**Материалы к практическим занятиям**

Исторический путь учения о клетке можно условно разделить на три этапа.

*Первый этап —* описательные наблюдения.

Размеры большинства клеток лежат в диапазоне 5—100 мкм, поэтому открытие и изучение клетки стало возможным только благодаря изобретению микроскопа. Первые микроскопы появились в начале XVII в.

Первооткрыватель клетки — английский естествоиспытатель Роберт Гук. Исследуя срезы пробки иод микроскопом собственной конструкции, on обратил внимание на то, что пробка состоит из отдельных ячеек, и назвал их «клетками» (1665).

Описания живых клеток (эритроцитов, сперматозоидов) и одноклеточных организмов (простейших) впервые были сделаны нидерландским натуралистом Антони ван Левенгуком (1676).

Открытие клеточного ядра связано с именем английского ботаника Роберта Броуна (1831).

*Второй этап —* создание классической клеточной теории.

В 1838—1839 гг. немецкие биологи Маттиас Шлейден и Теодор Шванн на основании обобщения накопленных в науке фактов и собственных наблюдений сформулировали клеточную теорию. Важный вклад в ее развитие внесли немецкие биологи Рудольф Вирхов и Роберт Ремак, которые установили, что ядро — главный и обязательный компонент клетки и что любая клетка происходит только из клетки.

Основные положения классической клеточной теории следующие:

* 1) все растительные и животные организмы состоят из однотипных структурных элементов — клеток;
* 2) клетки всех живых организмов сходны но своему строению и состоят из клеточной мембраны, цитоплазмы и ядра;
* 3) все клетки размножаются одинаковым путем — делением;
* 4) клетка представляет собой автономную структурную, функциональную единицу и единицу развития.

*Третий этап —* становление современной клеточной теории.

Основные положения современной клеточной теории следующие:

* 1) клетки растительных и животных организмов имеют общий план ультраструктуриой (субмикроскопической) организации;
* 2) размножение клеток осуществляется только путем деления исходной (материнской) клетки;
* 3) клетка представляет собой относительно автономную систему;
* 4) клеточный уровень является одним из уровней структурной организации живой материи;
* 5) клеточное строение всех представителей органического мира свидетельствует о единстве их происхождения в эволюции.

**Общая морфология клеток про- и эукариот. Клеточные включения (трофические, секреторные, специальные, минеральные и др.).**

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

**Включения цитоплазмы** — это необязательные компоненты клетки, появляющиеся и исчезающие в зависимости от интенсивности и характера обмена веществ в клетке и от условий существования организма. Включения имеют вид зёрен, глыбок, капель, вакуолей, гранул различной величины и формы. Их химическая природа очень разнообразна. В зависимости от функционального назначения включения объединяют в группы:

* трофические;
* [секреты](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D0%B5%D0%BA%D1%80%D0%B5%D1%86%D0%B8%D1%8F_%28%D1%84%D0%B8%D0%B7%D0%B8%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D1%8F%29);
* [пигменты](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D0%B8%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B5_%D0%BF%D0%B8%D0%B3%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D1%8B);
* [экскреты](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D0%BA%D1%81%D0%BA%D1%80%D0%B5%D1%82) и др.

Среди *трофических включений* (запасных питательных веществ) важную роль играют жиры и углеводы. Белки как трофические включения используются лишь в редких случаях (в яйцеклетках в виде желточных зерен).

*Пигментные включения* придают клеткам и тканям определенную окраску.

*Секреты* накапливаются в железистых клетках, так как являются специфическими продуктами их функциональной активности.

*Экскреты* — конечные продукты жизнедеятельности клетки, подлежащие удалению из неё.

**Органоиды клетки**

Органоиды, или Органеллы, – постоянные специфические структуры цитоплазмы, выполняющие определённые функции, необходимые для поддержания жизнедеятельности клетки.

Различают органоиды общего значения и специальные органоиды. Органоиды общего значения имеются во всех клетках и выполняют общие функции. Это – митохондрии, рибосомы, эндоплазматическая сеть, комплекс Гольджи, лизосомы, пероксисомы, цитоскелет и клеточный центр.

Органоиды специального значения имеются только в клетках какого-то определённого типа и обеспечивают выполнение функций, присущих только этим клеткам.

Мембранные органоиды:

- ядро;

- эндоплазматическая сеть;

- аппарат Гольджи;

- митохондрии;

- лизосомы;

- пластиды;

- вакуоли.

**Эндоплазматическая сеть** (ЭПС) открыта К. Портером в 1945 году. ЭПС или ЭПР (эндоплазматический ретикулум) – сеть канальцев и цистерн, сложенных мембранами. Различают гранулярную (шероховатую, зернистую) и гладкую (агранулярную) ЭПС.

