонентів, як і ДНК, здійснюється довільно.

Такий поділ зустрічається в одноклітинних організмів (скажімо, амітозом діляться поліплоїдні макронуклеуси інфузорій). Вважається, що амітоз може зустрічатися і в деяких високоспеціалізованих клітин рослин і тварин з ослабленою фізіологічною активністю, приречених на загибель або за різних патологічних процесів, таких як злоякісний ріст, запалення тощо.

У рослин амітоз можна спостерігати у тканинах ростучих бульб картоплі, в ендоспермі насіння, стінках зав'язі маточки і паренхімі черешків листя. У тварин і людини такий тип поділу іноді зустрічається серед клітин печінки, хрящів, рогівки ока.

Проте, за сучасними даними, амітоз розглядають скоріше не як окрему специфічну форму поділу або деградації клітини, а як прояв певної регуляторної реакції на зміни оточення.

Ендорепродукція – утворення клітин із збільшеним вмістом ДНК. При ендорепродукції утворення нових клітин припиняється, а хромосоми продовжують подвоюватися без розходження, формуючи гігантські політенні хромосоми (про що детально йшлося в розд. 8). У такий спосіб у клітині виникають великі поліплоїдні ядра. Так, у гігантських нейрочитах морського молюска Тритона міститься понад 2×10^5 гаплоїдних наборів ДНК. Те саме відбувається у клітинах шовковидільної залози тутового шовкопряда.

Здатність до ендорепродукції мають не всі клітини. Як постійний процес вона спостерігається у клітинах печінки, епітелію сечовивідних шляхів ссавців.

РЕГУЛЯЦІЯ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ

Клітинний цикл регулюється численними поза- і внутрішньоклітинними факторами і механізмами. До позаклітинних відносять впливи на клітину цитокінів, факторів росту, гормональних і нейрогенних стимулів, на які, у свою чергу, можуть впливати численні фактори зовнішнього середовища. Роль внутрішньоклітинних регуляторів відіграють специфічні білки цитоплазми.

Клітини, які не діляться й перебувають у фазі проліферативного спокою G₀, можуть вступати в клітинний цикл, у G₁-фазу, при стимуляції *мітогенами* – позаклітинними сигнальними речовинами, зазвичай білково-пептидної природи, які стимулюють мітотичний поділ (проліферацію) клітини, безпосередньо впливаючи на внутрішньоклітинні регуляторні механізми клітинного циклу. До мітогенів відносять, зокрема, і *фактори росту* – сигнальні молекули, які індукують безпосередньо ріст клітини, а також впливають на процеси проліферації (активують) та, іноді, диференціації.

Мітогени запускають у клітині шляхи передачі сигналів, які пов'язані з активацією ферментативно активних рецепторів (див. розд. 5) і внутрішньоклітинних каскадів за участю мітоген-активованої протеїнкінази (МАРК), що призводить до мітозу.

З іншого боку, клітини можуть бути затримані в G₁ за дії **антимітогенів** (регуляторів, які пригнічують активність мітогенів).

Тепер відомо багато мітогенів і менша кількість антимітогенів. Вони регулюють життєдіяльність і проліферативну активність клітин, діючи в тонко скоординованому балансі, при порушенні якого в той чи інший бік виникають різноманітні патології. Наприклад, фактор росту епідермісу (EGF) є мітогеном, а трансформуючий фактор росту β (TGFB) – антимітоген. Рецепція цих факторів здійснюється ферментативно активними рецепторами. Рецептор фактора EGF, або EGFR, є прикладом рецепторної тирозинкінази (RTK), а рецептор TGFB є рецепто-

ром із серин-треонінкіназною активністю. Однією із нормальних функцій EGF є сприяння загоєнню ран. Після поранення епідермальні й імунні клітини запалення секретують EGF та інші фактори росту. Це стимулює клітини по краях рани до розмноження, поки рана не "затягнеться". TGF β діє як гальмо в цьому процесі, утримуючи новоутворені клітини епідермісу від надмірного розмноження, і сприяє їхній диференціації, крім того, стимулює продукцію іншими клітинами волокон, що також важливо для формування тканини при загоєнні. Таким чином, цей процес знаходиться під збалансованим контролем функціонально протилежних агентів.

ВНУТРІШНЬОКЛІТИННА РЕГУЛЯЦІЯ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ

Події клітинного циклу відбуваються як ритмічні флуктуації при наявності та/або активації контролюючих молекул. У контролі клітинного циклу залучені два типи регуляторних білків: *цикліни* і *циклінозалежні кінази (CDKs – від cyclin-dependent kinases)*, які формують комплекси. Активність циклінів і CDKs змінюється протягом клітинного циклу.

Першим виявленим циклін-CDK-комплексом був цитоплазматичний фактор **MPF**, який запускає проходження клітини через контрольну точку G₂-checkpoint в М-фазу.

У 1971 р. дві незалежні групи дослідників (Й. Масуї та Д. Сміта) виявили, що овоцити жаби, затримані в G₂-періоді клітинного циклу, можна примусити перейти в М-стадію мікроін'єкцією цитоплазми від інших овоцитів, стимульованих до поділу гормонально (прогестероном). Було встановлено, що певний цитоплазматичний фактор, присутній в оброблених гормоном овоцитах, був достатній для запуску переходу з G₂ / М у клітинах, які не піддавалися дії гормону. Цей цитоплазматичний фактор назвали *фактором, що підтримує дозрівання – MPF (від maturation promoting factor)*.

Другим внеском у розуміння регуляції клітинного циклу став генетичний аналіз дріжджів з різними типами поділу і порушеннями цього процесу (Лі Харвел з колегами, початок 1970-х рр.). Дослідники показали, що для проходження через критичну регуляторну точку в G1-періоді необхідний білок Cdc2 (названий від *cell division cycle mutants*). Подальші дослідження гена *cdc2* дали два важливі висновки. По-перше, молекулярне клонування і секвенування нуклеотидної послідовності показали, що *cdc2* кодує протеїнкіназу – це стало першим свідченням провідної ролі фосфорилування білків у регуляції клітинного циклу. По-друге, був ідентифікований аналогічний людський ген, споріднений гену *cdc2*, і показано, що він здатний функціонувати і в дріжджах, чітко демонструючи консервативність механізму регуляції і, власне, цього регулятора клітинного циклу в різних організмах.

Третя лінія досліджень, яка дозволила поєднати всі отримані відомості, стосувалась білкового синтезу в ранніх ембріонах морських їжаків. Було показано, що вступ ембріональних клітин у поділ потребує нового білкового синтезу. У 1983 р. Т. Хант і його колеги ідентифікували два білки, які проявляють періодичний характер накопичення і деградації в ембріонах морського їжака й молюсків. Ці білки накопичуються протягом інтерфази і потім швидко деградують у кінці кожного мітозу. Хант назвав ці білки **циклінами** і припустив, що вони могли б функціонувати, стимулюючи мітоз, шляхом свого періодичного накопичення і деструкції.

У 1988 р. після очищення фактора MPF із овоцитів жаби відбулося поєднання всіх згаданих фактів.

Показано, що регуляторний фактор MPF складається із двох ключових субодиниць – *cdc-2* і цикліну B, який є регуляторною субодиницею, необхідною для каталітичної активності протеїнкінази *cdc-2*.

Тепер відомо багато інших циклінів (родина білків) і циклінозалежних кіназ. Відкрита першою у дріжджів протеїнкіназа *cdc-2*, яка має аналоги і в інших організмів, у тому числі людини, за сучасною номенклатурою отримала назву CDK1 (від *cyclin-dependent-kinase*).

РОДИНИ ЦИКЛІНІВ І ЦИКЛІНОЗАЛЕЖНИХ КІНАЗ

Родина циклінів

Цикліни – родина цитоплазматичних консервативних білків. Вони мають короткий час напівжиття (від декількох хвилин до десятків хвилин), що забезпечує динамізм їхніх комплексів із CDK.

Характерними рисами всіх циклінів є:

- цитоплазматичні білки, які регулюють активність CDK, зв'язуючись з ними;
- вони не мають власної ферментативної активності;
- їхні рівні протягом клітинного циклу змінюються циклічно, у результаті синтезу й деградації (рис. 13.12).

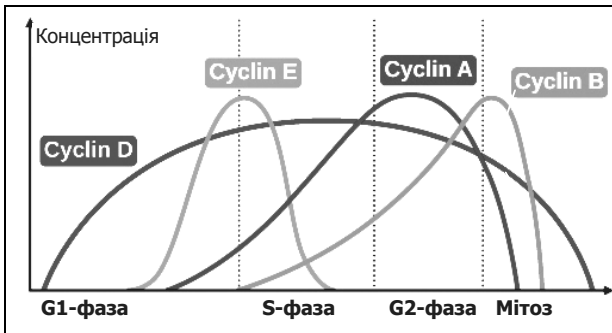


Рис. 13.12. Рівні експресії циклінів у різних фазах клітинного циклу

Усі цикліни мають гомологічну ділянку ("цикліновий бокс"), яка відповідає за взаємодію з CDK. Крім того, вони мають особливу ділянку, яка відповідає за їхню циклічну деградацію – *бокс деструкції*, до якої в певні періоди циклу приєднується молекула *убіквітину*, що виступає "міткою", котра спрямовує відповідні білки до протеолізу в протеасомах. Деградація того чи іншого цикліну веде, у свою чергу, до інактивації відповідної циклінозалежної кінази.

Серед циклінів відомо 15 основних білків. Деякі з них утворюють ще й підродина. Так, підродина циклінів D-типу складається з трьох членів: D1, D2 і D3. Проте далеко не для всіх циклінів установлені на сьогодні конкретні функції.

Добре відомі цикліни поділяють на дві функціональні групи, залежно від етапу клітинного циклу, на якому вони переважно діють (рис. 13.13):

– **G1/S цикліни** – відповідальні переважно за контроль клітинного циклу в G1/S-переході (контрольна точка рестрикції). Наприклад, комплекси циклін D / CDK4, циклін D / CDK6 та циклін E / CDK2 – регулюють перехід від G1 до S фази. Комплекс циклін A / CDK2 – контролює процеси клітинного циклу в S фазі;

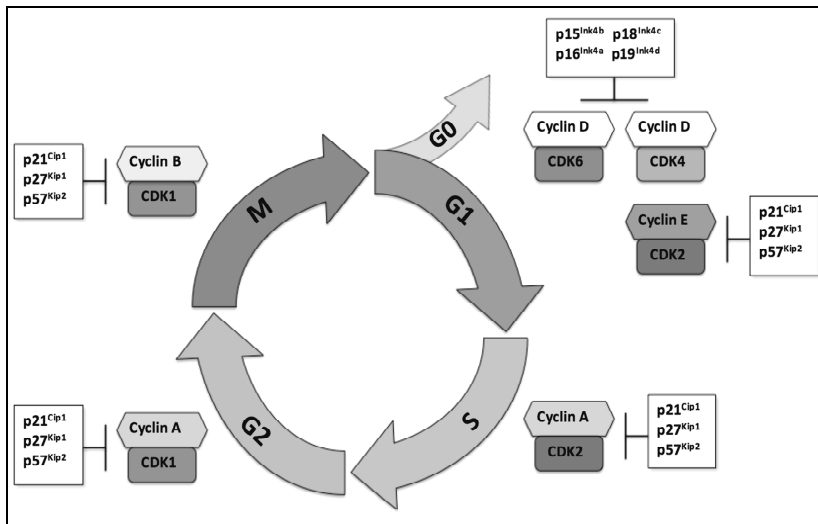


Рис. 13.13. Фази еукаріотичного клітинного циклу, у яких знаходяться контрольні точки перевірки з відповідними регуляторами – циклін / CDK комплексами та інгібіторами

– **G2/M цикліни (мітотичні)** – важливі в контролі клітинного циклу в переході G2/M (мітоз). G2/M цикліни накопичуються в G2 і раптово руйнуються щойно клітина виходить із мітозу

(кінець М-фази). Прикладом є комплекс Циклін В / CDK1, який регулює прогресію від G2 до М-фази (це перший виявлений комплекс MPF, який зараз відомий у всіх організмів).

Циклінозалежні кінази (CDKs)

Клітини еукаріотів мають низку CDKs, які також специфічні для різних етапів клітинного циклу.

Властивості циклінозалежних кіназ:

- це білки, що фосфорилують інші білки з метою їхньої активації або інактивації;
- рівні CDKs зазвичай постійні;
- CDKs неактивні за відсутності циклінів;
- CDKs активуються при приєднанні циклінів;
- задіяні в регуляції процесів клітинного циклу, зокрема у проходженні контрольних точок (G₁-, G₂- і М-checkpoints);
- кожна CDK фосфорилує, модулюючи в такий спосіб активність набору білків – мішеней, специфічних для проходження певної фази клітинного циклу. Наприклад, CDKs S-фази можуть фосфорилувати білки, залучені в реплікацію ДНК.

Основним фактором активації циклінозалежних кіназ є їхня взаємодія з тим чи іншим цикліном. Проте, крім взаємодії з циклінами, активність CDK регулюється додатковими механізмами.

Позитивними факторами регуляції активності CDK є:

- асоціація CDK з їхніми циклінами – партнерами;
- активуюче фосфорилування в CDK консервативного амінокислотного залишку Тре-160 (каталізується ферментом САК (***CDK-activating kinase***), який також є циклін-кіназним комплексом – CDK7 – циклін Н).

Негативні фактори, які інактивують циклінозалежні кінази і, відповідно, припиняють процеси того чи іншого етапу циклу, це:

- деградація відповідного цикліну;
- інактивуюче фосфорилування залишків Тир біля N-кінця CDK протеїнкіназою Wee1 (відміна такої інактивації здійснюється

- за рахунок дефосфорилування цих залишків фосфатазами родини Cdc25 (асоційовані з ядром));
- зв'язування білків – інгібіторів циклінозалежних кіназ (СКІ) з CDK / циклін комплексами.

Виділяють дві родини білків – інгібіторів CDK. Члени Cip / Kip родини (білки *p21*, *p27*, *p57*) регулюють усі стадії прогресії через G1 і S-фазу, пригнічуючи комплекси CDK2, 4, і 6 із циклінами A, D і E. Навпаки, члени Ink4 родини (білки *p15*, *p16*, *p18*, *p19*) специфічні для комплексів CDK4 і 6 з цикліном D, отже, Ink4 СКІ регулюють тільки проходження через точку рестрикції в G1.

Нагадаємо, що контрольні точки клітинного циклу – це молекулярні контрольні механізми, які регулюють поділ клітин і зупиняють продовження клітинного циклу, якщо події попереднього етапу не були коректно завершені.

Основні контрольні точки в ссавців взаємопов'язані з регуляторними комплексами (рис. 13.13):

- у **кінці фази G1** (точка рестрикції) клітина перевіряє якість ДНК, присутність специфічних факторів росту і розмір клітини. Зупинка в цій точці дозволяє провести репарацію ушкодженої ДНК, перш ніж клітина вступає в фазу реплікації. Якщо ДНК не може бути репарована, у клітині індукується апоптоз. Фаза, у якій клітина не продовжить цикл – G0-період. Ця точка контролюється комплексами циклін D / CDK4/6 і циклін E / CDK2;
- у **фазі S** постійній контроль цілісності ДНК попереджає реплікацію мутованих основ і дозволяє провести репарацію можливих помилок, які виникають у процесі реплікації. Білки, що залучені в такі виявлення пошкоджень ДНК, це ДНК-полімераза Pol ϵ і фактори реплікації PCNA і RFC. Ця контрольна точка контролюється комплексом циклін A / CDK2;
- **наприкінці фази G2** контрольні механізми клітини перевіряють, чи є умови для мітозу (розмір клітини, якість ДНК і наявність поживних речовин, необхідних для мітотичної фази) і затримують початок мітозу до завершення реплікації ДНК і до досягнення умов, необхідних для поділу. Якщо

таких умов немає, клітини вступають у стан спокою, де може здійснюватися репарація ДНК або апоптоз. Ця точка контролюється комплексом циклін А / CDK1;

- **на початку анафази** контрольна точка збору веретена зупиняє мітоз, якщо не всі хромосоми вирівняні в екваторіальній площині, а їхні центромери неправильно з'єднанні з мікротрубочками, а отже, не готові до рівномірного розподілу. Ця точка керується комплексом стимуляції анафази – APC / C (англ. – *anaphase - promoting complex / cyclosome*).

Комплекс стимуляції анафази APC / C (циклосома) – великий білковий комплекс, який відіграє провідну роль в активації анафази мітозу. Функціонально він є ферментом убіквітинлігазою і каталізує приєднання молекул убіквітину до різних білків-мішеней, які в результаті піддаються протеолізу. Одною з ключових мішеней дії комплексу APC / C є білки, руйнування яких веде до роз'єднання сестринських хроматид (скажімо, білок *секурин*). Іншою важливою мішенню є мітотичні цикліни, деградація яких веде до завершення мітозу й цитокінезу. Після завершення мітозу у фазі G1 комплекс APC стримує активність циклінозалежних кіназ шляхом протеолітичного руйнування S- і M-циклінів.

Серед негативних регуляторів клітинного циклу, які зупиняють його прогресію у випадках пошкодження клітинних компонентів чи невідповідних умов, добре відомі *білок ретинобластому (Rb)*, *білок p53*, а також *білок-інгібітор p21*, який вже згадувався як негативний регулятор циклінозалежних кіназ.

Ці білки належать до групи білків-супресорів пухлин і виявляються в багатьох клітинах. Багато відомостей про регуляцію клітинного циклу отримується у дослідженнях, проведених з клітинами, які втратили регулюючий контроль. Усі ці три типи регуляторних білків були свого часу виявлені як ушкоджені або такі, що не функціонують у клітинах, які перейшли до неконтрольного поділу (стали раковими). У кожному випадку основною причиною неконтрольованого проходження клітинного циклу була дефектна копія регуляторного білка.

У нормальних клітинах білки Rb, p53, p21 діють насамперед у контрольній точці в G1-періоді.

Білок p53– багатофункціональний білок, який має величезний вплив на здатність клітини до поділу; він діє, коли є пошкоджена ДНК у клітинах, які здійснюють підготовчі процеси у G1-періоді. Якщо пошкоджена ДНК виявлена, p53 зупиняє клітинний цикл і залучає ферменти для репарації ДНК. Якщо ДНК не може бути відновлена, p53 може викликати *апоптоз* (запрограмовану загибель клітини), щоб запобігти дуплікації пошкоджених хромосом. Рівень білка p53, крім того, зростає за таких несприятливих для клітини факторів, як гіпоксія, тепловий шок, радіаційне опромінення, нестача нуклеотидів тощо.

Активованій білок p53 є специфічним транскрипційним фактором. Гени, транскрипцію яких стимулює білок p53, кодують білки-компоненти апоптичної програми (проапоптичні компоненти) і білки, які регулюють клітинний цикл.

Для p53 відомо також і низку інших функцій, пов'язаних з регуляцією клітинного циклу. При наростанні рівня p53, ним запускається також експресія гена, що кодує білок p21.

Білок p21 підсилює процеси зупинки циклу, викликані білком p53, шляхом зв'язування і пригнічення активності CDK / циклін комплексів. Крім того, p21 може безпосередньо пригнічувати реплікацію ДНК в клітинах S-фази. Зокрема, p21 пов'язаний з фактором PCNA (proliferating cell nuclear antigen), який є субодиницею ДНК-полімерази σ .

Чим більше клітина піддається стресовим впливам, тим більш високі рівні p53 і p21 накопичуються у клітині, що робить менш імовірним перехід такої клітини в S-фазу.

Білок Rb здійснює свій регулювальний вплив на інші позитивні білки-регулятори. Rb контролює розмір клітин. В активному стані дефосфорильований Rb зв'язується з білковими транскрипційними факторами, найбільш часто – з E2F. Фактори транскрипції "включають" певні гени, унаслідок чого відбувається продукція відповідних білків, що кодуються цими генами. При зв'язуванні Rb з E2F, продукція білків, необхідних для G1 / S переходу, блокована (рис. 13.14). Коли клітина росте в G1-періоді, зростає і концентрація залежного від факторів росту цикліну D. Він активує відповідні циклінозалежні кіна-

зи і білок Rb поступово фосфорилується, що веде до його інактивзації. Фосфорильований та інактивований Rb відокремлюється від фактора E2F, який тепер може "включити" транскрипцію гена, який забезпечує синтез білка переходу до наступної, S-фази, блокування такого переходу знімається.

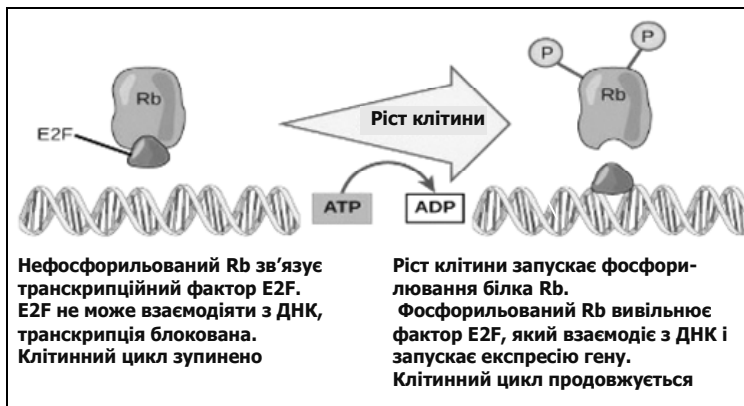


Рис. 13.14. Механізм регуляції прогресії клітинного циклу білком Rb

Для успішного проходження клітини через усі контрольні точки всі позитивні регулятори мають бути "включеними" і всі негативні регулятори – "вимкненими".

ПАТОЛОГІЯ МІТОЗУ

Ефективність контролю клітинного циклу не завжди буває стовідсотковою. Цим пояснюється поява як пухлинних клітин (утворення котрих завжди пов'язано з трансформацією певної сукупності генів), так і вікових змін у популяції клітин, які діляться.

Процес мітотичного поділу клітин дуже чутливий до дії найрізноманітніших факторів. Найчастіше зустрічається *зупинка мітозу на стадії метафази*. Це відбувається в результаті змін у структурі веретена поділу. Багато речовин, що зупиняють

мітоз (скажімо, такі *цитостатики*, як *колхіцин* і *колцемід*), перешкоджають полімеризації тубулінів, через що нові мікротрубочки веретена не утворюються, а вже існуючі цілком деполімеризуються. Руйнування мітотичного апарату відбувається і за дії холоду – при зниженні температури до $+4^{\circ}\text{C}$ відбувається практично повна (але оборотна) деполімеризація тубуліну в мікротрубочках. При цьому мітотичні хромосоми збираються у центрі клітини, проте не утворюють метафазну пластинку, а розташовуються без усякого порядку (К-мітоз, від назви основного деполімеризуючого агента, колхіцину). До подібних результатів приводить дія на клітину інгібіторів синтезу АТФ (*динітрофенол*, *олігоміцин*) і деяких отруйних речовин (*меркаптоетанол*). Якщо дія цих факторів короткочасна, то можливі відновлення мікротрубочок веретена і клітинного поділу. Якщо впливи помірні, то клітини можуть не загинути, а без мітозу входить в наступний клітинний цикл. У цьому разі хромосоми, які не розійшлися, деконденсуються, утворюється нова ядерна оболонка і нове, але вже тетраплоїдне ядро, яке переходить у G_1 -фазу. Так виникають поліплоїдні клітини за дії колхіцину.

До аномалій поділу клітин відносять і *багатополюсні мітози*. У цьому випадку в метафазі утворюється не біполярне веретено, а веретено з трьома чи чотирма полюсами. Така аномалія пов'язана з порушеннями центросомного циклу і збільшенням кількості центріолей у клітині. Ці зміни можуть відбуватися спонтанно (що характерно для пухлинних клітин) або після дії різних інгібіторів мітотичного поділу. Такі аномальні три- і чотириполюсні мітотичні фігури можуть вступати в анафазу і брати участь у розходженні хромосом до полюсів, після чого може настати цитотомія з утворенням трьох або чотирьох клітин. У цих випадках не відбувається рівномірного розподілу хромосом, а утворені клітини отримують випадкові та зменшені хромосомні набори. Клітини з ненормальною кількістю хромосом називають *анеуплоїдними*. Вони, як правило, швидко гинуть.

Порушення мітотичного поділу можуть бути пов'язані зі *структурними змінами самих хромосом*. Так, вплив різних форм променистої енергії (ультрафіолетове світло, рентгенівські промені тощо) або різних алкілувальних сполук (іприт та ін.) може викли-

кати порушення структури хромосом і, як результат, зміни перебігу мітозу. У результаті таких впливів виникають *хромосомні аберації*. При розриві хромосоми та її частина, яка не містить центромер, не бере участі у хромосомному поділі, відстає від основної маси хромосом і випадково виявляється в одній із дочірніх клітин. Такий фрагмент хромосоми в інтерфазі покривається власною ядерною оболонкою (виникає додаткове мікроядро). Зрозуміло, що при цьому дочірні клітини будуть анеуплоїдними.

В інших випадках у результаті об'єднання двох ушкоджених хромосом виникає одна, але з двома центромерами, які розтягуються до протилежних полюсів. При цьому між двома групами хромосом у анафазі й телофазі спостерігається "місток", виникає розтягнута аберантна хромосома.

Аномалії мітотичного поділу можуть бути спричинені порушеннями цитотомії. У цьому випадку виникають дво- й багатоядерні клітини, що пов'язано з пригніченням утворення актинових мікрофіламентів, які беруть участь у формуванні клітинної перетяжки наприкінці телофази.

ФОРМИ ЗАГИБЕЛІ КЛІТИН

Однією із найважливіших характеристик живого є здатність до гомеостазу, який включає в себе різноманітні способи збереження постійних умов в організмі. Клітини в організмі постійно діляться, нові клітини замінюють старі, у яких із часом накопичуються ушкодження, тому для збереження постійної кількості клітин організм повинен знищувати відпрацьовані клітини, які вже втратили свої функції.

Традиційно увагу зосереджують на двох формах загибелі клітин – *це некроз*, який викликається патогенними чинниками, і *апоптоз*, який називають запрограмованою загибеллю клітин, обумовленою внутрішньоклітинною програмою.

Проте сьогодні, крім апоптозу, виділено цілу низку шляхів запрограмованого видалення клітин. Більше того, установленно також програмований характер біохімічних змін, що ведуть до некрозу.

Отже, у сучасній класифікації програмованої смерті клітини (ПСК) виділяють такі її типи:

Апоптоз – ПСК I типу;

Аутофагія – ПСК II типу;

Некроз – ПСК III типу;

Аноїкіс – ПСК IV типу, смерть клітини, викликана порушенням контактів з сусідніми клітинами і матриксом.

Як окремі форми загибелі клітини також розглядаються *мітотична катастрофа* (апоптоз клітини під час патологічного мітозу), *сенесенс* (клітинне старіння з певними морфологічними змінами в результаті вкорочення теломер).

Програмована смерть клітини – генетично контрольований фізіологічний процес, який позбавляє організм від небажаних або несправних елементів для підтримки нормального розвитку і гомеостазу багатоклітинних організмів. Дерегуляція програм клітинної смерті призводить до цілого ряду патологічних станів, в тому числі онкотрансформації клітин.

Можна виділити три загальні механізми, які запускають загибель клітин:

- сигнали, генеровані самою клітиною, які можуть виникнути у зв'язку з віком, інфікуванням, неправильним мітозом або з інших причин. Цей механізм відомий як *внутрішній*, або *мітохондріальний*, шлях;
- активація "рецепторів смерті" на поверхні клітини, які реагують на зовнішні сигнали, такі як гормони або інші хімічні фактори;
- зовнішній запуск програми смерті активними формами кисню, вільними радикалами, які є небезпечними для організму.

АПОПТОЗ

Апоптоз – основна й найбільш вивчена форма програмованої клітинної смерті (ПСК типу I). Уперше термін "апоптоз" (давньогрецьке – "*опадання*", або "*листопад*") ввели Дж. Керр із співробітниками, вірно припустивши, що це явище відіграє

важливу роль в нормальній життєдіяльності організму і порушення в його механізмі можуть стати причиною захворювань.

Цей механізм запускається різними сигналами: зв'язуванням специфічних кілерних лігандів з рецепторами, нестачею факторів росту / виживання, ушкодженням ДНК і руйнуванням цитоскелета, гіпоксією та іншими несприятливими умовами.

Нині досліджено багато механізмів, за допомогою яких апоптоз може здійснюватися в еукаріотичних клітинах. Один із таких механізмів (*внутрішній*) – **мітохондріальний шлях** – пов'язаний з вивільненням проапоптичних білків родини Bcl-2 та зі зміною мембранного потенціалу мітохондрій. Цей шлях залежить від протеолітичного каскаду активації та виділення у цитоплазму цитохрому *c*, флавопротеїну AIF (*apoptosis inducing factor* – фактора, що індукує апоптоз), прокаспаз, що є ключовою подією при апоптозі. У свою чергу, це веде до активації каспаз – великої родини цистеїнових протеаз, які залучені до ініціації апоптозу і участі в організованому "розбиранні" клітин. Очевидно, цей шлях має місце у всіх клітин еукаріотичних організмів, що мають мітохондрії.

Другий шлях (*зовнішній*), достатньо широко розповсюджений у нижчих еукаріотів і рослин, є залежним від ферментів, подібних каспазам ссавців, які беруть початок від поверхневих рецепторів клітинних мембран, що здійснюють трансдукцію (передачу) апоптичних сигналів. Це родина так званих "**рецепторів смерті**" (серед найбільш вивчених рецепторів – Fas, він же APO-1, або CD95; TNFR-1, він же p55, або CD120a; DR3, DR4, DR5), які мають прямий зв'язок з механізмом апоптозу.

Усі "рецептори смерті" – трансмембранні білки, які характеризуються наявністю загальної послідовності з 80 амінокислот у цитоплазматичному домені (так званий "домен смерті", death domain, DD). Саме з цими рецепторами в багатоклітинних еукаріотів пов'язаний інший шлях апоптозу, так званий **інструктивний апоптоз**. Його основою слугує механізм передачі суїцидного сигналу від мембранних "рецепторів смерті" через каскад сигнальних білків, куди входить каспазоподібний фермент, до мітохондрій і потім у ядро. На сьогодні описано ряд інших взаємозалежних шляхів, по-

в'язаних із внутрішнім механізмом апоптозу, у яких задіяні різноманітні проапоптичні білки.

Апоптоз за рядом морфологічних ознак (рис. 13.15) відрізняється від **аутофагії** (лізосомальної деградації внутріклітинних білків, ліпідів, нуклеїнових кислот та органел), **некрозу** (який є результатом гострого запального ушкодження тканини) і **піроптозу** (прозапальної смерті макрофагів і моноцитів, в основі якої лежить надлишкова продукція інтерлейкіну-1, що супроводжує інфекційні процеси, викликані багатьма видами мікроорганізмів).

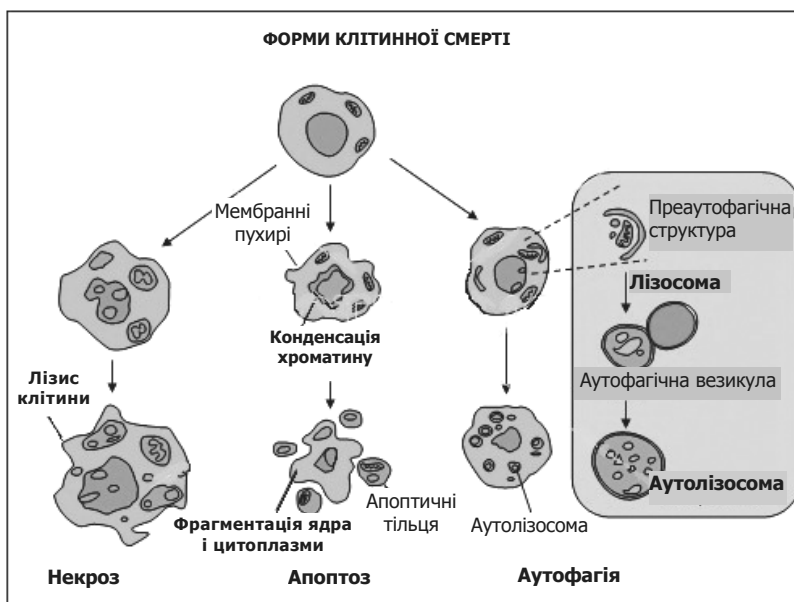


Рис. 13.15. Загальні морфологічні особливості різних форм клітинної смерті

Морфологічні прояви апоптозу

Апоптоз зустрічається майже в усіх типах клітин організму, при цьому відмічається морфологічна подібність змін у різних клітинах, що вступають на цей шлях. Одними з перших характерних змін є стискування клітини і втрата нею контактів з оточуючими її клітинами й міжклітинним матриксом.

На ранніх стадіях апоптозу плазматична мембрана клітини залишається інтактною. Клітина експресує специфічні сигнальні молекули, завдяки чому навколишні клітини впізнають і фагоцитують її. Одним із перших таких сигналів є експозиція фосфатидилсерину в зовнішньому мембранному шарі. Пізніше відбувається зниження мітохондріального трансмембранного потенціалу і вивільнення цитохрому *c*. Для полегшення свого поглинання апоптична клітина зменшує свій об'єм, викачуючи іони (K^+ , Cl^- , органічні осмоліти) і перебудовуючи цитоскелет. Плазматична мембрана клітини починає формувати пухирці, що у відсутності фагоцитозу веде до формування апоптозних тілець, які містять конденсовані або морфологічно не змінені органели. Також скорочення клітини зазвичай супроводжується ущільненням ядерного вмісту. Відбувається агрегація хроматину і фрагментація ядра. Розщеплення ДНК починається з утворення фрагментів довжиною 50–300 тис. п. н., що приблизно відповідає довжині ДНК у петлях хромосом. Потім ці фрагменти розпадаються до нуклеосом та їхніх олігомерів.

На світлооптичному рівні апоптичні клітини виглядають як округлі або овальні скупчення інтенсивно еозинофільної цитоплазми з щільними фрагментами ядерного хроматину. Оскільки формування апоптозних тілець та їхній фагоцитоз відбуваються швидко, то на гістологічних препаратах апоптоз виявляється лише при його значній вираженості. Крім того, апоптоз, на відміну від некрозу, ніколи не супроводжується запальною реакцією, що також утруднює його гістологічне виявлення.

Морфологічні зміни чіткіше виявляються в електронно-мікроскопічних дослідженнях. Для клітини у стані апоптозу характерно:

- *зменшення об'єму клітини* – цитоплазма ущільнюється, органели розташовуються більш компактно;
- *конденсація хроматину* – найбільш характерний прояв апоптозу. Хроматин конденсується по периферії ядра, прилягаючи до ядерної оболонки, утворюються чітко окреслені щільні маси різної форми і розмірів. Саме ядро може розпадатися на два і більше фрагментів. В ос-

нові конденсації хроматину лежить розщеплення ядерної ДНК на нуклеосомні фрагменти (кратні 180–200 пар основ), тоді як при некрозі довжина фрагментів ДНК варіює. Фрагментація ДНК в нуклеосомах відбувається при дії кальцієчутливої ендонуклеази;

- *формування апоптотних тілець*. В апоптичній клітині спочатку формуються глибокі впинання поверхні з утворенням порожнин, що веде до фрагментації клітини – формування оточених мембраною апоптотних тілець, які складаються із цитозолу і щільно розташованих органел із фрагментами ядра або без них. Фагоцитоз апоптотних тілець макрофагами чи іншими клітинами активується рецепторами цих клітин; фагоцитовані апоптичні тілця руйнуються в лізосомах.

АУТОФАГІЯ

Аутофагічна загибель клітин, або тип II ПСК, є клітинним процесом, який слугує для захисту клітини від стресу. Вона є еволюційно консервативним механізмом деградації внутрішньоклітинних компонентів.

Механізм такої форми загибелі клітин знаходиться під жорстким генетичним контролем і активується за відсутності або нестачі поживних речовин, наявності в клітині ушкоджених органел або частково денатурованих білків за допомогою добре вивченого складного процесу, що залучає різноманітні регуляторні білки.

Описано три варіанти цієї форми ПСК: *макроаутофагія*, *мікроаутофагія* і *шаперон-опосередкована аутофагія*. При цих варіантах аутофагія активується у відповідь на харчове та енергетичне голодування, коли клітина захоплює макромолекули і білки (мікроаутофагія), ділянки цитоплазми, органели (макроаутофагія). Після перетравлення в лізосомах вони стають матеріалом для синтезу молекул і сприяють експресії генів, які можуть запобігати передчасній загибелі клітин. Аутофагія вва-

жається основною формою для збереження клітинного гомеостазу в умовах стресу, викликаного харчовим голодуванням, нестачею енергії та гіпоксії.

ПРОГРАМОВАНІЙ НЕКРОЗ

Програмований некроз, відомий як тип III ПСК, пов'язаний з лізісом клітин у відповідь на гостру нефізіологічну травму. Морфологічними ознаками некрозу є набухання клітин та їхніх мембранних органел, неспецифічна компактизація хроматину, вакуолізація цитоплазми, порушення цілісності плазматичної мембрани з наступним виходом внутрішньоклітинного вмісту в позаклітинний простір. У результаті цього виникає місцеве запалення і пошкодження оточуючих тканин.

Ця форма загибелі клітин відрізняється від апоптозу низкою легко ідентифікованих ключових біохімічних, молекулярних і морфологічних ознак, хоча ці два процеси й не є обов'язково взаємовиключними.

Багато стресорів, які викликають апоптоз за низьких і помірних доз, можуть викликати некроз за відносно високих доз. Одним із факторів, що визначають конкретну форму ПСК, є клітинна енергія (рівні АТФ). Для ініціації ступінчастої активації каспаз в апоптозі необхідний достатній рівень АТФ. Водночас, швидке зниження рівня клітинної енергії (АТФ), яке може бути викликано токсинами або фізичними ушкодженнями, зазвичай веде до некротичної загибелі клітин і вважається її основною причиною.

Поняття "програмований некроз" сформувалось на основі даних про те, що існує сигнальний шлях ініціації некрозу у відповідь на зв'язування рецепторами таких молекул, як TNF (фактор некрозу пухлин), на фоні пригнічення апоптозу. Індукувати програму некрозу в клітині можна, якщо активувати програму апоптозу зв'язуванням таких лігандів, як Fas, TRAIL (обидва належать до родини факторів некрозу пухлин) або викликаючи гіперекспресію проапоптичного білка Вах, і водночас, або пригнічуючи активність каспаз, або викликаючи гіперекспресію

антиапоптичних білків. Програмований некроз, у свою чергу, може бути пригнічений, якщо на клітини діяти антиоксидантами або блокувати активність протеїнкінази RIP. Цікаво, що остання є однією із мішеней дії каспаз. Це означає, що ініціація і здійснення апоптозу активно пригнічує розвиток некрозу в клітинах.

Установлено, що некроз може здійснюватися не лише як результат апоптозу в ситуації енергодефіциту, але і як самостійна програма клітинної смерті, ключову роль у якій відіграють ядерний білок-фермент PARP (бере участь у репарації ДНК і ремодельованні хроматину), індуктори мітохондріального окиснювального стресу, мітохондріальна серинова протеаза *omi*, деякі каспази та ряд інших ферментів.

Існують дані, що високий рівень активності PARP, наприклад, при ушкодженнях ДНК, веде до різкого зниження рівня NAD як в ядрі, так і в цитоплазмі. Результатом цього є пригнічення гліколізу. Якщо клітини забезпечуються АТФ значною мірою за рахунок гліколізу, його пригнічення може приводити до різкого зниження вмісту АТФ, що закінчується некрозом клітини. При апоптозі PARP є мішенню дії широкого набору ефекторних каспаз. Отже, механізм апоптозу спрямований, у тому числі, і на пригнічення ферментів, активність яких може приводити до запуску некрозу.

Фізіологічне значення такої протидії між апоптозом і програмованим некрозом проявляється, скажімо, у тому, що програмований некроз може бути не лише варіантом загибелі клітин в умовах пригнічення апоптозу, а й виконувати функцію посилення імунних реакцій у відповідь на інфікування мікроорганізмами. При ушкодженні ДНК хімічними агентами або іонізуючим опромінення в нормальних (не пухлинних) клітинах вмикаються контрольні точки перевірки, які "забороняють" вступ у мітоз клітинам із порушеним геномом. У випадку порушення механізмів репарації, клітини гинуть шляхом апоптозу. Однак, якщо в таких клітинах порушені і механізми апоптозу, що є досить частим у трансформованих клітинах, вони гинуть шляхом програмованого некрозу. Фізіологічне значення некрозу при цьому полягає в тому, що, поперше, програмована загибель клітин шляхом некрозу за від-

сутності апоптозу все ж знижує ризик передачі мутацій дочірнім клітинам, а по-друге, розпад клітин при некрозі може сприяти активації імунної відповіді організму.

У табл. 13.2 наведені порівняльні дані функціонально-морфологічних характеристик процесів апоптозу і некрозу.

ОНКОГЕНЕЗ

Онкогенез, або канцерогенез – багатоступеневий процес накопичення мутацій та інших генетичних змін, що приводять до порушень регуляції клітинного циклу, апоптозу, диференціювання, морфогенетичних реакцій клітини, контактів з іншими клітинами й оточенням, протипухлинного імунітету.

Цей процес спричинює утворення маси нерегульованих клітин, які не піддаються сигналам, що керують нормальним ростом і поведінкою клітин.