Гранулярная ЭПС содержит рибосомы на наружной стороне мембраны. Гладкая ЭПС не содержит рибосомы. В скелетных мышцах ЭПС носит название саркоплазматический ретикулум. ЭПС пронизывает всю клетку. Полость ЭПС сообщается с ядром и цитоплазматической мембраной.

На рибосомах гранулярной ЭПС синтезируются секреторные белки, предназначенные для выведения из клетки, а также белки лизосом и внеклеточного матрикса.

Наряду с секреторными белками на гранулярной ЭПС синтезируется большая часть полуинтегральных и интегральных белков. В гладеой ЭПС происходит также синтез мембраны липидов и осуществляется «сборка» компонентов мембраны.

Кроме того, ЭПС, как считают, участвует в образовании пероксисом. Таким образом, гранулярная ЭПС служит «фабрикой» мембран для плазмалеммы, аппарата Гольджи, лизосом и других мембранных структур клетки.

Агранулярная (гладкая) эндоплазматическая сеть представляет собой замкнутую сеть трубочек, канальцев, цистерн. На цитоплазматической поверхности гладкой ЭПС синтезируются жирные кислоты, большая часть липидов клетки, в том числе почти все липиды, необходимые для построения клеточных мембран. Поэтому гладкую ЭПС нередко называют «фабрикой липидов». Например, в клетках печени с мембранами гладкого эндоплазматического ретикулума связан фермент, обеспечивающий образование глюкозы из глюкозо-6-фосфата. Эта реакция имеет большое значение в поддержании уровня глюкозы в организме человека.

В организме человека эндоплазматическая сеть особенно хорошо развита в клетках, синтезирующих гормоны, в клетках печени.

Комплекс Гольджи (КГ, или аппарат Гольджи, – пластинчатый комплекс, расположен вблизи ядра, между ЭПС и плазмалеммой. Его структурно-функциональная единица – диктиосома – представляет собой стопку из 5–20 плоских одномембранных мешочков (цистерн), имеющих диаметр около 1 мкм, внутренние полости которых не сообщаются друг с другом. Количество таких мешочков в стопке обычно не превышает 5–20, а расстояние между ними составляет 20–25 нм.

Белки, синтезированные на шероховатой эндоплазматической сети, попадают в аппарат Гольджи. Здесь осуществляется химическая модификация транспортируемых белков и их упаковка в специальные пузырьки.

Таким образом, основными функциями комплекса Гольджи являются химическая модификация, накопление, сортировка, упаковка в секреторные пузырьки и транспорт по назначению белков и липидов, синтезированных в ЭПС.

В комплексе Гольджи образуются лизосомы и синтезируются некоторые полисахариды.

Лизосомальная система и пероксисомы

Лизосомы – мембранные органеллы клеток животных и грибов, содержащие гидролитические ферменты и осуществляющие гидролитическое расщепление макромолекул (внутриклеточное пищеварение). Лизосомы представляют собой окружённые одинарной мембраной пузырьки, размеры которых в клетках животных колеблются от 0,2 до 0,5 мкм. В лизосомах содержится не менее 60 гидролитических ферментов, которые расщепляют все основные классы органических макромолекул.

Все ферменты лизосом активны лишь в кислой среде при значениях pH, близких 5,0. Количество лизосом в разных клетках варьирует от единичных до нескольких сотен, как например, в фагоцитах.

Завершающие этапы процесса внутриклеточного переваривания веществ, поглощённых клеткой, осуществляются в лизосомах.

Лизосомы с помощью своих ферментов могут разрушать не только отдельные органеллы или клетки, но и целые органы (автолиз). Например, в процессе онтогенеза лягушки с помощью ферментов лизосом лизируются хвост и жабры головастика, а образующиеся при этом продукты распада используются для формирования органов взрослого животного.

Митохондрии – крупные мембранные органоиды клетки, которые можно различить в световой микроскоп. Митохондрии присутствуют во всех эукариотических клетках человека, кроме эритроцитов.

Они имеют обычно округлую, удлиненную или нитевидную формы. Количество митохондрий в клетке колеблется в широких пределах (от 1 до 100 тыс. и более) и зависит от потребностей клетки в энергии. Митохондрии имеют наружную и внутреннюю мембраны.

На внутренней поверхности увеличенного фрагмента кристы видны небольшие выпуклости, обращенные в митохондриальный матрикс, которые содержат ферментные системы, обеспечивающие процессы дыхания. Наружная мембрана гладкая и по своему составу сходна с плазмалеммой.