Така маса може існувати безсимптомно протягом тривалого часу. Тим не менш, в кінцевому рахунку, вона буде збільшуватися, порушуючи фізіологічні функції, що викликає низку симптомів, залежно від місця розташування і розміру пухлинної маси, і поширення ракових клітин в організмі.

Серед приблизно 25 000 генів геному людини декілька сотень генів є частиною молекулярно-генетичної системи, що регулює поділ клітин, диференціювання і тривалість життя (і при цьому вони піддаються змінам, що впливають на їхнє функціонування).

Модифікації, які приводять до пухлинного переродження клітин, включають *генетичні зміни*, котрі модифікують послідовність ДНК. Інший шлях зміни клітинної програми – модифікація конформації хроматину, структури, яка забезпечує упаковку ДНК і регулює процеси її зчитування, копіювання та репарації, не впливаючи прямим чином на нуклеотидну послідовність. Такі зміни називаються "*епігенетичними*".

Зміни в одному й тому самому гені часто асоційовані з різними формами пухлин. Такі гени можуть бути класифіковані на три групи.

Таблиця 13.2

Порівняльна характеристика некрозу і апоптозу

Ознаки	Апоптоз	Некроз
Індукція	Природна. Активується фізіологічними або патологічними стимулами. Самогенеровані сигнали в клітині. Узагалі, є природною частиною життя	Різна залежно від ушкоджувального фактора. Фактори зазвичай зовнішні: бактеріальні та грибові інфекції, токсини, травма тощо
Поширення	Одиночні клітини	Групи клітин
Результат	Зазвичай позитивний, корисний	Завжди веде до втрати частини клітин
Процеси		
Цілісність клітинної мембрани	Збережена. Формування мембранних пухирів	Порушення мембрани
Біохімічні зміни	Вивільнення різних факторів (цитохром <i>c</i> , AIF) мітохондріями в цитоплазму. Активізація каскаду каспаз. Зміни в мембранній асиметрії (транслокація фосфатидилсерину із цитоплазматичного на зовнішній бік мембрани)	Виснаження пулу АТФ, викликане гіпоксією і респіраторними отрутами, метаболічний колапс. Порушення або припинення іонного обміну
ДНК	Енергозалежна впорядкована фрагментація ДНК ендогенними ендонуклеазами	Невпорядкований лізис ДНК
Органели	Лізосоми інтактні. Мембрани мітохондрій стають проникними через утворення пор за участю білків родини Bcl-2	Дезінтеграція органел. З лізосом вивільнюються ферменти
Залежність від енергії	Енергозалежний, активний процес. Припиняється при 4 °С	Енергонезалежний, пасивний процес. Продовжується при 4 °С
Морфологія клітини	Зморщування клітини, колапс ядра (ядерна фрагментація ядра і хромосомної ДНК, конденсація хроматину) Формування апоптозних тілець	Набухання клітин, ДНК дифузно локалізується в некротизованій клітині; розрив мембрани і вихід вмісту (лізис). Поглинання (фагоцитоз) нейтрофілами і макрофагами
Симптоми, (запальна відповідь)	Зазвичай відсутні	Зазвичай запалення, зменшення току крові в ураженій ділянці, тканина смерть (гангрена).

Перша група – *протоонкогени*, відповідають за синтез білкових продуктів, які зазвичай збільшують поділ клітин або пригнічують нормальну загибель клітин. Мutowані форми цих генів, які кодують уже змінені білки, що ведуть до неконтрольованого росту і поділу клітин, називаються *онкогенами*.

Друга група – *супресори пухлин*. Вони мають протилежну регуляторну функцію – продукують білки, які зазвичай запобігають поділу клітин або викликають загибель клітин у разі накопичення в ній ушкоджень, що не виправляються системами репарації.

Третя група включає в себе *гени репарації ДНК*, які допомагають запобігти мутаціям, що приводять до раку.

У нормі контрольований ріст клітин підтримується тонким балансом функціонування протоонкогенів, які прискорюють ріст, і генів-супресорів пухлин, які сповільнюють ріст клітин. Мутації, які приводять до перетворення протоонкогенів у онкогени, прискорюють ріст, тоді як ті мутації, котрі впливають на пухлинні супресори, запобігають нормальному пригніченню ростових процесів. У будь-якому випадку, обидва типи таких мутацій ведуть до неконтрольованого клітинного росту.

ОНКОГЕНЕЗ

I СИГНАЛЬНА ТРАНСДУКЦІЯ

У нормальних клітинах протоонкогени кодують білки, які надсилають до ядра сигнал, котрий стимулює поділ клітин. Ці сигнальні білки діють у формі каскадів сигнальної трансдукції, які включають мембранний рецептор для сигнальної молекули, білки-посередники, які несуть сигнал через цитоплазму, і фактори транскрипції в ядрі, які активують гени клітинного поділу. Онкогени, змінені версії протоонкогенів, нерідко кодують сигнальні молекули, які активують сигнальний каскад постійно, що приводить до збільшення продукції факторів, які стимулюють ріст.

Наприклад, *MYC* – протоонкоген, який кодує фактор транскрипції. Мутації в *MYC* перетворюють його на онкоген, асоційований з 70 % різних форм раку. *Ras* – інший протоонкоген, білковий продукт якого зазвичай функціонує як перемикач стану "включено-вимкнено" в сигнальних каскадах ростових факторів. Мутації в *Ras* ведуть до постійно "включеного" стану сигнального шляху, і, відповідно, до неконтрольованого росту клітин. Близько 30 % пухлин, у тому числі легенів, товстої кишки, щитовидної залози, підшлункової залози мають мутацію в *Ras*.

Перехід протоонкогена в онкоген та індукція неконтрольованого росту може відбутися в результаті:

- мутації протоонкогена;
- хромосомних перебудов, унаслідок чого протоонкоген змінює локалізацію в хромосомі й може опинитися, скажімо, у зоні контролю іншого паромотора;
- збільшення кількості копій (ампліфікації) нормального протоонкогена;
- вставки вірусної ДНК в протоонкоген або біля нього.

Більшість онкогенів є результатом домінантних мутацій: тобто достатньо єдиного алеля такого гена для експресії аномального росту. Присутність онкогена в клітинах зародкової лінії (яйцеклітини і сперматозоїди) веде до спадкової схильності до раку. Проте, на практиці єдиного онкогена зазвичай недостатньо для розвитку пухлини.

ПОРУШЕННЯ ГЕНІВ СУПРЕСОРІВ ПУХЛИН

У нормі білки, що продукуються генами-супресорами пухлин, можуть "діяти" на клітинну мембрану, "працювати" в цитоплазмі або в ядрі, пригнічуючи ріст і поділ клітин та запобігаючи формуванню пухлини. Мутації в цих генах, що ведуть до втрати такої функції, є рецесивними. Це означає, що ознака не буде експресована, якщо не мутують обидва алеля нормального гена. Яким чином може відбутися така подвійна мутація?

У деяких випадках перша мутація вже присутня в одній із батьківських статевих клітин. Отже, усі клітини особини успадковують її, але оскільки мутація є рецесивною, ознака не виражена. Пізніше, під впливом мутагенних факторів, мутація може відбутися в другій копії гена в окремії соматичній клітині. У такій клітині мутантними будуть вже обидва алелі і вона перейде до неконтрольованого росту. Прикладом може послугуватися *ретинобластома* – пухлина сітківки, яка розвивається в ранньому дитинстві. Коли один із батьків несе мутацію в одному алелі гена супресора *Rb*, вона передається потомству з імовірністю 50 %. При цьому 90 % нащадків, які отримують один мутантний алель гена *Rb* від батьків, також набувають мутації в другому алелі, як правило, дуже рано в онтогенезі. Потім у них розвивається ретинобластома.

Інші три приклади поширених пухлин, асоційованих з дефектами в генах супресорів пухлин, включають сімейний поліпоз товстої кишки (ген *APC*), спадковий рак молочної залози (ген *BRCA2*) і спадковий рак молочної залози і яєчників (ген *BRCA1*).

Отже, спадковий фактор є важливим фактором виникнення раку. Проте мутації обох алелів можуть виникати в соматичних клітинах, тому рак не завжди успадковується в поколіннях особин. Соматичні мутації, які приводять до втрати функції одного або обох копій гена супресора пухлини, можуть бути викликані факторами навколишнього середовища, а отже, навіть ці сімейні форми раку можуть мати екологічну складову.

ПОРУШЕННЯ СИСТЕМ РЕПАРАЦІЇ ДНК

Третій тип генів, асоційованих з раком, включає гени, залучені у репарацію ДНК і підтримання структури хромосом. При мутаціях у цих генах ушкодження ДНК, що викликаються мутагенними факторами, не виправляються і кількість мутацій в клітині зростає. У результаті може підвищуватися частота канцерогенних змін у клітині.

Дефект у гені репарації ДНК, який має назву *XP* (від назви хвороби *Xeroderma pigmentosum*, пігментна ксеродерма) приводить до надзвичайної чутливості організму до УФ-світла і 1000-кратного зростання частоти різних раків шкіри. Інший

приклад спадкової патології, пов'язаної з втратою здатності до репарації – *синдром Блума*, при якому виникає підвищений ризик раку, захворювання легенів і діабет (мутантний ген, *BLM*, необхідний для підтримання стабільної структури хромосом). Особини з таким синдромом мають високу частоту хромосомних розривів і обмінів, що може привести до активації онкогенів.

ПОРУШЕННЯ РЕГУЛЯЦІЇ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ

Нормальні клітини ростуть і діляться впорядковано (відповідно до клітинного циклу). Мутації ж у протоонкогенах або в генах-супресорах пухлин дозволяють клітинам пухлин рости і ділитися за відсутності нормального контролю за процесами клітинного циклу.

Одним із важливих білків у клітинному циклі є p53, фактор транскрипції, який зв'язується з ДНК, активуючи транскрипцію білка p21. P21 блокує активність циклінозалежних кіназ, необхідних для прогресії клітини через G1-фазу. Цей блок надає клітині час для відновлення ДНК, перш ніж вона перейде до реплікації. Якщо пошкодження ДНК настільки значні, що вона не може бути відновлена, p53 викликає апоптоз клітини. Із мутацією в гені p53 пов'язаний *синдром Лі – Фраумені*, спадкова схильність до декількох форм раку. Інші білки, які зупиняють клітинний цикл шляхом пригнічення циклінозалежної кінази – p16 і RB. Усі вони є супресорами пухлин.

ВІДМІННОСТІ У ПРОЦЕСАХ ПОДІЛУ ТА ЇХНІ РЕГУЛЯЦІЇ В НОРМАЛЬНИХ І ПУХЛИННИХ КЛІТИНАХ

Оскільки онкогенна трансформація клітини відбувається в результаті порушення цілої низки важливих регуляторних генів, така клітина набуває і значну низку особливостей поведінки на відміну від нормальних клітин, які знаходяться під

жорстким контролем багатьох систем. Основними відмінностями поведінки пухлинних і нормальних клітин є наступні.

Нормальні клітини для поділу потребують зовнішніх факторів росту. При пригніченні синтезу цих факторів клітини поділ припиняють. Ракові клітини втрачають *необхідність у позитивних факторах росту*, тому вони діляться і за їхньої відсутності. Отже, вони не ведуть себе як частина тканини, а стали незалежними.

Нормальним клітинам притаманне явище *контактного гальмування*; тобто, вони реагують на контакт з іншими клітинами, припиняючи поділ. Таким чином, клітини можуть ділитися, щоб "заповнити дефект", але припиняють поділ як тільки створюється їхня достатня кількість. Ця властивість втрачається у ракових клітин (вони продовжують рости і після контакту з іншими клітинами), у результаті чого формується велика клітинна маса.

Нормальні клітини, завершивши своє функціонування, вмирають і замінюються новими контролювано і впорядковано. Апоптоз, про що вже йшлося вище, є нормальною, генетично запрограмованою смертю клітин. Нормальні клітини можуть ділитися лише близько 50 разів, перш ніж умирають. Це пов'язано з їхньою обмеженою здатністю до реплікації ДНК, що визначається постійним укороченням теломерних кінців хромосоми. У клітинах, що ростуть, *фермент теломераза* замінює ці втрачені кінці. У дорослих же клітинах активність теломеразі заблокована. Проте в ракових клітинах теломераза активується, що й дозволяє їм уникати апоптозу і ділитися необмежену кількість разів.

Нормальні клітини перестають ділитися і гинуть, коли є пошкодження ДНК, або коли поділ клітин відбувається аномально. Ракові же клітини набувають здатності уникати апоптозу і продовжують ділитися, навіть при великій кількості пошкоджень ДНК або клітинних аномалій. У результаті цього ушкодження ДНК у ракових клітинах накопичуються все більше.

БІОЛОГІЯ ПУХЛИНИ

Отже, ракові клітини поведуться як незалежні від контролюючих механізмів росту системи, утворюючи пухлини.

Пухлини ростуть у кілька етапів, набуваючи різних форм аномального росту (рис. 13.16). Першим кроком до такого росту може стати *гіперплазія* – утворення надлишкової кількості клітин у результаті недостатнього контролю їхнього поділу. Ці клітини є морфологічно нормальними, але в них уже відбулися зміни, у результаті яких вони частково втратили контроль над процесами росту. Цей етап є оборотним, клітини можуть відновити нормальні властивості при припиненні дії чинника.

Другим кроком є *дисплазія*, яка в результаті подальшого росту, супроводжується аномальними змінами в клітинах.

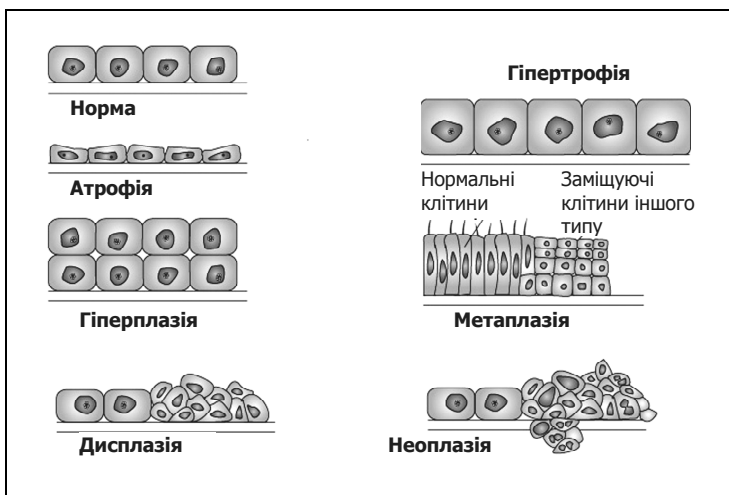


Рис. 13.16. Форми аномального росту клітин. Схема

Третій етап, *анплазія*, вимагає додаткових змін, у результаті яких клітини, набувають ще більш аномальних рис, втрачаючи характерні ознаки відповідних диференційованих клітин, і, крім того, можуть поширюватися по більшій площі тканини. Ці клітини починають втрачати свою первісну функцію. На цій стадії

пухлина ще локалізується у вихідному місці розташування (тому називається *in situ* – "на місці") і *неінвазивна*, тобто не проникає у сусідні тканини. Неінвазивні пухлини вважаються доброякісними, проте вони є *потенційно зляжкісними*.

Останній крок зляжкісного переродження (*малігнізації*) відбувається тоді, коли клітини в пухлині *метастазують*, що означає, що вони можуть проникати в навколишні тканини, у тому числі кровоносне русло, і поширюватися у інші ділянки. Це найсерйозніший тип пухлини, але не всі пухлини прогресують до цієї точки.

Морфологічний тип сформованої пухлини залежить від типу клітин, в яких відбулися вихідні трансформації.

Виділяють п'ять основних типів пухлин:

- **карцинома** – походить від змінених епітеліальних клітин, як тих, що вкривають поверхню тіла, так і епітеліїв внутрішніх органів. Більшість видів раку є саме карциномами;
- **саркоми** є результатом онкогенних змін у тканинах мезенхімального походження – м'язовій, кістковій, жировій або інших різновидах сполучної тканини;
- **лейкемія** виникає в результаті зляжкісних змін лейкоцитів;
- **лімфома** – рак клітин лімфатичної системи, які походять із кісткового мозку;
- **мієлома** – рак спеціалізованих лейкоцитів, які виробляють антитіла.

ПУХЛИННИЙ АНГІОГЕНЕЗ

Хоча пухлинні клітини не залежать від механізмів контролю, які регулюють нормальні клітини, вони все одно вимагають поживних речовин і кисню для свого росту. У пухлині, яка безперервно збільшується, клітини в центрі вже не можуть отримувати поживні речовини з нормальних кровоносних судин. Щоб забезпечити життєдіяльність всіх клітин у пухлині, вона повинна формувати нові кровоносні судини для постачання поживних речовин і кисню клітинам, що знаходяться всередині неї.

У результаті процесу, що має назву **ангіогенез**, пухлинні клітини виробляють фактори росту, які викликають утворення і ріст нових капілярних кровоносних судин. Клітини кровоносних судин (ендотеліальні), які діляться для утворення нових капілярів в пухлині, є неактивними в нормальній тканині, вони активуються лише при дії пухлинних факторів росту. Без додаткового кровопостачання в процесі ангіогенезу, пухлини можуть рости не більше, ніж на 0,5 мм.

Без кровопостачання пухлинні клітини також не можуть інвазувати або метастазувати до інших тканин. Не всі клітини в пухлині є ангіогенними. Проте і ангіогенні, і не ангіогенні клітини можуть проникати в капіляри через судинну стінку (близько одного мільйона клітин на день) і поширюватися в інші ділянки.

Однак неангіогенні клітини, потрапляючи в інші ділянки, дають початок дрібним "сплячим" пухлинам. На відміну від цього, ангіогенні клітини швидко "утверджуються" на нових ділянках, продовжуючи ріст і формуючи нові кровоносні судини, що призводить до швидкого росту пухлини.

Потужним стимулятором ангіогенезу є антиапоптотичний онкоген *BCL2*, продукція якого значно зростає в пухлинах. Узагалі, онкогени в пухлинних клітинах можуть викликати підвищену експресію інших генів, що продукують ангіогенні фактори, яких на сьогоднішній день відомо принаймні п'ятнадцять.

ВІРУСИ І РАК

Серед багатьох вірусів, які заражають людей і тварин, лише деякі сприяють раку. Вони включають в себе як ДНК-вмісні віруси, так і ретровіруси, РНК-типу. До вірусів, пов'язаних з раком, належать вірус папіломи людини (генітальні карциноми), гепатиту (карцинома печінки), вірус Епштейна – Барр (лімфома Беркітта й рак носоглотки), вірус Т-клітин-

ного лейкозу людини (Т-клітинна лімфома), і, ймовірно, вірус герпесу, який називається KSHV (саркома Капоші й деякі В-клітинні лімфоми).

Здатність ретровірусів індукувати онкотрансформацію пов'язана з наявністю онкогенів у цих вірусах. Ці онкогени дуже подібні до протоонкогенів у тварин. Ретровіруси придбали їх з інфікованих клітин тварин. Прикладом цього є нормальний клітинний протоонкоген *c-SIS*, який продукує фактор росту клітин. Вірусна форма цього гена є онкогеном *v-SIS*. Клітини, інфіковані вірусом, який має *v-SIS* продукують надлишок фактору росту, що приводить до високого рівня клітинного росту і можливого пухлинного переродження клітин.

Віруси можуть також сприяти раку шляхом інсерції (вставка) їхньої ДНК у хромосому клітини-господаря. Розміщення вірусної ДНК безпосередньо в протоонкогені може перевести його в онкоген і запустити ріст пухлини.

Розміщення вірусної ДНК у хромосомі поблизу гена, який регулює ріст і поділ клітин може збільшити транскрипцію цього гена, що також приведе до пухлинного росту. Використовуючи інші механізми, вірус папіломи людини сприяє продукції білків, які зв'язуються з двома супресорами пухлин – білками p53 та Rb, перетворюючи ці клітини на пухлинні. Отже, хоча ці віруси сприяють раку, вони самі по собі його не викликають. Розвиток раку вимагає здійснення кількох подій.

Запитання для самоперевірки

1. Які періоди можна виділити в клітинному циклі?
2. Які механізми регуляції клітинного циклу ви знаєте?
3. Що таке G0-період? Для яких клітин він характерний?
4. Охарактеризуйте пресинтетичний G1-період. Які процеси відбуваються в цей період у клітині?
5. Чим визначається здатність клітини переходити до G0 або до G1 фази в клітинному циклі?

6. Охарактеризуйте синтетичний S-період. Які процеси відбуваються в цей період у клітині?
7. Що таке постсинтетичний G2-період. Назвіть, які процеси проходять у цей період у клітині.
8. Як змінюється кількість ДНК протягом клітинного циклу?
9. Що таке контрольні точки перевірки в клітинному циклі?
10. Що таке точка рестрикції?
11. Які ще контрольні точки наявні в клітинному циклі?
12. Які фактори регулюють клітинний цикл?
13. Що означає термін "циклін"?
14. До чого приводить збільшення вмісту циклінів під час клітинного циклу?
15. Чи змінюється під час клітинного циклу рівень циклінозалежних кіназ?
16. Яку роль відіграє білок p53 під час мітотичного циклу?
17. Який білок регулює вступ клітини в мітоз?
18. Що являє собою фактор дозрівання?
19. Назвіть фази, із яких складається процес мітотичного поділу клітини? Як на світлооптичному рівні можна відрізнити клітини, що перебувають на різних стадіях мітозу?
20. Що таке профаза? Які процеси відбуваються в цей період у клітині?
21. Дайте визначення метафази. Які процеси проходять у цей період у клітині?
22. Що забезпечує розташування хромосом у метафазі у вигляді метафазної пластинки?
23. Дайте визначення анафази. Які процеси відбуваються в цей період у клітині?
24. Як переміщуються хромосоми під час мітозу? Які механізми забезпечують ці рухи?
25. Що таке кінетохор? Яка його функція?
26. Дайте визначення телофази. Назвіть процеси, які відбуваються в цей період у клітині.
27. Що таке цитокінез? Як саме він відбувається у клітинах рослин?
28. Порівняйте процес цитокінезу у тваринних і рослинних клітинах.
29. Чим відрізняється мітоз від амітозу?
30. Чим відрізняється мітоз тваринної та рослинної клітин?
31. Як відрізняється будова й динаміка цитоскелета в клітинах в інтерфазі й під час мітозу?

32. Які зміни протягом клітинного циклу відбуваються із цитоскелетом?
33. Яких змін протягом клітинного циклу зазнає ядро і хроматин?
34. Яких змін протягом клітинного циклу зазнають одномембранні органели клітин?
35. У клітину ввели речовину, що блокує роботу ферментів ДНК-полімерази. Які процеси в клітині та в які періоди клітинного циклу постраждають? Відповідь обґрунтуйте.
36. Які етапи клітинного циклу будуть порушені, якщо вводити в клітину колхіцин? Відповідь обґрунтуйте.
37. У результаті порушення нормального перебігу клітинного циклу утворилась одна поліплоїдна клітина. Які етапи клітинного циклу пройшли нормально? На якому етапі нормальний перебіг подій було порушено? Укажіть можливі причини цього.
38. Через порушення нормального перебігу клітинного циклу утворилась одна двоядерна клітина. Які етапи клітинного циклу пройшли нормально? На якому етапі нормальний перебіг подій було порушено? Укажіть можливі причини цього.
39. Які речовини можуть зупинити мітози?
40. Чи можливе відновлення мікротрубочок веретена поділу після дії на клітину отруйних речовин?
41. Що являють собою багатополюсні мітози?
42. Які клітини називають анеуплоїдними?
43. Які морфологічні ознаки пікнозу, каріорексису й каріолізу?
44. Що відбувається із клітиною в разі неповної репарації?
45. Що називається трансформацією клітин?
46. Які морфологічні зміни спостерігаються в пухлинних клітинах?
47. Які речовини називаються цитостатиками й навіщо вони застосовуються?
48. Що таке апоптоз?
49. Що таке некроз?
50. Які групи порушень у клітині ведуть до її онкогенного переродження?
51. Дайте визначення і назвіть функції протоонкогенів, онкогенів, генів супресорів пухлин. Наведіть приклади.
52. Як змінюються особливості росту клітин у ході їхнього онкогенного переродження?
53. Які біологічні особливості відрізняють пухлинні клітини від нормальних?

Рекомендована література

Becker's world of the cell / Jeff Hardin, Gregory Bertoni, Lewis J. Kleinsmith et al. – San Francisco, Calif. : Pearson/Benjamin Cummings, 2012.

Cheeseman I. M. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface / I. M. Cheesema, A. Desai // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2008. – Vol. 9. – P. 33–46.

Molecular Biology of the Cell / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis et al. – N. Y. : Garland Science, 2002.

Molecular Cell Biology / H. Lodish, A. Berk, C. A. Kaiser et al. – N. Y. : W. H. Freeman & Company. – 2008. – 975 p.

Otegui M. Midbodies and phragmoplasts: analogous structures involved in cytokinesis / M. Otegui, K. J. Verbrugghe, A. R. Skop // Trends Cell Biol. – 2005. – Vol. 15. – P. 404–413.

Розділ 14

ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ І РЕАКТИВНІ ЗМІНИ КЛІТИН

Диференціація – це сукупність процесів, у результаті яких між клітинами спільного походження виникають стабільні морфофункціональні відмінності. У результаті цього процесу виникають певні стійкі *типи* клітин. Відомо, що кожний багатоклітинний організм містить близько 210 типів диференційованих клітин. Принципи клітинної диференціації базуються на даних ембріології, молекулярної біології і генетики.

Сьогодні загальноприйнятою є думка Т. Моргана, який, спираючись на хромосомну теорію спадковості, припустив, що диференціація клітин у процесі онтогенезу є результатом послідовних взаємних впливів цитоплазми і продуктів активності генів, які весь час змінюються, тобто висунув ідею про *диференційну експресію генів* як основний механізм цитодиференціації.

Вважається, що індивідуальний розвиток від зиготи до багатоклітинного організму є результатом послідовного вибіркового "вмикання" різних генів у різних клітинах. Початкова активація специфічних наборів генів обумовлена цитоплазматичними факторами, які нерівномірно розподілені у яйці. Взаємодія геномів різних бластомерів із цитоплазматичними факторами різної природи лежить в основі активації чітко визначених, певних генів. Робота останніх, у свою чергу, видозмінює цитоплазму, що веде до "вмикання" нового набору генів і формування нових властивостей цитоплазми. Такий каскад "вмикань" усе нових і нових генів призводить до формування складно диференційованого організму, до появи клітин, які відрізняються специфічними для них структурами і особливими функціями. Диференційовані в різних напрямках клі-

тини відрізняються одна від іншої хоча б за одним специфічним білком, тобто білком, що має специфічну (відмінну від інших) послідовність амінокислот.

Зазвичай різноманітні диференційовані клітини мають багато однакових білків – це білки, що забезпечують нормальну життєдіяльність клітини. Серед них структурні білки хромосом, РНК-полімерази, ферменти репарації ДНК, рибосомні білки, ферменти, що беруть участь в основних реакціях метаболізму, транспортні білки, білки транскрипції, трансляції, а також численні білки, що формують цитоскелет. Це білки неспецифічні, або "*робочі*". Клітини відрізняються між собою лише за кількістю таких білків. Скажімо, клітини епітелію містять більше білків, "необхідних" для поділу, що свідчить про високу проліферативну здатність цих клітин. У нейронах, навпаки, "білків поділу" кількість невелика, проте збільшена кількість білків, необхідних для передачі нервового імпульсу, що й відрізняє ці клітини від інших, зумовлюючи їхнє специфічне функціонування.

Клітини різних тканин відрізняються не лише за кількістю білків, але й за *якістю* "робочих" білків. Наприклад, ізоферменти, які каталізують однакову реакцію, відрізняються в різних клітинах за своїми фізико-хімічними характеристиками. Це зумовлено тим фактом, що контролюються вони різними генами.

Клітини крім "робочих", мають також високоспецифічні білки, які інколи називають "*білками розкоші*", тому що вони необхідні не для власне існування самих клітин, а пов'язані з виконанням ними певної спеціалізованої функції. Так, специфічний білок гемоглобін наявний лише в еритроцитах.

Синтез таких специфічних білків змінює морфологію клітини внаслідок змін структурної організації її цитоплазматичної мембрани, цитоскелета, внутрішньоклітинних органел і включень, тобто встановлює певну спеціалізацію клітини. А отже, синтез специфічних білків лежить в основі диференціації клітин, унаслідок якої вони стають відмінними одна від одної. У деяких клітинах, скажімо, у кардіоміоцитах, диференціація зумовлює зміни клітинного циклу, при цьому зростає тривалість періоду G1, а з переходом у період G0 клітини взагалі перестають ділитись. В інших диференційованих клітинах сповільнюються синтетичні процеси, як це відбувається, наприклад, в еритроцитах.

Основна властивість плазматичних мембран – наявність специфічних мембранних рецепторів. Вони являють собою молекули глікопротеїнів, вбудовані в ліпідний "матрикс" мембран. Зовнішньоклітинні ділянки таких рецепторів мають специфічні послідовності, які змінюють свою конформацію при зв'язуванні з гідрофільними сигнальними молекулами: гормонами, нейромедіаторами, вітамінами, вірусами, антигенами й іншими факторами, що діють на клітину ззовні. Ці конформаційні зміни "передаються" молекулою рецептора у субмембранні шари клітини, де "запускаються" внутрішньоклітинні каскади клітинної відповіді за участю вторинних посередників – циклічних нуклеотидів, ланок інозитолфосфатної системи тощо (про що детально йшлося в розділі "Інформаційні міжклітинні взаємодії"). Так, у ряді випадків першою ланкою, на яку "впливає" збуджений рецептор, є фермент аденілатциклаза, що синтезує цАМФ.

Крім специфічних мембранних рецепторів, у плазматичну мембрану вбудовані іонні канали, що забезпечують транспорт іонів за градієнтом їхньої концентрації, та іонні насоси, які транспортують їх проти градієнтів (дет. див. розд. "Структура й функції біологічних мембран").

Мембранні рецептори, іонні канали і насоси здатні латерально дифундувати у плазмолемі, концентруючись у її певних ділянках, а також "залишати" мембрану, замінюючись новими. Тобто надмолекулярна організація плазматичної мембрани, як і самої клітини в цілому, має динамічний характер.

Диференційовані клітини за формою відрізняються одна від одної, і в підтримці їхньої полярності важливу роль відіграють мікротрубочки. Вони сприяють певному розміщенню у цитозолі клітинних органел і забезпечують направлений транспорт цілого ряду білків. Мікротрубочки, будучи високолабільними утвореннями, здатні "руйнуватись" і знову збиратись протягом декількох хвилин (дет. див. розд. 7).

У підтриманні характерної форми клітини, а також у розміщенні внутрішньоклітинних органел і мембранних пухирців беруть участь і мікрофіламенти, які також здатні швидко збиратись, розбиратись і переміщуватись по клітині. Деякі складні процеси диференціації клітин (скажімо, у всмоктувальних

клітинах епітелію нирок і кишечника або в рецепторних клітинах) пов'язані зі збиранням потужних пучків актинових мікрофіламентів, що утворюють структурну основу мікрроворсинок, розміри і структура яких точно регулюється. Так, на поверхні волоскових клітин кортієвого органа мікрроворсинки різної довжини в межах кожної клітини розташовані в чіткій послідовності: у ході диференціації чітко регулюється їхнє розміщення, число й довжина.

Як уже було викладено вище, біохімічною основою диференціації клітин є синтез специфічних білків та інших речовин.

Згідно з основним положенням молекулярної біології, первинна структура синтезованих білків визначається послідовністю нуклеотидів у ДНК структурних генів. Інформація про цю послідовність переписується у клітинному ядрі на молекули мРНК (*транскрипція*), із яких уже в цитоплазмі перекладається на "амінокислотну мову" з формуванням поліпептидного ланцюга певної первинної структури (*трансляція*). Останній, "отримавши самостійність", набуває складної просторової конформації (детально питання транскрипції розглянуто в розд. 8, а біосинтезу білка – у розд. 9).

Яким же чином між клітинами, які походять з однієї зиготи, можуть виникати відмінності за набором специфічних білків?

Біосинтез певних білків, а отже, і диференціація клітин, регулюється на рівнях: 1) транскрипції: унаслідок експресії одних генів і пригнічення інших у клітинах синтезуються різні білки у різних кількостях; 2) трансляції: за допомогою посттранскрипційної модифікації мРНК, регуляції трансляції та посттрансляційної модифікації білків.

Першими науковими гіпотезами, що намагались дати пояснення механізмам клітинної диференціації, можна вважати гіпотези соматичних мутацій, представлені в кінці XIX ст. німецькими вченими К. Негелі, В. Ру, а потім А. Вейсманом. Згідно з А. Вейсманом, диференціація соматичних тканин відбувається внаслідок *нерівноспадкових* поділів клітин, у ході яких у різні клітини потрапляють різні генетичні детермінанти. Кінцева диференціація залежить від того, який ген куди потрапить. Лише в лінії статевих клітин зберігаються всі спадкові фактори, що й забезпечують генетичну спадковість у ряду поколінь (рис. 14.1).

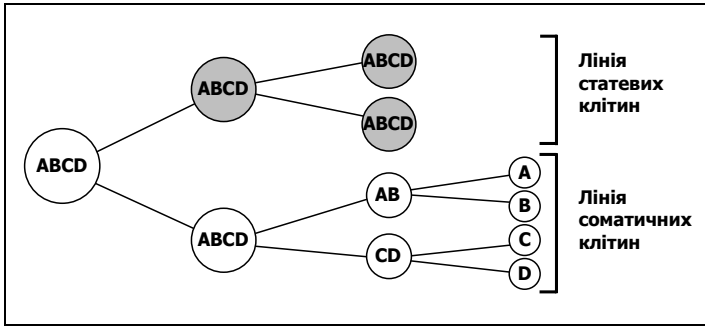


Рис. 14.1. Схема, яка ілюструє ідею А. Вейсмана про нерівноспадковий поділ як основу процесів диференціації: у лінії статевих клітин зберігаються всі спадкові фактори, у лініях соматичних клітин відбувається їхнє диференційне розподілення

Зокрема, А. Вейсман вважав, що в ході дроблення хроматин розподіляється між бластомерами нерівномірно. Формулюючи свою гіпотезу, він спирався на дані, отримані при дослідженні послідовних поділів дроблення в аскариди. Бластомери аскариди, які дають початок соматичним тканинам, справді втрачають частину хромосомного матеріалу (*димінуція*), на відміну від клітин статевих зачатків (клітини перших містять усього 8 хромосом, других – 40). При цьому, при димінуції "відкидається" лише та частина хроматину, яка необхідна для розвитку гамет. Слід відзначити, що такі відмінності спостерігалися лише між статевими і соматичними клітинами, відмінностей у хромосомних наборах між різними соматичними клітинами знайдено не було. У ряді поділів, які ведуть до утворення статевої клітини, димінуції не відбувається, що відповідає необхідності зберегти у статевій клітині весь спадковий матеріал. Зазначимо, що у вищих еукаріотів димінуції хроматину не виявлено.

Першими спробами експериментально вирішити питання про нерівноспадкові поділи в період раннього розвитку можна вважати роботи Г. Шпемана (1928). Дослідник накладав лігатуру на запліднене яйце тритона до початку його дроблення так, щоб петля збігалася із сагітальною площиною.

Затягуючи петлю перед першим поділом дроблення, він отримав яйця, розділені на дві рівноцінні частини, відмінність між якими полягала лише в тому, що одна половина містила ядро, а друга була без'ядерною. Послаблюючи лігатуру в період дроблення, Г. Шпеман домігся того, що в без'ядерну половину проникали ядра першого, другого або третього поділу дроблення. Після попадання ядра в без'ядерну половину яйця лігатуру сильно затягували, і половинки зародка ізолювали одну від одної. Проведені досліди показали, що ядра після четвертого поділу дроблення зберігають усі потенції, необхідні для повноцінного розвитку організму, оскільки із кожної половини яйця утворились нормальні, бездефектні зародки, що не могло б відбутись, якби в ході дроблення ядра втрачали хоча б частину спадкового матеріалу.

Наступним кроком стали експерименти Р. Бріггса й Т. Кінга в 1950-ті рр., які розробили методику *енуклеації* (видалення ядра) зиготи і трансплантації за допомогою мікропіпетки ядер, узятих із бластомерів бластули американської жаби *Rana pipiens*. Після трансплантації ядер в еноклейовані яйця спостерігався нормальний розвиток, у результаті якого формувались пуголовки.

Ще більш вражаючі результати були отримані видатним ембріологом Дж. Гердоном в аналогічних дослідах на еволюційно більш примітивній африканській шпорцевій жабі *Xenopus laevis*. При введенні в еноклейоване яйце ядра, виділеного із клітин кишкового епітелію пуголовка, Дж. Гердон спостерігав розвиток личинок, а в невеликому відсотку випадків отримав розвиток дорослої жаби, що свідчить про генетичну ідентичність ядер диференційованих клітин і зиготи. Головним результатом досліду Дж. Гердона стало підтвердження того факту, що спадковий матеріал соматичних клітин здатний залишатись повноцінним не лише в кількісному, але й у функціональному відношенні.

Нова ідея, на яку наштовхували проведені експерименти, полягала у вибіркового "прояві" генів у фенотипі (ідея *диференційної експресії генів*).

Досліди Дж. Гердона дозволили виявити важливі закономірності. По-перше, вони показали вирішальне значення взаємодії цитоплазми і ядра в життєдіяльності клітин і розвитку організмів у цілому.

По-друге, було показано, що чим пізніша стадія розвитку зародка донора, із клітин якого брали ядро для пересадки, тим в меншому відсотку випадків розвиток був повністю завершеним. У більшості випадків розвиток зупинявся на ранніх стадіях. Аналіз таких "дефектних" зародків виявив численні хромосомні аномалії, а також нездатність ядер диференційованих клітин до відновлення синхронної реплікації ДНК.

Найкращий результат спостерігався при використанні прийому серійного клонування клітинних ядер: ядра, вилучені із диференційованих клітин, трансплантували в енукейовані яйцеклітини, дорощували їх до бластул і вторинно трансплантували ядра клітин цих бластул в інші енукейовані яйцеклітини. Такі перенесення робили багаторазово. Вони сприяли деметилуванню ДНК пересаджених ядер і, тим самим, підвищенню активності генів (метилування ДНК змінює "доступність" гена для транскрипційних факторів і завдяки цьому регулює його активність). Кожна бластула, отримана в такий спосіб, являє собою, по суті, клон клітин, які мають ідентичні геноми. Однак, коли в енукейовані яйця трансплантували ядра, взяті із різних бластомерів однієї і тієї ж бластули, виявилось, що розвиток починався лише у приблизно 30 % яєць. Отримані результати змусили думати, що ядра, навіть якщо належать одному клону клітин, тим не менше відрізняються за своєю здатністю контролювати розвиток.

Численні досліді на жабах показали, що здатність трансплантованих ядер викликати нормальний розвиток дійсно дещо знижується протягом розвитку, найпевніше через метилування ДНК. Однак головний висновок полягає в тому, що ядра диференційованих клітин зберігають усі ті потенції, які є у ядра в зиготі та здатні забезпечувати розвиток і диференціацію зовсім різних типів ембріональних тканин (рис. 14.2).

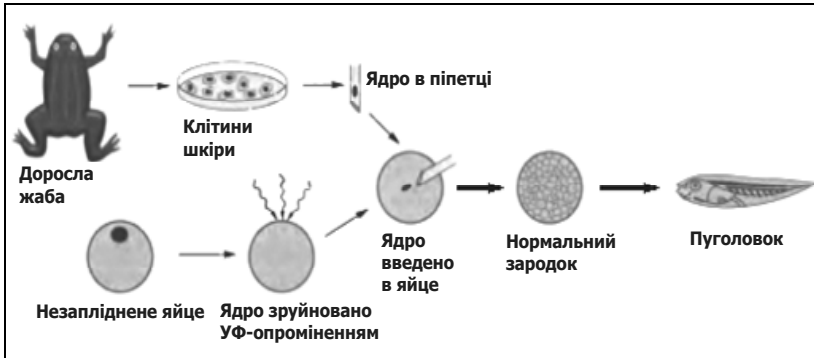


Рис. 14.2. Ядро клітини дорослої жаби, трансплантоване в без'ядерну яйцеклітину, може дати початок пуголовку
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2013, зі змінами)

Аналогічний висновок випливає і з дослідів, проведених із різними рослинами: шматочки дифенційованої рослинної тканини культивували на штучному середовищі, після чого розділяли на окремі клітини. У багатьох випадках такі ізольовані клітини демонстрували здатність регенерувати в цілу дорослу рослину (рис. 14.3).

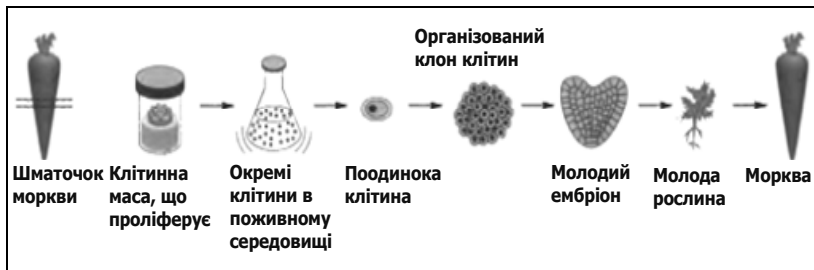


Рис. 14.3. У багатьох видів рослин диференційовані клітини зберігають здатність до дедиференціації, тому окрема клітина може утворювати клон клітин, із яких розвивається доросла рослина
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Дж. та ін., 2013, зі змінами)

Подібні результати було отримано і в дослідях на ссавцях (у тому числі на великій рогатій худобі, вівцях, свинях, козах, собаках і мишах): ядра соматичних клітин вводили в без'ядерні яйцеклітини, пересаджували сурогатним матерям, і деякі із цих яйцеклітин розвивались у здорових тварин (рис. 14.4).