В матриксе содержатся кольцевая молекула митохондриальной ДНК (мтДНК), различные включения, а также молекулы мРНК, транспортной РНК (тРНК) и рибосомы, сходные по строению с рибосомами бактерий. Здесь же располагаются ферменты, превращающие пируват и жирные кислоты в ацетил-КоА, и ферменты реакций цикла Кребса.

Митохондриальная ДНК имеет не линейную, как в хромосомах ядра, а кольцевую форму. Главная функция митохондрий – синтез АТФ, основного источника энергии для обеспечения жизнедеятельности клетки. Поэтому митохондрии называют «энергетическими станциями» клетки.

Пластиды

Пластиды – это органоиды клеток растений и некоторых фотосинтезирующих простейших. У большинства животных и грибов пластид нет.

Пластиды делятся на несколько типов: хлоропласты, хромопласты, лейкопласты. Наиболее важный и известный – хлоропласт, содержащий зелёный пигмент хлорофилл, который обеспечивает процесс фотосинтеза.

Все виды пластид связаны между собой общим происхождением или возможным взаимопревращением. Пластиды развиваются из пропластид – более мелких органоидов меристематических клеток.

Строение пластид

Пластиды относятся к двумембранным органоидам, у них есть внешняя и внутренняя мембраны.

Во многих пластидах, особенно в хлоропластах, хорошо развита внутренняя мембранная система, формирующая такие структуры, как тилакоиды, граны (стопки тилакоидов), ламелы – удлинённые тилакоиды, соединяющие соседние граны. Внутреннее содержимое пластид обычно называют стромой. В ней, помимо прочего, находятся крахмальные зёрна.

Считается, что в процессе эволюции пластиды появились аналогично митохондриям – путём внедрения в клетку-хозяина другой прокариотической клетки, способной в данном случае к фотосинтезу. Поэтому пластиды считают полуавтономными органеллами. Они могут делиться независимо от делений клетки, у них есть собственная ДНК, РНК, рибосомы прокариотического типа, т. е. собственный белоксинтезирующий аппарат. Часть генов, управляющая их функционированием, находится как раз в ядре.

Ядро

Ядро – важнейшая часть эукариотической клетки. Оно состоит из ядерной оболочки, кариоплазмы, ядрышек, хроматина.

1. Ядерная оболочка по строению аналогична клеточной мембране, содержит поры. Ядерная оболочка защищает генетический аппарат от воздействия веществ цитоплазмы. Осуществляет контроль за транспортом веществ.

2. Кариоплазма представляет собой коллоидный раствор, содержащий белки, углеводы, соли, другие органические и неорганические вещества. В кариоплазме содержатся все нуклеиновые кислоты: практически весь запас ДНК, информационные, транспортные и рибосомальные РНК.

3. Ядрышко – сферическое образование, содержит различные белки, нуклеопротеиды, липопротеиды, фосфопротеиды. Функция ядрышек – синтез зародышей рибосом.

4. Хроматин (хромосомы). В стационарном состоянии (время между делениями) ДНК равномерно распределены в кариоплазме в виде хроматина. При делении хроматин преобразуется в хромосомы.

Функции ядра: в ядре сосредоточена информация о наследственных признаках организма (информационная функция); хромосомы передают признаки организма от родителей к потомкам (функция наследования); ядро согласует и регулирует процессы в клетке (функция регуляции).

Морфология ядерных структур

Термин «ядро» впервые был применен Брауном в 1833 г. для обозначения шаровидных постоянных структур в клетках растений. Позднее такую же структуру описали во всех клетках высших организмов.

Ядро выполняет две группы общих функций: первая связана с хранением генетической информации, другая - с реализацией генетической информации, с обеспечением синтеза белка.

В первую группу входят функции, осуществляющие поддержание наследственной информации в виде неизменной структуры ДНК. Они связаны с наличием репарационных ферментов, ликвидирующих спонтанные повреждения молекулы ДНК (разрыв одной из цепей ДНК), что сохраняет строение молекул ДНК практически неизменным в ряду поколений клеток. Кроме этого, в ядре происходит воспроизведение или редупликация и разъединение (сегрегация) молекул ДНК, что дает возможность двум клеткам получить совершенно одинаковые генетической информации, а во время мейоза - изменения и рекомбинации генетического материала (кроссинговер). И, наконец, при делении клеток ядра непосредственно участвуют в процессах распределения молекул ДНК.

Другой группой ядерных фукций является создание клеточного аппарата белкового синтеза. Сюда относятся синтез, транскрипция, на молекулах ДНК разных информационных, трансферных и рибосомных РНК, «созревание» (процессинг, сплайсинг) первичных транскриптов, образование субъединиц рибосом путем объединения синтезированных в ядрышке рибосомных РНК с рибосомными белками, которые синтезируются в цитоплазме и переносятся в ядро. Выпадение или нарушение любой из перечисленных выше функций ведет к патологии или гибели клетки в целом. Например, нарушение редупликации ДНК приводит к остановке размножения клеток или к появлению клеток с неполноценным набором генетической информации, что тоже гибельно для клеток и т.д..

Все это указывает на ведущее значение ядерных структур в процессах, связанных с синтезом нуклеиновых кислот и белков – основных функционеров в жизнедеятельности клетки.

Вместе с тем следует отметить, что функционирование ядра как системы хранения и реализации генетической информации неразрывно связано, с другими функциональными системами клетки, которые обеспечивают работу ядра специальными белками, потоком предшественников, энергией и др.

***Ядерные компоненты прокариот.***Прокариотических клетки, как отмечалось ранее, не имеют обособленного клеточного ядра. Но у всех прокариотических клеток есть аналог ядра эукариот, которому дали название нуклеоид или нуклеоплазма. Нуклеоиды бактерий на 80% состоят из ДНК, их выделяют, состав и структура изучены довольно подробно, кроме ДНК из них выделяют различные белки (20%) и РНК.

В прокариотических клетках количество ДНК существенно меньше, чем в клетках эукариот. Так, бактерия E. coli содержит 5 х 10-3 пг\* ДНК, кодирующая около 2000 генов, в ядре клетки человека содержится около 6 пг ДНК, что соответствует 100 000 генам.

Бактериальные ДНК представляют собою замкнутые кольца, у E. coli периметр такого кольца составляет около 1,6 мм, и полагают, что на клетку приходится одна гигантская циклическая молекула ДНК (одна бактериальная хромосома) с молекулярной массой 4 х 109 Д. Самая маленькая хромосома у прокариот установлена в клетках микоплазмы – 0,25 мм (для сравнения, длина ДНК на одну хромосому эукариотической клетки, например, у человека составляет 40 мм в 1 хромосоме).

(\* Единицы измерения ДНК: пг – 1 х 10-12г; Да – 1,67-24г; 1 нуклеотидная пара (н.п.) – 1 х 103 Д, величина н.п. ~ 0,34 нм) .

Далее следует добавить, что у B. subtilis имеется от 2 до 9 одинаковых молекул ДНК и соответственно несколько нуклеоидов, у Azotobacter vinelandii - около 40 хромосом организованы в один нуклеоид.

Было также показано, что репликация кольцевой хромосомы у E. coli начинается на одной исходной точке репликации, при этом образуются две репликационные вилки, которые по мере синтеза ДНК движутся вдоль молекулы до конечной точки. Вся гигантская молекула ДНК представляет единицу репликации, репликон. Скорость репликации у бактерий составляет около 30 мкм в минуту и согласуется со временем удвоения клеток равным около 40 мин.

В зоне старта синтеза ДНК всегда связана с плазматической мембраной через специфические мембранные белки, которые взаимодействуют с ней. В процессе клеточного деления существенных изменений в компактности нуклеоплазмы не отмечается.

Кольцевые молекулы ДНК бактерий были получены при полном удалении белков (депротеинизация). Выделенные целые нуклеоиды бактерий представляют собой тела, состоящие из многочисленных суперспирализованных петель ДНК, отходящих от плотной центральной области. В одну такую петлю или домен входит до 10-15 мкм ДНК, или около 40 000 н.п., а всего таких петель – около 120.

Компактизация нуклеоида обусловлена наличием связок, содержащих РНК и белки. Хромосома (гигантская кольцевая молекула) с помощью РНК и белков многократно складывается, образует многочисленные петли, ДНК которых подвергается сверхспирализации, что приводит к компактизации всего комплекса и образованию нуклеоида. Степень компактизации ДНК в нуклеоиде бактерий достигает 1000 крат, а концентрация ДНК доходит до 10 мг/мл. Необходимо подчеркнуть, что часть ДНК нуклеоида связана с небольшим числом специальных основных белков, отличных от гистонов эукариот. Одна молекула одного из таких белков (H-NS) приходится на 400 н.п. ДНК. С петлями ДНК нуклеоида связано большое число молекул различных синтезируемых РНК и рибосом, которые располагаются по периферии нуклеоплазмы. Поэтому предполагается, что центральная его часть представлена неактивной и сверхспирализованной ДНК, тогда как по его периферии расположены деспирализованные петли, на которых происходит синтез различных РНК.