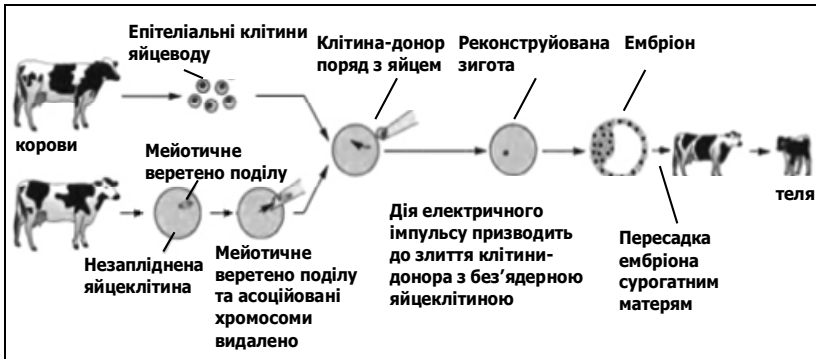


Рис. 14.4. Ядро диференційованої клітини від дорослої корови, пересаджене в без'ядерну яйцеклітину іншої корови, може дати початок розвитку теляти (за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2013, зі змінами)

Отримані результати є сильним аргументом на користь того, що ембріональна диференціація більшості клітин не базується на соматичних мутаціях (необоротних змінах ДНК).

Однак найбільш прямі докази *еквівалентності геномів* більшості соматичних клітин були отримані молекулярними методами, а саме методом гібридизації нуклеїнових кислот. За допомогою цього методу було продемонстровано, що ДНК всіх типів соматичних клітин певного організму не відрізняються за послідовністю нуклеотидів. Пізніше було встановлено, що в хромосомах диференційованих клітин, скажімо, у гігантських хромосомах слинних залоз двокрилих комах, наявні *ембріональні гени* (гени, що відповідають за синтез білків жовтка яйцеклітини), які в даних хромосомах зовсім неактивні.

Але є і деякі винятки із загального правила еквівалентності геномів соматичних клітин. Одне з них – явище ампліфікації генів. Ампліфікуватися можуть не лише рибосомні гени, як це відбува-

ється при овогенезі багатьох видів тварин, але й нерибосомні, наприклад гени, які кодуєть структуру білків хоріону яйця у дрозофіли. Інші випадки ампліфікації генів за нормального розвитку невідомі, однак ампліфікація описана при злоякісному рості.

Інший яскравий приклад клітинної диференціації на основі соматичних мутацій – диференціація В-лімфоцитів, які продукують антитіла. В організмах вищих тварин і людини існує більше мільйона клонів цих клітин, які розрізняються за специфічністю продукованих ними антитіл. В ембріональному розвитку при диференціації клонів В-лімфоцитів у тих ділянках їхнього геному, які кодуєть білки антитіл, відбуваються переміщення (транслокації) певних груп генів.

Диференціація шляхом соматичних мутацій спостерігається у фотосинтезуючих бактерій *Anabaena*, які утворюють багатоклітинні колонії. Якщо ця бактерія існує в умовах надлишку азотистих сполук, в усіх клітинах відбувається фотосинтез, і всі вони схожі одна на одну. Але коли азоту не вистачає, з'являються спеціалізовані клітини – гетероцисти, які не мають хлорофілу, але синтезують фермент нітрогеназу, за допомогою якого відбувається перетворення атмосферного азоту в доступну для клітини форму. При формуванні гетероцист відбувається перебудова ДНК, у результаті якої виникає послідовність нуклеотидів, що кодує одну із субодиниць ферменту.

Можна припустити, що диференціація клітин шляхом соматичних мутацій – еволюційно древній спосіб, який у подальшому ході еволюції був майже повністю витіснений іншими способами, які забезпечують більшу пластичність клітинного складу організмів.

ДИФЕРЕНЦІЙНА АКТИВНІСТЬ ГЕНІВ

Аналіз різноманітних морфогенетичних процесів, дослідження біохімічної, структурної та функціональної спеціалізації клітин, тканин і органів дозволяє стверджувати, що в основі клітинної диференціації лежить диференційна, тобто різна у різних клітинах, експресія генів.

Теорія диференційної активності генів виходить із припущення, що поділи клітин, як правило, рівноспадкові, і гени, що не експресуються, зберігаються. Диференційна активність генів досягається різними способами їхньої активації та репресії, як прямими – за допомогою транскрипційних факторів, так і опосередкованими – шляхом зміни структури ДНК, її модифікації.

Кожна клітина одного організму містить абсолютно однаковий набір генів (рис. 14.5). Велика різноманітність клітин обумовлена активним функціонуванням у різних клітинах неоднакових частин геному. Більша частина геному знаходиться в клітинах організму в неактивному, *репресованому*, стані, і лише 7–10 % генів *депресовані*, тобто активно транскрибуються.

І репресія, і активація генів відбуваються під час розвитку, при цьому часто обидва процеси продовжуються протягом усього життя диференційованої клітини. Більш того, у процесі розвитку клітини багато генів необоротно вимикаються – втрачають здатність до транскрипції й ніколи не експресуються в клітинах даного типу. Транскрипція інших генів підтримується на постійному рівні протягом всього життя клітини – це *конститутивна експресія*. Основна частина генів, які активно функціонують у більшості клітин організму – це гени, які забезпечують синтез білків загального призначення. Такі гени називаються *конститутивними*.

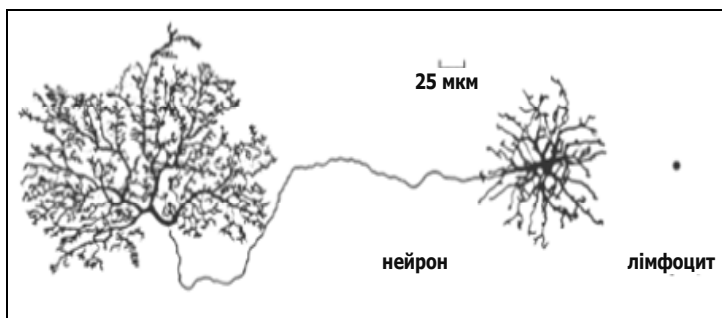


Рис. 14.5. Нейрон і лімфоцит ссавців. Обидві клітини містять однаковий геном, але експресують різні РНК і білки (за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2013, зі змінами)

Інша група генів (гени, які *регулюються*) відповідає за синтез специфічних білків, а рівень їхньої експресії залежить від різних регулюючих факторів. Скажімо, інтенсивність транскрипції мРНК може тимчасово збільшуватись або зменшуватись під впливом білків, які зв'язуються з різними регуляторними ділянками гена. Активність регуляторних білків, в свою чергу, контролюється рецепторами, які локалізовані або всередині клітини, або на її поверхні. Рецептори розпізнають специфічні молекули, такі як стероїдні гормони, пептидні фактори росту і нейромедіатори, і передають сигнали всередину клітини, що й "забезпечує" контроль активності регуляторних білків, які впливають на ДНК.

ЗАГАЛЬНІ ПРИНЦИПИ ГЕНЕТИЧНОГО КОНТРОЛЮ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ

Найважливішим фактором регуляції генної активності є елементи геному, які відповідають за синтез регуляторних білків – гени-регулятори. Сполучаючись з певними нуклеотидними послідовностями ДНК – *регуляторними послідовностями*, що мають назву *операторів* у прокаріотів і *цис-елементів* в еукаріотів, білки-регулятори сприяють або перешкоджають сполученню РНК-полімерази з промотором. Якщо білок-регулятор взаємодіє з оператором, який займає частину промотора, або розміщений між ним і структурною частиною гена, то це не дає можливості РНК-полімеразі сполучитись із промоторною послідовністю і здійснити транскрипцію. Такий білок називають *репресором*. Якщо РНК-полімераза має слабку спорідненість до певного промотора, але йому передує ділянка зв'язування з білком-регулятором, то приєднання такого регулятора безпосередньо перед промотором може полегшити зв'язування РНК-полімерази з ДНК, унаслідок чого ініціюється транскрипція. Такі білки називаються *активаторами*.

Контроль експресії генів може здійснюватися на різних рівнях, а саме на рівні регуляції:

- транскрипції (контроль тривалості й частоти транскрипції);

- процесингу РНК (контроль сплайсингу та процесингу РНК-транскриптів);
- транспорту РНК та її локалізації;
- трансляції;
- деградації мРНК;
- активності білка.

Для більшості генів найважливішим є контроль на рівні транскрипції.

РІВЕНЬ ТРАНСКРИПЦІЇ (ДИФЕРЕНЦІЙНА АКТИВНІСТЬ ГЕНІВ)

Активність багатьох генів може швидко змінюватись за дії спеціальних регуляторів. Клітини мають ідентичну структуру ДНК, але в деяких із них активні одні гени, а в деяких – інші. Інакше кажучи, у цих клітинах здійснюється транскрипція різних наборів мРНК і відбувається диференціація в різних напрямках.

Регуляція активності генів має багаторівневий характер. Розрізняють *пряму* й *опосередковану* регуляцію активності.

Пряма регуляція зачіпає безпосередньо гени й забезпечується *транс-регуляторними* і *цис-регуляторними* "апаратами". *Транс-регуляторний* апарат – гени, які кодують регуляторні білки, перш за все транскрипційні фактори. *Цис-регуляторний* апарат – регуляторні послідовності ДНК, або *модулі*, які розміщені на певній відстані від кодуючих ділянок генів чи всередині них. Цис-регуляторні модулі містять специфічні послідовності – сайти-мішені, з якими взаємодіють транскрипційні фактори.

Опосередкована регуляція – зміна активності генів шляхом видозміни структури хроматину або ДНК. Так, на активність і, можливо, на специфічність транскрипції впливає розмір петлеподібних ділянок ДНК. Вважається, що на ефективність транскрипції еукаріотичних генів безпосередньо впливає упаковка хроматину: транскрипційно активними будуть неконденсовані ділянки хроматину, а гетерохроматин транскрибується слабо або зовсім не підлягає транскрипції.

Транс-регуляторний апарат. Транскрипційні фактори

Серед транскрипційних факторів є *загальні*, або *корові*, і *специфічні*. Загальні взаємодіють з промоторною частиною гена й забезпечують "посадку" РНК-полімераза. Вони необхідні для здійснення транскрипції будь-яких генів. Специфічні транскрипційні фактори взаємодіють з енансерами гена, вони необхідні для активації або репресії генів певного типу.

Корові транскрипційні фактори – спеціальні білки, які забезпечують процес транскрипції. Транскрибування генів починається після зв'язування РНК-полімераза з їхніми *промоторами*. Промотор – це регуляторна ділянка гена, послідовність ДНК, яка забезпечує специфічність приєднання РНК-полімерази та контроль транскрипції. Промотори більшості генів, які зчитуються РНК-полімеразою II, містять два базальні елементи: ТАТА-бокс та ініціаторний елемент.

ТАТА-бокс розташований на відстані 25–30 нуклеотидів упереду від старту транскрипції, а ініціаторний елемент – на стартовій ділянці транскрипції – від -5 до +10 нуклеотидів.

Першою стадією у збиранні транскрипційного комплексу на ТАТА-вмісних промоторах є впізнання і зв'язування ТАТА-боксу ТАТА-зв'язувальним білком (ТАТА-*binding protein*, ТВР). Потім до комплексу "ТВР-ТАТА" приєднується базальний фактор транскрипції ІВ. Останній ангажує до ансамблю РНК-полімераза II і базальний фактор транскрипції ІФ. Формується так званий *мінімальний преініціаторний комплекс* (ТАТА-ТВР-ТФІВ-ТФІФ-РНК-полімераза II). Приєднання базальних факторів транскрипції ІЕ і ІН завершує утворення повного преініціаторного комплексу, який при додаванні субстратів ініціює синтез РНК. За певних умов (скажімо, суперспіралізації ДНК) мінімальний преініціаторний комплекс може ініціювати транскрипцію без участі транскрипційних факторів ІЕ і ІН.

Специфічні транскрипційні фактори є зовнішніми для гена, який активується, і тому називаються транс-регуляторними фак-

торами. Це особливі білки, які контролюють стабільність взаємодії корових транскрипційних факторів з певними ділянками ДНК.

Транскрипційні фактори мають три спеціалізовані домени, які виконують різні функції:

- *транс-активуючий домен* дозволяє білку активувати основний транскрипційний апарат (ТАТА-білок-зв'язувальні білки і РНК-полімеразу);
- *домен модуляції* містить один або більше ліганд-зв'язувальних сайтів або сайтів фосфорилування, які необхідні для активації факторів транскрипції;
- *ДНК-зв'язувальний домен* дозволяє білку розпізнавати і вибірково зв'язуватись зі специфічною послідовністю ДНК.

Домени зв'язування мають декілька структурних типів, так званих "*мотивів*", відповідно до яких розрізняють декілька родин транскрипційних факторів. Існування таких груп свідчить про те, що в ході еволюції відібрано декілька типів поліпептидів, здатних зв'язуватись з подвійною спіраллю ДНК. Для таких поліпептидів характерна наявність послідовності, що утворює α -спіраль, яка розміщується у великій борозенці ДНК. Завдяки такому структурно стійкому остову, транскрипційний фактор має можливість взаємодіяти зі специфічною послідовністю нуклеотидних основ.

Фактори транскрипції ДНК – основні регулятори активності гена, які розпізнають короткі відрізки подвійної спіралі ДНК і при цьому визначають, який із тисячі генів у клітині буде транскрибуватись. Виявлено тисячі регуляторних білків, кожний із яких має свої унікальні риси, але більшість із них зв'язуються з ДНК у вигляді гомодимерів або гетеродимерів і розпізнають ДНК за допомогою одного з невеликого числа структурних мотивів.

Серед таких регуляторних білків виділяють три основні родини: білки типу "цинкові пальці", "спіраль-поворот-спіраль" і амфіфільні спіральні білки.

Білки типу "цинкові пальці" (*zink fingers*). Білки цієї групи названо так тому, що вони мають ділянки приблизно із 23 амінокислот, які містять залишки цистеїну й гістидину. Чотири залишки цистеїну (або два залишки цистеїну і два гістидину) зв'язують-

ся через координаційні зв'язки з іоном цинку й формують пальце-подібні вирости – "пальці". "Верхівки пальців" безпосередньо контактують з великою борозенкою ДНК, причому сусідні пальце-подібні структури зв'язуються із протилежними сторонами спіралі ДНК (рис. 14.6). Рецептори глюкокортикоїдів, естрогенів, вітаміну А, прогестерону, гормонів щитоподібної залози й ретиноевої кислоти містять по два таких "цинкових пальця".

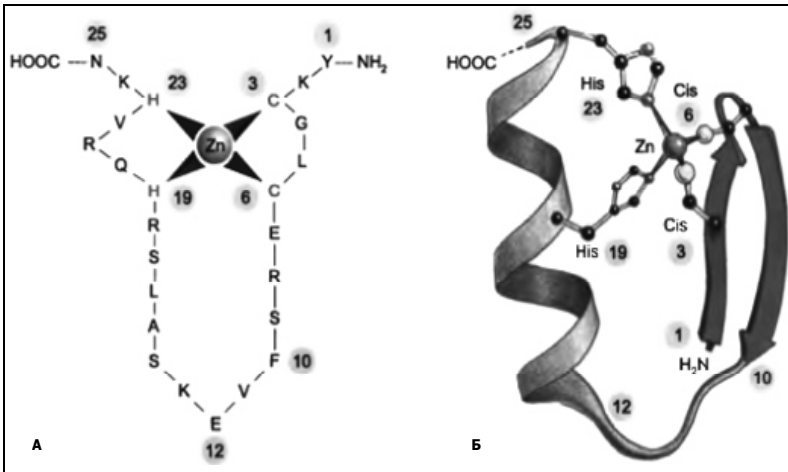


Рис. 14.6. Один із типів "цинкових пальців":

А – схематичне зображення амінокислотної послідовності "цинкового пальця";
 Б – тримірна структура того ж типу "цинкового пальця", який складається із антипаралельного β-листа (амінокислоти 1–10), за яким – α-спіраль (амінокислоти 12–24). Чотири амінокислоти, які зв'язують цинк, міцно утримують один кінець α-спіралі з одним із кінців β-шару

(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2013, зі змінами)

Білки "спіраль-поворот-спіраль" (helix-turn-helix). Ця група ДНК-зв'язувальних білків представлена у більшості випадків гомодимерами. Кожен мономер містить 2 α-спіралі, часто майже перпендикулярні одна одній, з'єднані короткою перемичкою. Одна із цих спіралей – розпізнавальна (*recognition helix*) – є просторово комплементарною великій борозенці ДНК і взаємодіє з екзоциклічними групами азотистих основ. Інша спіраль часто утворює допоміжні контакти з цукрово-фосфатним каркасом

ДНК. При цьому конформація ДНК змінюється незначно – дещо міняється геометрія фосфодієфірних зв'язків у АТ-багатих доменах, проте лінійна В-форма ДНК зберігається (рис. 14.7).

Амфіфільні спіральні білки. Цю групу білків становлять дві підгрупи: білки "спіраль-петля-спіраль" (*helix-loop-helix*) і білки типу "лейцинової застібки" (*leucine zipper*). Білки-регулятори, які мають структуру "лейцинової застібки", можуть формувати гомодимери, у яких субодиниці ідентичні, або гетеродимери, у яких субодиниці не схожі між собою. Останні складаються із двох різних білків з різною специфічністю до ДНК, тому здатність певних факторів транскрипції до формування функціональних димерів значно підвищує різноманітність ДНК-зв'язувальних білків. Утворення гетеродимерів – один із найважливіших механізмів, які використовує еукаріотична клітина для регуляції активності генів (рис. 14.8).

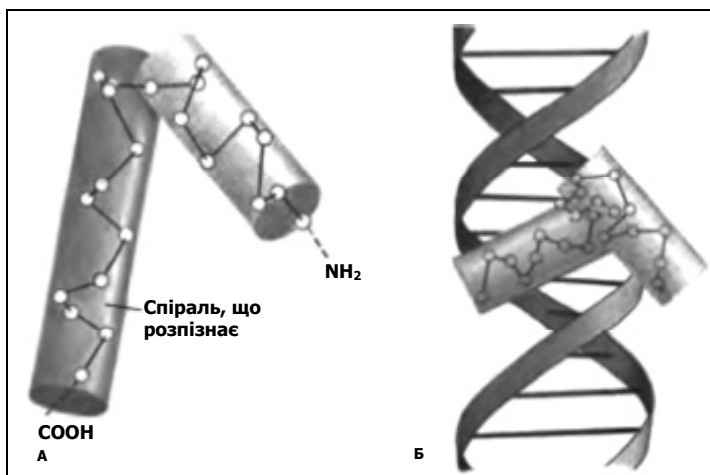


Рис. 14.7. Мотив "спіраль-поворот-спіраль".

У зображеному на (А) мотиві кожний білий кружок означає центральний карбоновий атом в амінокислоті.

С-кінцева α -спіраль бере участь у сайт-специфічному розпізнаванні ДНК.

Як показано на (Б), спіраль входить у велику борозенку ДНК, де вона контактує із зовнішньою частиною нуклеотидних пар основ. N-кінцева α -спіраль зазвичай виконує функцію структурного компонента (за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2013, зі змінами)

Системи проведення зовнішніх сигналів до геному (сигналінг)

Регуляція активності геному в клітині можлива не лише за допомогою транскрипційних факторів, які виробляються і діють усередині клітини, контролюючи активність власного геному, а й за рахунок зовнішніх факторів, які синтезуються іншими клітинами. Для сприйняття зовнішніх сигналів необхідні спеціальні рецептори, а також "провідні" системи, за допомогою яких трансформований сигнал "доводиться" до транскрипційних факторів і активує їх.



Рис. 14.8. Димер "лейцинової застібки", зв'язаний з ДНК. Два α -спіральні домени (знизу) димеризуються в α -спіральній області "лейцинової застібки" (зверху) і утворюють перевернуту Y-подібну структуру. Кожне плече Y-структури утворене однією α -спіраллю (по одній від кожного мономера), яка опосередковує зв'язування зі специфічною послідовністю ДНК у великій борозенці. Кожна α -спіраль зв'язується з половиною симетричної структури ДНК
(за Альбертсом Б., Джонсоном А., Льюїсом Д. та ін., 2013, зі змінами)

Хімічні фактори, або ліганди, можуть продукуватись на різній відстані від реагуючої клітини. Якщо відстань між тканиною, продукуючою ліганд, і сприймаючою клітиною на багато порядків перевищує клітинний поперечник, то говорять про *дистантні* взаємодії. У цих випадках ліганд переноситься кров'ю або шляхом дифузії по міжклітинному простору. Прикладом таких дистантних взаємодій може послугувати вплив гормонів на клітини-мішені.

За дистантних взаємодій розрізняють два типи лігандів. Молекули лігандів *першого* типу завдяки своїй гідрофобності вільно проникають через ліпідні компоненти клітинної мембрани. До них відносять:

- стероїдні гормони (естрогени, кортизон тощо);
- ретиноеву кислоту (відіграє важливу роль у диференціації кінцівок);
- окис азоту й активні форми кисню (виявлено важливу роль NO у процесах диференціації: в ініціації кальцієвих хвиль при заплідненні, у нейрогенезі тощо).

Стероїдні гормони завдяки своїй гідрофобності вільно проникають через ліпідні компоненти клітинної мембрани до цитоплазми, де зв'язуються зі своїми внутрішньоклітинними рецепторами. За відсутності гормонів рецептори неактивні: вони зв'язані з білками-інгібіторами. Коли ж відбувається зв'язування молекули гормону з білком-рецептором, комплекс рецептора з інгібітором розпадається, і рецептор починає виконувати функцію транскрипційного фактору.

Гормональна активація гена може відбуватись дуже швидко. Так, у дрозофіли уже через 5–10 хв після ін'єкції стероїдного гормону линьки екдізону в політенних хромосомах з'являється 6 нових транскрипційно активних ділянок – пуфів.

Стероїдні гормони індукують синтез всіх видів РНК – не лише мРНК, але й рРНК і тРНК, тому вони активують не тільки транскрипцію, але і процеси трансляції. В різних клітинах-мішенях стероїдні гормони індукують різні групи генів, хоча молекули-рецептори до даного гормону у всіх клітинах одні й ті самі. Отже, хроматин різних клітин-мішеней реагує по-різному на зв'язування одного і того ж молекулярного комплексу "гормон-рецептор".

Молекули лігандів *другого* типу, гідрофільні, діють по-іншому. Вони в цитоплазму не проникають, а зв'язуються із зовнішньоклітинною частиною мембранних рецепторів або з позаклітинними білками. До них відносять:

- білкові гормони (інсулін, адренкортикотропний гормон, соматотропін, еритропоетин);

- ростові фактори, що стимулюють клітинну проліферацію (фактори росту фібробластів, нервів, пухлинних клітин тощо);
- фактори ембріональної індукції.

У відповідь на зв'язування гормонів із зовнішньою частиною мембранних рецепторів у реагуючій клітині запускається каскад реакцій, в яких можуть брати участь, зокрема, вторинні посередники (цАМФ, цГМФ або Ca^{2+}). В основі передачі сигналу від комплексу ліганд – мембранний рецептор до регуляторних білків, що можуть зв'язуватись з ДНК, лежить найчастіше *каскад фосфорилування*: фосфорильований білок – протеїнкіназа – активуючись забезпечує активацію наступної молекули білка – мішені й так далі. Зрештою відбувається фосфорилування неактивних транскрипційних факторів, їхній транспорт у ядро та стимуляція транскрипції генів – мішеней. Каскадний процес, у результаті якого відбувається активація генів, називається *трансдукцією* (передачею) сигналу (детально питання міжклітинної хімічної сигналізації розглянуто у Розділі "Інформаційні міжклітинні взаємодії").

Цис-регуляторний апарат

Клітини еукаріотів мають широкі можливості регуляції активності структурних генів. Для цього у них є *контролюючі* ділянки ДНК – цис-регуляторні послідовності. Окрім промоторів, що розташовані поблизу точки почату транскрипції, існують більш віддалені (від сотень до декількох тисяч пар основ) регуляторні послідовності, які підсилюють синтез РНК – *енхансери*, або пригнічують його – *сайленсери*. Один структурний ген може мати декілька енхансерів (багатомодульна регуляція). З енхансерами зв'язуються комплекси специфічних транскрипційних факторів, які, в залежності від свого складу, можуть або підсилювати, або пригнічувати активність даного структурного гена. Багатомодульна регуляція і перехід від стимуляції гена до його пригнічення навіть при невеликій зміні складу білкового комплексу сприяє різноманіттю клітинної диференціації. Вплив енхансера на да-

ний структурний ген здійснюється завдяки вигину ділянки ДНК, розміщеної між ними, у результаті чого комплекс "енхансер – транскрипційні фактори" встановлює безпосередній контакт зі структурним геном.

Цис-регуляторні ділянки гена виконують різні функції, але перш за все, вони сприймають і обробляють інформацію, яку "створює" сукупність всіх транскрипційних факторів, наявних в ядрі. На основі цієї інформації відбувається "прийняття рішення" про активацію чи репресію регулюючого гена.

До процесів, які регулюють активність генів на рівні транскрипції, відноситься також метилювання – деметилювання різних ділянок ДНК по цитозину. Крім звичайного цитозину у ДНК тварин є 5-метилцитозин.

Метилювання цитозину здійснює особливий фермент метилтрансфераза. Метилювання цитозинів, розміщених в промоторній частині, приводить до репресії транскрипції. Так, вміст метил-цитозину в генах глобіну еритробластів, в яких відбувається активна транскрипція цього гена, є незначним, тоді як в інших клітинах, де ген глобіну не експресується, рівень метил-цитозину досягає високих значень.

Отже, метилювання блокує, а деметилювання розблоковує активність генів. В ході раннього розвитку зародка відбувається деметилювання ДНК, у результаті чого відбувається активація генів. Пізніше рівень метилювання може знову зрости і бути специфічним для певного типу клітин і сприяти підтримці стійкості диференціації.

Регуляція на рівні транскрипції є одним із основних механізмів контролю клітинної диференціації.

Один і той же ген може активуватись не одним, а різними наборами сигналів, як взаємодіють з різними модулями регуляторної ділянки. Окрім того, диференційно експресуватись можуть не лише окремі гени, але й цілі блоки генів, при чому їхня активність може бути "самопідтримувальною" – після одноразової активації вони спонтанно підтримують у подальшому свою активність на певному рівні. Це може слугувати поясненням високої стійкості диференційованого стану багатьох типів клітин.

Регуляція в процесі сплайсингу і транспорту мРНК в цитоплазму

РНК, що утворюється під час транскрипції, часто не є придатною для виконання притаманних їй функцій. Для набуття функціональності первинний транскрипт підлягає *процесингу* (дозріванню).

Як відомо, щойно транскрибована молекула мРНК (пре-мРНК) складається не лише із ділянок, що несуть генетичну інформацію (*екзонів*), але й з некодуючих (*інтронів*). Під час процесингу видаляються інтрони та з'єднуються екзони в результаті *сплайсингу* – процесу, який забезпечує безперервність кодуючої послідовності.

Сплайсинг відбувається одночасно з транскрипцією й полягає у видаленні з пре-мРНК інтронних некодуючих послідовностей. Процес сплайсингу відбувається, зазвичай, в сплайсосомах – комплексах (формуються на молекулі пре-мРНК), які складаються з гетерогенної ядерної РНК, малих ядерних РНК (мяРНК) і низки білкових факторів сплайсингу. Екзони, що залишились, можуть поєднуватись в різних комбінаціях у результаті чого із однієї молекули пре-мРНК, може утворюватись декілька типів більш коротких молекул мРНК, які кодують різні білки.

В еукаріотичних клітинах поширені процеси *альтернативно-го сплайсингу* мРНК, які призводять до виникнення з однієї послідовності гена різних мРНК і, відповідно, різних білків. Під час альтернативного сплайсингу ділянка, що в одній клітині вирізається як інтрон, в іншій може залишитися у складі зрілої мРНК як типовий екзон (детальніше див. у Розділі "Ядро").

Альтернативні процеси "дозрівання" однієї мРНК можуть відбуватися в клітинах різного типу або в клітинах одного типу, але на різних етапах розвитку. Білки, що утворюються на матрицях альтернативно сплайсованих мРНК, є спорідненими між собою, проте функції, що вони виконують, дещо відрізняються, й ці білки можуть мати інші властивості. Так, альтернативне "дозрівання" пре-мРНК імуноглобулінів приводить до появи в клітині двох варіантів зрілих мРНК. Одні з них забезпечують синтез трансмембранних білків – рецепторів лімфоцитів, інші секреторних імуноглобулінів.

Взагалі, молекули пре-мРНК можуть проходити альтернативний процесинг завдяки *редагуванню* РНК. Послідовність пре-мРНК підлягає під час цього процесу змінам у результаті не лише видалень, але й вставок або заміни основ. Наприклад, у людини такому редагуванню в клітинах кишечника підлягає пре-мРНК гена аполіпопротеїну В – відбувається заміна Ц на У. Така зміна приводить до появи скороченої форми цього білка. У клітинах печінки, де редагування цієї пре-мРНК не відбувається, утворюється білок повної довжини. Дві форми білка виконують різні функції: повнорозмірна форма забезпечує деградацію ліпопротеїнів низької щільності в печінці, у той час як укорочена такої здатності не має.

РІВЕНЬ ТРАНСЛЯЦІЇ

Навіть при однаковому наборі готових до трансляції мРНК клітини відрізняються між собою за часом початку цього процесу і за його темпом.

Регуляція на рівні трансляції проявляється, в основному, у затримці цього процесу. Наприклад, спостерігається блокування трансляції заготовлених в овогенезі материнських мРНК до активації яйцеклітини. Під час дроблення пул материнських мРНК транслюється не одночасно, а поступово, за певною просторово – часовою програмою.

Істотні затримки на початку трансляції уже заготовлених мРНК відмічені при диференціації еритроїдних, сперматогенних і інших спеціалізованих типів клітин.

ПОСТТРАНСЛЯЦІЙНИЙ РІВЕНЬ

Регуляція експресії може здійснюватися, про що вже йшлося вище, й на посттрансляційному рівні: трансляція може відбутись, але може мати місце затримка на етапі процесингу синтезованої білкової молекули або на етапі її надходження в ту ділянку клітини, де вона має функціонувати. Після завершення трансляції синтезований поліпептид проходить численні пе-

ретворення: "відрізання" певних фрагментів, зміна третинної структури, різноманітні хімічні модифікації, а також переміщення до місця виконання своєї функції. Час і місце посттрансляційних перетворень чітко визначені. Так, у білків позаклітинного матриксу кінцеві етапи посттрансляційної регуляції можуть проходити взагалі за межами клітини.

Роль посттрансляційних перетворень в регуляції клітинної диференціації вивчена ще не достатньо, однак, безсумнівним є те, що вона важлива й досить значна, особливо при формуванні надмолекулярної клітинної і тканинної "архітектури".

ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ КЛІТИН У ХОДІ ІНДИВІДУАЛЬНОГО РОЗВИТКУ ОРГАНІЗМУ

Процеси диференціації мають місце на всіх етапах онтогенезу. В яйцеклітині при заплідненні відбувається *овоплазматична сегрегація* (розділення яйця на зони: інтенсивне переміщення цитоплазми яйцеклітини, в ході якого намічаються основні, але далеко не всі, елементи просторової організації зародка), яка визначає напрямок розвитку бластомерів у зародках ряду видів тварин. Під час цього етапу диференціації, який називається *овотиповим*, виникають біохімічні відмінності між різними ділянками цитоплазми зиготи. Саме ці ділянки (їх називають *презумптивними* або *морфогенетичними детермінантами*), потрапляючи при дробленні в той або інший бластомер, визначають напрямок його подальшої диференціації.

Ідея про нерівноцінність різних ділянок цитоплазми яйцеклітини лежала в основі однієї із наукових теорій клітинної диференціації – теорії Дріша – Моргана. Справді, цитоплазма яйцеклітини впливає на транскрипційну активність ядер. Найяскравіше це було продемонстровано в класичних дослідах Дж. Гердона (див. вище) по пересадці ядер диференційованих клітин в енуклеювані яйцеклітини: в пересаджених

ядрах починається синтез різних видів РНК точно за тим же розкладом, що і в нормальній яйцеклітині, що дробиться.

На молекулярному рівні морфогенетичні детермінанти реалізують свою дію як фактори, що регулюють і/або модулюють транскрипцію, а їхнє переміщення в ту або іншу частину яйця опосередковується внутрішньоклітинною системою транспорту (білками цитоскелету, динеїном, кінезином).

Проте у більшості випадків напрямок диференціації ембріональних клітин може бути змінений вже після завершення овоплазматичної сегрегації. Основну роль у виборі даною клітиною напрямку диференціації відіграють зовнішні сигнали, що надходять безпосередньо або опосередковано від інших клітин організму та структур позаклітинного матриксу. Саме диференціація у відповідь на зовнішні сигнали забезпечує гнучкість і тонку просторово – часову координацію диференціації, без чого неможливий нормальний розвиток.

Бластомерний етап диференціації – це етап, на якому між бластомерами виникають біохімічні та морфологічні відмінності, які підсилюються в міру дроблення. По мірі дроблення утворені ядра розходяться в різні ділянки колишнього яйця і оточуються біохімічно й структурно різними ділянками цитоплазми. Таке різне оточення й визначає диференційну активність генів у різних зонах, різних зачатках. При цьому незначна, чисто кількісна, відмінність в цитоплазмі двох клітин, які опинились в різних частинах бластули, може спричинити "вмикання" в них різних генів, що в свою чергу, приведе до синтезу зовсім різних білків і, тим самим, істотно змінить властивості цих клітин.

За рахунок овоплазматичної сегрегації може виникнути стільки видів клітин, скільки в яйці утворилось "специфічних зон" цитоплазми. Однак, у такий спосіб можна пояснити лише первинну диференціацію і початкові процеси розвитку (гаструляцію). Подальша диференціація (поява відмінностей між однаковими до того клітинами) може бути досягнута тільки за рахунок наявності впливу на клітину зовні, з боку інших клітин.

Під час *гаструляційного етапу* диференціації між клітинами посилюються біохімічні й морфологічні відмінності, при цьому можливості (потенції) їхнього подальшого специфічного розвитку все більше звужуються.

На *ранньому гістогенетичному етапі* відбувається поява зачатків тканин, а на *пізньому гістогенетичному етапі* – формування тканин і органів.

У ході гаструляції, закладання й розвитку органів відбуваються різноманітні процеси морфологічної, фізіолого-біохімічної та функціональної диференціації клітин. При цьому клітини, які диференціюються, стають усе більш залежними одна від одної та від організму як цілісної системи, а отже, усе менше здатними до самозабезпечення.

Процеси диференціації відбуваються й у дорослому організмі, вони лежать в основі оновлення багатьох тканин. Отже, здатність до диференціації є характерною не лише для клітин організму, який розвивається, вона зберігається і в клітинах дорослої особини.

ДИНАМІЧНА СТІЙКІСТЬ ДИФЕРЕНЦІЙОВАНОГО СТАНУ

Клітину, яка досягла диференційованого стану, не можна вважати сталою системою. На всіх рівнях її функціонування, включаючи процеси транскрипції і трансляції, відбуваються "коливальні" процеси. Найбільш відомі з них – це ритми з добовим періодом. Саме у такому ритмі відбуваються "коливання", наприклад, експресії генів у клітинах гіпоталамусу ссавців. Відомі також коливання і з коротшими періодами (скажімо, синтез білка в печінці).

Інколи стійкість диференційованого стану своєрідно поєднується з переходом із одного диференційованого стану в інший. Таке явище носить назву *трансдетермінація*, описане швейцарським біологом Е. Хадорном на прикладі клітин імагіналь-

них зачатків комах. Він дисоціював імагінальний зачаток певного органу (наприклад, крила) на окремі клітини, які культивували роками, пересаджуючи із однієї дорослої особини в іншу. В цих умовах клітини ділились, але не диференціювались, через відсутність гормону екдізону. Однак, коли клітини трансплантували знову в личинку, у якої була достатня кількість екдізону, то диференціація наступала навіть після багаторічних пасажів трансплантату. Цей дослід продемонстрував стійкість диференційного стану, який зберігається навіть після численних клітинних поділів (що за нормального розвитку не спостерігається).

Деякі трансдетермінації зворотні, інші – майже, або повністю незворотні.

Молекулярні механізми підтримки стійкості диференційованих клітин пов'язані з набором модифікацій гістонів, варіантів гістонів, набором негістонових білків, "положенням" генів у ядрі, часом реплікації в S-фазі, "щільністю" активних генів тощо. Всі ці характеристики є взаємопов'язаними, вони встановлюються в даному типі клітин на певному етапі диференціації і можуть стабільно підтримуватися. Так більшість міток, що визначають тривалу підтримку епігенетичного стану, пов'язані з модифікацією гістона H3, а саме з його метилуванням або ацетилюванням (що є більш стабільною "міткою"). Основним же негістоновим білком, пов'язаним із гетерохроматином, є білок HP1 (*Heterochromatin Protein*), який зв'язується з ділянками ДНК, що містять ди- і триметильовані по дев'ятому лізину гістони H3, та виконує головну лінкерну функцію при формуванні гетерохроматину і асоційованому з цим *сайленсingu* ("мовчання") генів.

Інактивація X-хромосоми у самок ссавців здійснюється за дещо іншим механізмом – за допомогою великої некодуючої РНК, що називається *Xist* (*Xinactive specific transcript*), яка має унікальну властивість зв'язуватися у *cis*-конфігурації і накопичуватися по всій довжині хромосоми, з якої вона транскрибується, та покривати її. *Xist* РНК, крім того, здатна рекрутувати інші хроматин – модифікуючі білки.

Інший механізм підтримки певних генів у неактивному стані – це успадкування "рисунка" метилювання ДНК у наступних клітинних поколіннях. В період раннього розвитку відбувається деметилювання значної частини ДНК і внаслідок цього – активація генів. Але починаючи з більш пізніх стадій онтогенезу "рисунок" метилювання стабілізується і передається нащадкам даної клітини. Це явище визначають як *епигенетичну спадковість*, або *геномний імпринтінг*.

Отже, диференціація клітин – це виникнення стійких розходжень у їхній будові у зв'язку зі спеціалізацією щодо виконання визначених функцій. В основі диференціації клітин лежать процеси синтезу специфічних білків, тобто диференційна експресія генів. Існує багато факторів диференціювання, які викликають диференційну активність генів у різних частинах зародку і на різних стадіях розвитку.

Диференціація супроводжується змінами якісних, кількісних і часових параметрів життєдіяльності клітин. Вона, як правило, пов'язана з ускладненням структури клітини й включає характерні морфологічні зміни: набуття ядром й клітиною у цілому визначеної форми та розмірів; встановлення закономірних співвідношень між ядром і цитоплазмою; розвиток органел "загального призначення"; утворення спеціальних органел; синтез специфічних включень; утворення міжклітинної речовини та регуляція ступеню її розвитку; поява міжклітинних взаємодій і встановлення міжклітинних контактів, у тому числі спеціалізованих. Змінюється форма клітин. Так, епітеліальні клітини набувають кубічної, призматичної чи пласкої форми. Клітини тканин внутрішнього середовища різноманітніші за формою. Сполучнотканинні клітини активно виробляють міжклітинну речовину, а м'язові містять міофібрили. Між нейронами формуються синаптичні контакти.

Для різних клітин характерні визначені "взаємини" між процесами диференціації й поділу. Однак у цілому в міру підвищення ступеня диференціації здатність клітин до поділу закономірно зменшується.

У гістогенезі клітини визначеного цитотипу інтегруються та частково втрачають свою відносну автономність, властиву ранній (проліферативній) стадії. Останнє відбувається внаслідок встановлення надклітинних регуляторних механізмів, що здійснюють вплив на цитодиференціацію. У період міжклітинної інтеграції провідну роль відіграє плазмолема та її рецепторний комплекс. При цьому клітини одного цитотипу характеризуються мозаїкою циторецепції, що створює умови для адаптивної селекції клітин. Останнє є одним із механізмів формування оптимального співвідношення базисних процесів гістогенезу – проліферації, диференціації та загибелі клітин.

Реактивні процеси в клітинах за дії на організм екстремальних факторів середовища супроводжуються зміною клітинних органел, набряканням мітохондрій, розпадом мітохондріальних крист, дезорганізацією ЕПС, пікнозом ядра. При наростанні ступеня ушкодження такі дистрофічні зміни стають необоротними, і клітина гине (некроз) (детально питання механізмів клітинної загибелі розглянуті у Розділі "Відтворення клітин. Клітинний цикл").

Розглядаючи клітину як елементарну одиницю живого із загальнобіологічних позицій, важливо визначити її положення й роль у складі ієрархічно більш високоорганізованої біологічної системи – організму. Тут вона виступає як провідна структурно-функціональна одиниця самостійного рівня структурної організації живого – тканини.

У тканині кожен тип клітин "запрограмований" на виконання ряду спеціальних функцій. Щоб їх виконувати відповідно до потреб і адаптивних потенцій тканини, клітина має активно сприймати тканинне оточення, реагувати на нього і змінювати свою функціональну активність залежно від загальнотканинного гомеостазу. Провідна роль у цьому процесі належить плазмолемі. Будучи пограничним молекулярним комплексом клітини, вона за допомогою свого рецепторного апарату зв'язує її внутрішньоклітинне середовище із позаклітинним (тканинним), роблячи клітину лише відносно автономною морфо-функціональною одиницею тканини; забезпечує

міжклітинні взаємозв'язки і взаємодію регуляторних механізмів тканини з внутрішньоклітинними структурами. Плазмолема є найважливішою частиною системоутворювального механізму гістогенезу (детальніше див. Розділ "Структура й функції біологічних мембран").

Сприймаючи зміни міжклітинного середовища (мікрооточення), плазмолема передає отриману інформацію всередину клітини на ключові функціональні комплекси (ферменти, депо кальцію, ядро тощо), які забезпечують зміну фізіологічної активності клітини в повній відповідності до "потреб" тканини в цілому. Плазмолема, будучи своєрідною винесеною на периферію частиною загальноклітинної мембранної системи, є прямим продовженням цього складного внутрішньоклітинного "мембранного конвеєра", представленого ЕПС, апаратом Гольджі, ядерною мембраною, що реалізує більшість загальнометаболических й спеціальних функцій клітини.

Завдяки тісному посередницькому контакту плазмолемі з тканинним середовищем, з одного боку, і прямому зв'язку з ключовими внутрішньоклітинними функціональними комплексами, з іншого, клітина є цілісною, стійкою та надзвичайно динамічною біологічною системою на всіх етапах свого життєвого циклу в складі тканин. Останні, у силу ієрархічної організації живого, розвиваються й функціонують вже на основі своїх власних законів.

Запитання для самоперевірки

1. Що таке диференціація клітин?
2. Які морфологічні зміни відбуваються в клітині під час диференціації?
3. Чи існує залежність між диференціацією і поділом клітини?
4. Які етапи диференціації клітин вам відомі?
5. Яка роль плазмолемі в утворенні міжклітинної інтеграції?
6. Яким чином клітина сприймає тканинне оточення?
7. Чому клітина порівняно автономна структурно-функціональна одиниця тканини?
8. Чому клітина є цілісною стійкою і разом з тим надзвичайно динамічною біологічною системою?

Рекомендована література

Белоусов Л. В. Основы общей эмбриологии: классический университетский учебник / Л. В. Белоусов. – М. : Наука, 2005. – 368 с.

Гистология, эмбриология, цитология : учебник / Ю. И. Афанасьев, Н. А. Юрина, Е. Ф. Котовский и др. ; под. ред. Ю. И. Афанасьева, Н. А. Юриной. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 800 с.

Данилов Р. К. Гистология : учебник для студ. мед. вузов / Р. К. Данилов, А. А. Клишов, Т. Г. Боровая. – СПб : ЭЛБИ-СПб., 2004. – 362 с.

Корочкин Л. И. Биология индивидуального развития (генетический аспект) : учебник / Л. И. Корочкин. – М. : МГУ, 2002. – 264 с.

Молекулярная биология клетки: в 3 т. Т 1 / Б. Альбертс, А. Джонсон, Д. Льюис и др. – М. ; Ижевск : НИЦ "Регулярная и хаотическая динамика". – 2013. – 812 с.

Нейфах А. А. Генетические основы развития / А. А. Нейфах. – М. : Знание, 1969. – 50 с.

Нейфах А. А. Гены и развитие организма / А. А. Нейфах, Е. Р. Лозовская. – М. : Наука, 1984. – 185 с.

ПРЕДМЕТНИЙ ПОКАЖЧИК

- А**берация – 49
агоніст – 237
адгезія – 190
 клітинна – 190
аксонема – 320
амітоз – 552
анаплазія – 579
аніон – 140
 фіксований – 147
антагоніст – 237
антиген – 94
антикодон – 357
антимітоген – 553
антитіло – 94
апарат
 Гольджі – 460
 мітотичний – 545
 транс-регуляторний – 598
 цис-регуляторний – 598
апоптоз – 565
 інструктивний – 566
архебактерія – 20, 33, 35
аутосома – 380
аутофагія – 470
аутофаголізосома – 470
- Б**арвник – 53, 87, 92
 гематоксилін – 93
 гідрофільний – 92
 гідрофобний – 92
 еозин – 93
 кислотний – 92
 ліпофільний – 92, 277
 Май-Грюнвальда –
 нейтральний – 92
 осмієва кислота – 92
 основний – 92
 судан чорний – 92
 судан III – 92
- білок
 аквапорин – 133
 актин глобулярний – 282
 актин фібрилярний – 282
 α -актинін – 287, 289
 актинов'язувальний – 289
 амфіфільний – 600
 амфіфільний спіраль-
 ний – 600
 бактеріородопсин – 33
 БАМ – 307
 віментин – 323
 вінкулін – 207, 301
 гістон – 369
 гліальний фібриляр-
 ний кислий – 323
 десмін – 323
 десмоглеїн – 206
 десмоколін – 206
 десмоплакін – 206
 дестабілізуючий – 360
 динеїн – 312
 "домашнього gospodar-
 ства" – 269
 G-зв'язувальний білок
 ВіР – 422
 експортин ядерний – 349
 експортний – 401
 еластин – 179
 імпортин ядерний – 349
 інтегральний – 120, 445
 інтегрин – 194
 кадгерин – 194, 196
 кальбіндин – 258
 кальмодулін – 258
 кальретікулін – 258
 кальсеквестрин – 258
 кальційзв'язуваль-
 ний – 258

каналоутворювальний
(порин) – 134
катенін – 201
кепіруючий – 301
кінезин – 312
колаген – 175
конексин – 221
ламінін – 184
лектин – 210
лізосомальний – 401
мембранний – 439
міозин – 295
монотопний – 445
нейрофіламентів – 323
нуклеолін – 388
нуклеопорин – 344
p21 – 561
p53 – 577
переносник (перміаз) – 132
периферійний – 120
плакоглобін – 206
політопний – 445
порин – 135
репресор – 248
рибофорин – 439
синапсин – 229
ТАТА-зв'язувальний – 599
талін – 301
транслоказа – 144
трансмембранний – 120
транспортер – 133
транспортин ядерний –
тубулін – 302
фібрилярний – 169
фібронектин – 170
убіквітин – 425
циклін – 554
цитокератин – 323
шаперон – 422
ядерної ламіни – 345
біосинтез
білка – 400

рибосом – 387
біосфера – 10
біоценоз – 10
борозна поділу – 543

Вакуоль
піноцитозна – 154
секреторна – 461
фагоцитозна – 154
везикула – 467
транспортна – 467
веретено поділу – 539
ахроматинове – 539
мітотичне – 539
взаємодія – 167
міжклітинна – 167
вилка – 360
реплікативна – 360
війка – 320
включення – 270
алейронові зерна – 273
алкалоїдні – 270, 278
білкові – 270
вуглеводні – 270
глікогенові – 276
глікозидні – 270, 278
екскреторні – 272
ефірних олій – 277
жирові – 276
жовткові – 274
захисні – 273
інулінові – 276
камфорні – 277
каучукові – 278
крохмальні – 275
ліпідні – 270
ліпофусцинові – 277
меланінові – 277
мінеральні – 270
оксалату кальцію – 279
пігментні – 272
секреторні – 271

- смол – 278
 терпеноїдні – 270
 трофічні – 271
- Г**
- Гало** – 318
 фібрилярне – 318
 гангліозид – 118
 гель – 267
 тиксотропний – 267
- ген**
- дерепресований – 596
 конститутивний – 596
 мутантний – 576
 рРНК – 382
 репарації ДНК – 362, 576
 репресований – 596
 структурний – 589
 супресор – 576
 який регулюється – 597
- гіперплазія – 457, 459, 468, 515, 579
- гіпотеза
- розхитування – 407
- соматичних мутацій – 589
- гістон – 369
- глікозаміноглікан – 170
- глікокалікс – 124
- гліколіпід – 124
- глікопротеїн – 124
- гліоксисома – 484
- гліцерид – 112
- гліцерол – 109
- гомеостаз – 7
- градієнт – 132
- електрохімічний – 132
- концентрації – 132
- Д**
- Деполімеризація** – 282, 548
 десенсибілізація – 245
 детоксикація – 431
 дигліцерид – 113
 димер – 176, 252
- димінуція – 590
 диплосома – 318
 дискретність – 404
 дисплазія – 579
 диференціація – 586
 дифузія – 129
 латеральна – 114
 обертальна – 114
 пасивна – 130
 полегшена – 131
 проста – 131
 діацилгліцерол – 256
 джгутик – 320
 догма – 364
 молекулярної біології – 364
 доліхол – 431
- Е**
- Ейкозаноїд** – 117
 екзон – 355
 екзоцитоз – 153
 конститутивний – 464
 експресія – 25, 236, 249
 елонгація – 366, 416
 транскрипції – 366
 трансляції – 416
 ендоплазматична сітка – 427
 гладенька – 428
 гранулярна – 435
 ендорепродукція – 552
 ендосома – 153, 470
 ендцитоз – 153
 ентропія – 8
 ергастоплазма – 435
- З**
- Затравка** – 286, 305, 361
 золь – 267
- І**
- Ідіограма** – 381
 імуногістохімія – 94
 інгібітор – 134, 534
 клітинного циклу – 534
 конкурентний – 134

неконкурентний – 134
ініціація – 365, 414
транскрипції – 365
трансляції – 414
інозитол-3-фосфат – 117, 255
інтрон – 355
іонофор – 143
рухливі переносники – 143
каналоутворювальний – 134

Кавеола – 116

канал

водний – 133
іон-залежний – 137
іонний – 136
калієвий проточний – 140
K⁺ – 136, 138
катіон-селективний – 138
лігандзалежний – 137
ліганд-керований – 137
медіаторозалежний – 137
механочутливий – 137
Na⁺ – 136
нуклеотидзалежний – 137
потенціалзалежний – 137
Cl⁻ – 136, 138
канцерогенез – 572
каріокінез – 341, 537
каріолема – 342
каріолімфа – 335
каріоплазма – 335
каріотип – 380
кепінг – 366
кислота
арахідонова – 256
гіалуринова – 171
дезоксирибонуклеїнова – 351
жирна – 108
жирна мононенасичена – 109
жирна насичена – 108
жирна ненасичена – 108
жирна поліненасичена – 109

рибонуклеїнова – 355
гетерогенна ядерна
рибонуклеїнова – 358
матрична рибонуклеї-
нова – 356
мала інтерферуюча
рибонуклеїнова – 359
мала ядерна рибонук-
леїнова – 358
мала ядерцева рибо-
нуклеїнова – 358
мікрорибонуклеїнова – 359
рибосомальна рибо-
нуклеїнова – 358
сіалова – 118, 213, 462
транспортна рибонук-
леїнова – 357
фосфорна – 109, 351, 492
хіст-рибонуклеїнова – 359
кільце
Бальбіані – 377
скоротливе – 302, 543
термінальне – 349
цитоплазматичне – 349
ядерне – 349
кінк – 108
кінетохор – 374
клітина
диференційована – 586
еукаріотична – 26
прокаріотична – 26
соматична – 353, 375, 576,
590, 594
код – 17, 404
генетичний – 17, 404
кодон – 404
стартовий – 404
стоп – 404
компартмент – 19, 25, 30, 460
апарату Гольджі – 460
комплекс – 348
ядерно-поровий – 348

- комплементарність – 364
 конексон – 221
 контакт
 адгезивний (фокальний) – 207, 302
 адгезивний пояс – 203
 десмосома – 204
 замикальний – 192, 216
 комунікаційний – 192, 225
 міжклітинний – 190
 напівдесмосома – 208
 плазмодесма – 223
 прикріплювальний – 192, 196
 синапс – 226
 щілинний – 220
 щільний – 217
 кофактор – 176, 405
 кошик – 349
 ядерний – 349
 крохмаль – 275, 520
 асиміляційний – 275
 запасний – 275
 транзиторийний – 275
- Лабілізатор** – 473
 ламелоподія – 293
 ламіна – 345
 ядерна – 345
 ламінопатія – 346
 ланцюг
 відстаючий – 361
 лідуючий – 361
 полінуклеотидний – 351
 ліганд – 137, 603
 внутрішньоклітинний – 138
 другого типу – 604
 першого типу – 604
 позаклітинний – 138
 лізис – 158, 472, 570
 вірусами – 158
 ферментами – 158
 лізосома – 469
 вторинна – 470
 первинна – 470
 постлізосома – 472
 прелізосома – 470
 ліпід – 106
 бішар – 101
 амфіпатичний – 106
 амфільний – 106
 мембранний – 101
 неполярна частина – 106
 полярна частина – 106
 транслокація – 119
 ліпосома – 114
 люмен – 153, 342
- Макрофаг** – 154, 300, 567
 малігнізація – 580
 мембрана – 101
 апикальна – 126
 базальна – 126
 базолатеральна – 126
 внутрішньоклітинна – 129
 внутрішня мітохондріальна – 493
 внутрішня ядерна – 342
 зовнішня мітохондріальна – 493
 зовнішня ядерна – 342
 латеральна – 126
 плазматична – 125
 постсинаптична – 229
 пресинаптична – 226
 рідинно-мозаїчна – 103
 ундулююча – 167
 ядерна – 342
 матрикс – 168, 372
 позаклітинний – 168
 ядерний – 372
 мезосома – 25, 33, 40
 месенджер – 236
 мікроскоп – 60

апертурний близькопольний оптичний – 85
 атомно-силовий – 84
 безапертурний близькопольний оптичний – 87
 високовольтний – 77
 електронний – 76
 електросиловий – 85
 інвертований – 65
 інтерференційний – 70
 конфокальний – 72
 криоелектронний – 78
 магнітно-силовий – 85
 Номарського – 70
 поляризаційний – 66
 порівняння – 64
 рентгенівський – 60, 79
 світловий – 60
 сканувальний зондовий – 79, 81
 сканувальний тунельний – 79, 82
 стереомікроскоп – 64
 темнопольний – 65
 трансмісійний – 76
 ультрафіолетовий – 71
 фазово-контрастний – 68
 флуоресцентний – 71
 Хофманівський – 71
 мікротом – 91
 вібротом – 91
 криотом – 91
 роторний – 91
 санный – 91
 ультрамікротом – 92
 мікроворсинка – 128, 297
 мікротільце – 482
 мікротрубочка – 302
 астральна – 546
 кінетохорна – 546
 мітотична – 545
 полярна – 546
 мікрофіламент – 281
 мінливість – 8
 мітоген – 553
 мітоз – 531
 анафаза – 542
 метафаза – 541
 прометафаза – 541
 профаза – 539
 проліферативний спокій – 534
 телофаза – 542
 мітохондрія – 494
 модифікація
 білків – 270, 423
 посттрансляційна – 270, 423
 молекула
 гідрофільна – 237
 ліпофільна – 237
 сигнальна – 237
 моногліцерид – 112
 мутація – 11, 37, 248, 261, 330, 345, 346, 362, 393, 452, 465, 474, 489, 518, 572, 595
Насос – 144
 АВС-переносник – 149
 АТФ-залежний – 144
 АТФ-синтаза – 148
 електрогенний – 146
 Ca²⁺ – 146
 Na⁺/K⁺-АТФаза – 146
 Na⁺/H⁺-обмінник – 152
 Р-типу – 145
 F- (та V-) типу – 148
 H⁺ – 148
 некроз – 564
 програмований – 570
 нуклеїд – 482
 нуклеотид – 351
 нейромедіатор – 142, 216, 226
 адреналін – 249
 ацетилхолін – 142, 228, 249
 гальмівний – 226

- гліцин – 228
- глутамат – 228
- збуджувальний – 226
- γ-аміномасляна кислота – 142, 228, 249
- нейропептид – 229
- нуклеосома – 370

- Оболонка** – 342
 - ядра – 342
- олігосахарид – 118, 123, 211, 242, 400, 431, 454, 461
- онкоген – 574
- онкогенез – 572
- організатор – 384
 - ядерцевий – 384
- організм
 - автотрофний – 36, 492
 - гетеротрофний – 36, 492
- осмолярність – 147
- остеобласт – 169, 517

- Патологія**
 - апарату Гольджі – 468
 - ендоплазматичної сітки – 457
 - клітинних контактів – 232
 - клітинних рецепторів – 261
 - лізосом – 473
 - мітозу – 562
 - мітохондрій – 514
 - пероксисом – 488
 - плазмолемі – 157
 - цитоскелета – 329
 - ядра – 389
- перенесення – 437
 - котрансляційне – 437
 - посттрансляційне – 437
- перетяжка хромосом – 373, 374
 - вторинна – 374
 - первинна – 373
- періоди клітинного циклу – 533
 - постсинтетичний – 533
 - пресинтетичний – 533
 - синтетичний – 533
- пероксид водню – 36, 433, 482
- пероксисома – 36, 482
- перфузія – 90
- пігментоцит – 277
- піноцитоз – 154
- піроптоз – 567
- плазмолема – 125
 - плинність – 114
 - кораль – 127
- пластида – 519
- пластинка
 - десмосомна – 205
 - метафазна – 541
- поверхня клітини
 - апикальна – 126
 - базальна – 126
 - базолатеральна – 126
- подразливість – 8
- поділ
 - клітинний – 537
 - непрямий – 537
 - прямий – 552
- полісома – 269, 419
- полярність – 126, 184, 219, 293, 311, 352, 588
- посередник
 - вторинний – 236, 256
 - первинний – 236, 237
- послідовність
 - сигнальна – 437
 - сигнальна якірна – 441
 - TATA – 365, 599
- потенціал
 - дії – 228
 - мембранний – 132
 - спокою – 251
- праймер – 361
- проміжний філамент – 323
- проникність – 129
 - мембран – 129

селективна пасивна – 129
протеоліз – 424
 обмежений – 463
 убіквітинозалежний – 425
пора
 ядерна – 347
промотор – 365, 597
простагландин – 117, 250, 256
протеоглікан – 169
перлекан – 184
протеосома – 450
процесинг – 333
 інсуліну – 464
 РНК – 366
псевдоподія – 293, 300
пухирець
 ендоцитозний – 154
 клатриновий облямований – 465
 піноцитозний – 154
 секреторний – 157, 272, 460
 синаптичний – 226
пухлина – 572

Рафт – 116
реакція
 проміжного обміну – 269
редуплікація – 531
ренатурація – 423
репарація – 362
 ексцизійна – 363
 непряма – 363
 пряма – 363
репліка – 82, 89
реплікація – 259
 напіконсервативна – 359
реплікон – 360
ретиналь – 149
ретротранслокація – 452
рефолдинг – 423
рецептор – 236

активатор протеолізоасоційованих сигнальних каскадів – 246
асоційований з G-білком – 246, 251
асоційований з тирозинкіназами – 259
внутрішньоклітинний – 245
іонотропний – 246, 250
рецептор-каналів – 250
гідрофільних молекул – 249
ГАМК – 249
із серин-треонінкіназною активністю – 259
каталітичний – 258
класифікація – 245
клітинної поверхні – 246
ліпофільних молекул – 246
мускариновий ацетилхоліновий – 253
нікотиновий ацетилхоліновий – 251
рецепторної тирозинкінази – 259
із ферментативною активністю – 258
цитокінів – 259
ядерний – 247
рибозим – 13, 368
рибосома – 30
ручки
 динейнові – 317, 320
рух
 війок – 322
 джгутиків – 322

Сайт
 аміоацил-тРНК – 413
 пептидил-тРНК – 413
 посадки рибосоми – 416
самосплайсинг – 368
сателіт – 318

секвестрування – 244
 сенесенс – 565
 сигнал
 апоптичний – 566
 електричний – 241
 утримання – 456
 ядерного експорту – 351
 ядерної локалізації – 351
 сигналізація
 аутокринна – 242
 ендокринна – 239
 міжклітинна хімічна – 235
 паракринна – 240
 синаптична – 240
 юкстакринна – 242
 сигналінг – 603
 синапс –
 електричний – 231
 зі змішаним механіз-
 мом – 231
 нервово-м'язовий – 184
 хімічний – 231
 система
 вакуолярна – 427
 сітка
 ендоплазматична гла-
 денька – 428
 ендоплазматична гра-
 нулярна – 435
 саркоплазматична – 433
 скелет
 внутрішньоклітинний – 311
 спадковість – 7
 спейсер – 383
 сплайнг – 368
 альтернативний – 368
 сплайсосома – 367
 стабілізатор – 474
 субодиниця
 АТФ-синтази – 509
 велика рибосоми – 411
 мала рибосоми – 411
 супутник
 хромосоми – 374
 сфінгозин – 107
 сфінгомієлін – 109
Тандем – 382
 таргетинг – 437
 теломер – 374
 хромосоми – 374
 теорія
 диференціальної активності
 генів – 586, 596
 Дріша – Моргана – 609
 клітинна – 51
 тільце
 апоптичне – 567, 569
 базальне – 320
 Барра – 335
 мультивезикулярне – 472
 передядерцеве – 386
 термінація трансляції – 418
 тетрамер – 324
 точка
 контролю – 531
 початку реплікації – 360
 рестрикції – 535
 трансдетермінація – 611
 трансдукція – 574, 605
 транскрипція – 364
 транслокація – 418
 транслокон – 438
 трансляція – 413
 транспептидація – 417
 транспорт
 активний – 144
 антероградний – 229
 антипорт – 134
 везикулярний – 153
 вторинно активний – 152
 за градієнтом концен-
 трації – 130

нуклеоцитоплазма-тичний активний – 349
нуклеоцитоплазматичний пасивний – 349
пасивний – 130
первинно активний – 152
проти градієнта концентрації – 144
симпорт – 134
уніпорт – 134
трєдмілінг – 282, 303
тригліцерид – 276
триплет – 315, 357, 400

Упізнавання – 445

Фагосома – 154
фагоцит – 154
професійний – 154
фагоцитоз – 154
фактор ініціації – 414
елонгації – 417
термінації – 418
транскрипційний – 365
фермент
адєнілатциклаза – 251, 254
гєліказа – 360
ДНК-полімераза – 361
каталаза – 482
кіназа – 238
лізосомний – 469
маркерний – 105
пептидсинтетаза – 17
протеїнкіназа С – 117, 256
РНК-полімераза – 366
сигнальна пептидаза – 440
топоізомераза – 360
транслокатор фосфоліпідів – 431
транспортна АТФаза – 145
фолдаза – 422

фосфоліпаза – 117, 255
серин-треонінкіназа – 238
фосфатаза – 238
уратоксидаза – 482
циклінзалежна кіназа – 554
цитохром р450 – 433
фібробласт – 167
фіксатор – 90
простий – 90
складний – 90
фіксація – 89
філамент
дєсміновий – 323
проміжний – 323
цитокєратиновий – 323
філоподія – 293
фліп-флєп-перехід – 111, 114, 430
фліпаза – 431
фолдинг – 270, 401, 420
білків – 270, 401, 420
фрагмент Оказакі – 361
фрагмопласт – 551
фосфатидилетаноламін – 109
фосфатидилсерин – 109
фосфатидилхолін – 109
фосфогліцерид – 109
фосфоліпід – 107
інозитольний – 112
мінорний – 111
функція мембран – 129
бар'єрна – 129

Хвороби накопичення – 474

хлоропласт – 519
холєстерол – 107
хондробласт – 169
хроматида – 372
сєстринська – 373
хроматин – 369
гєтерохроматин – 372
еухроматин – 372

конститутивний – 372
факультативний – 372
хромомер – 378
хромосома – 373
 акроцентрична – 373
 метацентрична – 373
 мітотична – 373
 політенна – 375
 субметацентрична – 373
 типу лампових щіток – 377
хромофор – 149

Центр

 клітинний – 318
 організації мікротру-
 бочок – 305
центріоль – 315
центромера – 373
ціанобактерія – 28, 123
цикл
 ендоцитозно-екзоцитоз-
 ний – 155
 Кеннеді – 429
 клітинний – 529
 мітотичний – 544
 центріолярний – 318
циклосома – 560
цитоз
 екзоцитоз – 153
 ендоцитоз – 153
 піноцитоз – 154
 фагоцитоз – 154
цитозоль – 264
 гіалоплазма – 264
 колоїдний розчин – 266
 рН – 268
цитокінез – 542
цитоплазма – 264
 кортекс – 292

 ядерно-цитоплазма-тичне
 співвідношення – 264
цитоскелет – 281
 поверхневий – 294
цитостатик – 563
цитотомія – 542
цитофотометрія – 95

Шлях – 156

 конститутивний секре-
 торний – 156
 регульований секретор-
 ний – 156
 секреторний – 156
спиця – 318
шпора – 318

Ядерце – 382

 гранулярний компонент – 384
 фібрилярний центр – 384
 щільний фібрилярний
 компонент – 384
ядро – 333
 диплоїдне – 341
 еукаріотичне – 333
 поверхневий апарат – 342
 поліплоїдне – 342
явище насичення – 132
яйцеклітина – 274
 алецитальна – 275
 ізолецитальна – 275
 мезолецитальна – 275
 оліголецитальна – 275
 полілецитальна – 275
 телолецитальна – 275
 центролецитальна – 275

ІМЕННИЙ ПОКАЖЧИК

- Аббе Е. – 54, 65
Айглер Д. – 84
Альтман Р. – 53
Амічі Д. Б. – 50, 54
- Баранецький О. В. – 52
Барнет Р. – 57
Бейкер Р. Ф. – 55
Бенда К. – 53, 54
Бенш К. – 57
Бернар К. – 102, 226
Бетциг Е. – 60, 74
Бец В. – 58
Бідл Дж. – 24
Бінніг Г. – 57, 83
Блюм Дж. – 56
Бовері Т. Г. – 54
Бонанні Ф. – 49
Браше Ж. – 56
Бреннер С. – 24, 57
Брентон Х. Ч. – 56
Бріггс Р. – 591
Броун Р. – 50, 51
Бючлі О. – 52
- Валентин Г. – 51
ван Бенеден Е. – 52
ван Левенгук А. – 46, 47, 48
Вейсман А. – 589, 590
Віков В. Г. – 55
Вільямс Р. Г. – 55
Вірхов Р. – 39, 52, 529
- Гайдуков М. – 55
Галілей Г. – 45
Гаріссон Р. – 54
- Гейзер Е. – 52
Генле Я. – 51
Гердон Дж. – 591, 592, 609
Гертель К. Г. – 49
Глауерт А. М. – 56
Глауерт Р. Х. – 56
Гольджі К. – 54
Гоморі Г. – 56
Гордієнко В. М. – 60
Гортер Е. – 103
Горянінов П. – 51
Гофмейстер В. – 51
Грендел Ф. – 103
Грю Н. – 46, 49, 50
Гук Р. – 45, 46, 47, 51, 54
Гундлах Е. – 54
- Данієллі Л. – 103
Даусон Г. – 103
де Дюв К. – 56, 470, 482
Дівіні Є. – 49
Дреббель К. – 45
Дюмортьє Б. – 51
Дютроше А. – 51
- Евері О. – 23
Ейлер Л. – 49
Епінус Ф. Т. У. – 49
Ерліх П. – 54, 93, 236
- Жакоб Ф. – 24
- Зерніке Ф. – 55
Зігмонді Р. – 55
Зідентофф Г. Ф. – 55

- Івакін О. – 59
- Кадерша Н. – 56
Кадій Г. – 58
Кампані Дж. – 49
Каррель А. – 54
Касперсон Т. – 56
Кашенко М. – 58
Кінг Т. – 591
Клод А. – 55
Клуг А. – 15
Кноль М. – 55, 56
Крік Ф. – 23, 24
Кульпепер Е. – 49, 50
Кунс А. – 56
Кьолікер А. – 53
Кьоссель А. – 14
- Лебедєв О. О. – 55
Лекассан А. – 55
Ломінський Ф. – 59
- Майзель В. – 52
Мак-Карті М. – 23
Мак-Леод К. – 23
Мальпігі М. – 46
Маршалл Д. – 49, 50
Маттеї Г. – 24
Мернер В. Е. – 60, 74
Мечников І. І. – 54
Міллер С. – 9
Мінські М. – 57
Мішер Ф. – 14
Моль Г. – 51
Мольденгауер Д. – 48
Морган Т. – 586, 609
Мур Х. – 56
Мюреталер К. – 56
- Негеллі К. – 102
Нікольсон Дж. – 103
Ніренберг М. – 24
Нісль Ф. – 53
Новиков Б. Г. – 59
Номарський Е. – 57
Ньюбері С. – 57
- Овертон Е. – 102
Освальд В. – 103
- Палладе Дж. – 55, 409
Перемежко П. І. – 52, 59
Пізу П. – 55
Плессль Г. С. – 50
Пол Д. – 57
Портер К. Р. – 55, 56
Пуркінє Я. Е. – 50, 51
Пфеффер В. – 102
- Райф Р. – 55
Рамон-і-Кахаль С. – 54, 226
Ранв'є Л.-А. – 159
Распайль Ф.-В. – 53
Річ А. – 15
Робертіс Р. – 226
Робертсон Дж. – 56, 103
Ром Л. – 57
Рорер Г. – 57, 83
Россенбек Х. – 55
Ру В. – 589
Руска Е. А. – 55, 83
Руссов Е. – 52
- Сабатіні Д. – 57
Сваммердам Я. – 46
Сенгер С. – 103
Сінгер С. – 57
Скворцов І. – 54

Стир Л. М. – 56
Страсбургер Е. – 52

Такамацу Т. – 56
Татум Е. – 24
Тідеман І. Г. – 49
Тортоні К. – 49

Унгер Ф. – 51
Уотсон Дж. – 23

Фельген Р. – 55
Флеммінг В. – 52, 54
Фокс С. – 10
фон Ардене П. – 56
фон Ах Г. – 49
Фонтана Ф. – 48, 50
Фраунгофер Й. – 50
Фуллам Е. Ф. – 55

Хадорн Е. – 611
Хакслі Г. Е. – 55
Хартсекер Н. – 48
Хелль С. – 74
Херші Д. – 23
Холл К. – 57

Холлі Р. – 15
Хорн Д. – 57
Хржонцевський Н. – 58

Цейс К. – 54

Чаргафф Е. – 23
Чейз М. – 23
Чек Т. – 13
Чистяков І. Д. – 52

Шабадаш А. – 56
Шахов С. – 58
Швайцер Е. – 84
Шванн Т. – 41, 51, 52
Шестранд Ф. С. – 55
Шеррінгтон Ч. – 226
Шимонович В. – 58
Шлейден М. – 41, 51, 52
Шлейхер В. – 52
Шнейдер А. – 52
Шпеман Г. – 590, 591
Штурм І. Х. – 49

Янсен Г. – 45

ЗМІСТ

Список умовних скорочень.....	3
-------------------------------	---

ВСТУП.....	5
------------	---

Розділ 1. СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО ЕВОЛЮЦІЮ КЛІТИНИ

<i>(А. С. Пустовалов, Н. В. Скрипник, М. Е. Дзержинський)</i>	7
---	---

Від молекул до першої клітини	8
--	---

Формування зовнішньої мембрани як ключовий момент в еволюції клітинних форм	18
--	----

Від клітини прокаріотичної до еукаріотичної	25
--	----

Загальні принципи компартменталізації еукаріотичної клітини	30
--	----

Еволюційне походження мембранних органел	32
---	----

Запитання для самоперевірки.....	42
----------------------------------	----

Рекомендована література.....	43
-------------------------------	----

Розділ 2. МЕТОДИ ВИВЧЕННЯ КЛІТИН

<i>(А. С. Пустовалов, М. Е. Дзержинський)</i>	45
---	----

З історії вивчення клітин	45
--	----

Мікроскопічні методи дослідження клітин	60
--	----

Оптична мікроскопія.....	61
--------------------------	----

Електронна мікроскопія	76
------------------------------	----

Рентгенівська мікроскопія	79
---------------------------------	----

Сканувальна зондова (сканувальна силова) мікроскопія	81
--	----

Методи підготовки матеріалу для цитологічних досліджень. Методи дослідження клітин	87
---	----

Прижиттєві методи досліджень	87
------------------------------------	----

Методи роботи з фіксованим матеріалом	89
---	----

Цитохімічні методи дослідження.....	93
-------------------------------------	----

Імуногістохімічні методи дослідження	94
--	----

Методи кількісної оцінки	95
--------------------------------	----

Метод диференційного центрифугування	96
--	----

Використання фото-, кіно- й відеотехніки та комп'ютерних технологій.....	96
Запитання для самоперевірки.....	97
Рекомендована література.....	99

Розділ 3. СТРУКТУРА Й ФУНКЦІЇ БІОЛОГІЧНИХ МЕМБРАН

<i>(Н. В. Скрипник)</i>	101
Хімічний склад і загальні принципи організації біологічних мембран	102
Мембранні ліпіди.....	106
Мембранні білки.....	119
Принципи структурно-функціональної організації плазматичної мембрани еукаріотичної клітини	125
Мембранний транспорт	129
Проникність клітинних мембран.....	129
Пасивний транспорт.....	130
Активний транспорт.....	144
Везикулярний транспорт.....	153
Патологія плазматичної мембрани	157
Структурні патології плазмолеми.....	159
Функціональні патології плазмолеми.....	161
Запитання для самоперевірки.....	164
Рекомендована література.....	166

Розділ 4. ЗАГАЛЬНІ ПРИНЦИПИ МІЖКЛІТИННИХ ВЗАЄМОДІЙ

<i>(Н. В. Скрипник)</i>	167
Загальна структурно-функціональна характеристика позаклітинного матриксу	168
Основна речовина.....	170
Волокнистий компонент.....	175
Базальна мембрана.....	183

Основні механізми реорганізації та оновлення позаклітинного матриксу сполучних тканин	188
Клітинні контакти	190
Молекули адгезії та їхня участь у формуванні клітинних контактів	194
Замикальні з'єднання	216
Каналутворювальні з'єднання	220
Комунікаційні з'єднання	225
Патологія клітинних контактів	232
Запитання для самоперевірки	233
Рекомендована література	234
Розділ 5. ІНФОРМАЦІЙНІ МІЖКЛІТИННІ ВЗАЄМОДІЇ	
<i>(Г. В. Островська, Н. В. Скрипник)</i>	235
Типи надходження сигнальних молекул до клітин	239
Ендокринна сигналізація	239
Паракринна сигналізація	240
Синаптична сигналізація	240
Аутокринна сигналізація	242
Юкстакринна сигналізація	242
Клітинні рецептори та їхня участь у процесах міжклітинної сигналізації	243
Класифікація рецепторів	245
Рецептори ліпофільних сигнальних молекул	246
Рецептори клітинної поверхні (мембранні)	249
Патологія клітинних рецепторів	261
Запитання для самоперевірки	262
Рекомендована література	263
Розділ 6. ЦИТОЗОЛЬ. ВКЛЮЧЕННЯ	
<i>(І. М. Варенюк)</i>	264
Цитозоль	264
Хімічний склад цитозолю	265

Фізико-хімічні властивості цитозолу	266
Функціональне значення цитозолу.....	268
Включення	270
Класифікація включень за хімічною природою	270
Класифікація включень за функціональним призначенням	271
Найпоширеніші різновиди включень	273
Запитання для самоперевірки	279
Рекомендована література	280

Розділ 7. ЦИТОСКЕЛЕТ

<i>(І. М. Варенюк, М. Е. Дзержинський)</i>	281
Мікрофіламенти	281
Мікротрубочки	302
Центріолі	315
Війки та джгутики	320
Проміжні філаменти	323
Взаємодія елементів цитоскелета	326
Патологія цитоскелета	329
Запитання для самоперевірки	331
Рекомендована література	332

Розділ 8. ПРИНЦИПИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ ЕУКАРІОТИЧНОГО ЯДРА

<i>(Г. В. Островська)</i>	333
Функції еукаріотичного ядра	333
Загальноморфологічні особливості ядра	334
Форма ядра.....	336
Розташування ядра	339
Кількість ядер	340
Розміри ядер	341

Поверхневий апарат ядра	342
Ядерна оболонка	342
Хімічний склад ядерних мембран.....	343
Ядерна ламіна	345
Ядерно-поровий комплекс.....	348
Молекулярна організація спадкового апарату.....	351
Дезоксирибонуклеїнова кислота.....	351
Рибонуклеїнові кислоти	355
Реплікація ДНК.....	359
Репарація ДНК.....	362
Транскрипція РНК	364
Процесинг РНК.....	366
Хроматин і хромосоми.....	369
Морфологія мітотичних хромосом	373
Ядерце.....	382
Архітектура ядерця	384
Збирання і функціонування ядерцевого компартменту	386
Патологія ядра	389
Запитання для самоперевірки.....	396
Рекомендована література.....	399

Розділ 9. БІОСИНТЕЗ БІЛКА

<i>(О. К. Вороніна, А. С. Пустовалов, Л. М. Пазюк)</i>	400
Трансляційний апарат клітини	402
Властивості генетичного коду клітини.....	402
Активація амінокислот	405
Структура та принцип роботи рибосом.....	409
Трансляція мРНК.....	413
Ініціація трансляції.....	414
Елонгація трансляції.....	416
Термінація трансляції	418
Полірибосоми	418

Дозрівання білків	420
Фолдинг	420
Посттрансляційні модифікації білка	423
Термін життя білкової молекули	424
Запитання для самоперевірки	425
Рекомендована література	426
Розділ 10. ВАКУОЛЯРНА СИСТЕМА	
<i>(А. С. Пустовалов, Н. В. Скрипник, М. Е. Дзержинський)</i>	427
Ендоплазматична сітка	427
Гладенька ендоплазматична сітка	428
Гранулярна ендоплазматична сітка	435
Транспорт везикул від ЕПС до апарату Гольджі	456
Патологія ендоплазматичної сітки	457
Апарат Гольджі	460
Структура й функції апарату Гольджі	460
Зміни апарату Гольджі при патології	468
Лізосоми	469
Структура, функції та типи лізосом	469
Зміни лізосом при патології	473
Запитання для самоперевірки	478
Рекомендована література	480
Розділ 11. ПЕРОКСИСОМИ	
<i>(А. С. Пустовалов)</i>	482
Структура й функції пероксисом	482
Зміни пероксисом при патології	488
Запитання для самоперевірки	490
Рекомендована література	491
Розділ 12. СИСЕМИ	
ЕНЕРГОЗАБЕЗПЕЧЕННЯ КЛІТИН	
<i>(О. К. Вороніна, Л. М. Пазюк)</i>	492
Мітохондрії	494
Ультроструктурні особливості мітохондрій	496

Функції мітохондрій	505
Хондріом	512
Патологія мітохондрій.....	514
Пластиди	519
Хлоропласти	519
Лейкопласти	523
Хромoplastи	524
Функції хлоропластів (фотосинтез)	524
Запитання для самоперевірки	526
Рекомендована література.....	527

Розділ 13. ВІДТВОРЕННЯ КЛІТИН. КЛІТИННИЙ ЦИКЛ

<i>(Г. В. Островська)</i>	529
Клітинний цикл	531
Поділ клітини. Мітоз	537
Загальні події стадій мітозу.....	538
Динаміка мітотичного апарату в процесі мітозу	544
Регуляція клітинного циклу	553
Внутрішньоклітинна регуляція клітинного циклу	554
Родини циклінів і циклінозалежних кіназ	556
Патологія мітозу	562
Форми загибелі клітин	564
Апоптоз.....	565
Аутофагія	569
Програмований некроз	570
Онкогенез	572
Онкогенез і сигнальна трансдукція	574
Порушення генів супресорів пухлин.....	575
Порушення систем репарації ДНК.....	576
Порушення регуляції клітинного циклу.....	577
Відмінності у процесах поділу та їхній регуляції в нормальних і пухлинних клітинах.....	577

Біологія пухлини.....	579
Пухлинний ангиогенез.....	580
Віруси і рак.....	581
Запитання для самоперевірки.....	582
Рекомендована література.....	585
Розділ 14. ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ І РЕАКТИВНІ ЗМІНИ КЛІТИН	
<i>(С. М. Гарматіна)</i>	586
Диференційна активність генів	595
Загальні принципи генетичного контролю експресії генів	597
Рівень транскрипції (диференційна активність генів).....	598
Рівень трансляції.....	608
Посттрансляційний рівень.....	608
Диференціація клітин у ході індивідуального розвитку організму	609
Динамічна стійкість диференційованого стану	611
Запитання для самоперевірки.....	615
Рекомендована література.....	616
ПРЕДМЕТНИЙ ПОКАЖЧИК	617
ІМЕННИЙ ПОКАЖЧИК	628

Навчальне видання

ДЗЕРЖИНСЬКИЙ Микола Едуардович
СКРИПНИК Наталія В'ячеславівна
ПУСТОВАЛОВ Андрій Сергійович
та ін.

ЗАГАЛЬНА ЦИТОЛОГІЯ

Підручник

Редактор *В. Р. Філь*
Технічний редактор *Л. П. Шевченко*

Оригінал-макет виготовлено ВПЦ "Київський університет"



Формат 60×84^{1/16}. Ум. друк. арк. 37,2. Наклад 100 Зам. № 218-8921.
Гарнітура Times New Roman. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № Б10.
Підписано до друку 28.12.20

Видавець і виготовлювач
ВПЦ "Київський університет"

Б-р Тараса Шевченка, 14, Київ, 01601, Україна
☎ (38044) 239 32 22; (38044) 239 31 72; тел./факс (38044) 239 31 28
e-mail: vpc_div.chief@univ.net.ua, redaktor@univ.net.ua
<http://vpc.univ.kiev.ua>

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1103 від 31.10.02