Отличительным моментом ядерных структур прокариот является то, что у них синтез РНК и синтез белка происходит одновременно: рибосомы связываются с еще не до конца синтезированными молекулами иРНК и производят на них синтез белка. Благодаря этому возникает тройственный синтетический комплекс: ДНК – синтезирующая цепь РНК – рибосомы с синтезируемой полипептидной цепочкой. Данная ситуация возможна лишь в тех случаях, когда образующаяся молекула иРНК не подвергается дальнейшей модификации типа процессинга, характерного для эукариотических клеток. У прокариотов процессы транскрипции и трансляции не разобщены территориально как у эукариотических клеток где эти процессы протекают в двух разных частях клетки, разделенных специальной ядерной оболочкой.

Поведение ядерного материала прокариотов отличается от такового эукариот при делении клетки и в течение клеточного цикла.

Клеточный цикл – это время существования клетки от деления до деления. Как уже указывалось, деление всех типов клеток происходит после удвоения ДНК. У бактерий часто цитотомия не связана с окончанием синтеза ДНК. В связи с этим до наступления клеточного деления может начаться второй или даже третий раунд репликации ДНК. В результате такого беспрерывного синтеза ДНК каждая дочерняя клетка сразу после деления уже содержит частично реплицированный геном.

При делении бактериальных клеток не наблюдается существенной конденсации ДНК в составе нуклеоида. По мере роста клетки в длину зона нуклеоида после синтеза ДНК увеличивается, а затем делится с помощью специального механизма. Обособление и разъединение двух дочерних хромосом связано с расхождением мест прикрепления хромосом к плазматической мембране.

***Ядро эукариотических клеток.***Ядерный аппарат эукариотических клеток имеет ряд отличий от прокариотических. Во-первых, ДНК-содержащий компонент отделен от цитоплазмы ядерной оболочкой, во-вторых, количество ДНК в ядах эукариот в тысячи раз больше, чем в составе нуклеоидов бактерий, в-третьих, ДНК эукариот представляет собой сложный нуклеопротеидный комплекс, образующий специальную структуру – хроматин, из которого и состоят эукариотические хромосомы.

В состав ядер эукариот входят несколько физически не связанных друг с другом хромосом, каждая из которых содержит одну линейную гигантскую молекулу ДНК. Каждая хромосомная ДНК полирепликонна, т.е. содержит множество автономно реплицирующихся участков. Синтез и образование транскриптов эукариотических клеток происходит после их вторичной перестройки или «созревания», включающих в себя как фрагментацию (процессинг), так и сращивание отдельных фрагментов ДНК (сплайсинг). И наконец, в эукариотических клетках процессы синтеза ДНК и РНК разобщены от процесса синтеза белков.

Клеточное ядро состоит из ядерной оболочки, отделяющей его от цитоплазмы, хроматина, ядрышка и других продуктов синтетической активности, ядерного белкового остова (матрикса) и кариоплазмы (или ядерного сока). Эти компоненты встречаются практически во всех неделящихся эукариотических клетках одно- или многоклеточных организмов.

Главный компонент ядер, хроматин, является структурой, выполняющей генетическую функцию клетки, в хроматиновой ДНК заложена практически вся генетическая информация. Ядерная оболочка выполняет сложную барьерно-рецепторную, а также транспортную и каркасную функцию. Нехроматиновый ядерный белковый остов (матрикс) обеспечивает не только пространственное расположение хромосом в ядре, но и участвует в их функциональной активности. Одним из хромосомных участков, определяющих синтез рРНК и образование клеточных рибосом, является ядрышко. Кроме того в ядре в связи с хроматином и матриксом обнаруживаются различные рибонуклеопротеидные структуры, содержащие разные типы РНК. Между всеми этими компонентами заключена жидкая фаза клеточного ядра, кариоплазма, в которой протекают многие процессы, связанные как с ядерным метаболизмом, так и с внутриядерным транспортом белков и РНК.

При наблюдении многих живых клеток, особенно растительных или же клеток после фиксации и окраски, внутри ядра выявляются зоны плотного вещества, которое хорошо воспринимает разные красители, особенно основные. Благодаря такой способности хорошо окрашиваться этот компонент ядра и получил название «хроматин» (Флемминг, 1880). Способность хроматина воспринимать основные (щелочные) красители указывает на его кислотные свойства, которые определяются тем, что в состав хроматина входит ДНК в комплексе с белками. Такими же свойствами окрашиваемости и содержанием ДНК обладают и хромосомы, которые можно наблюдать во время митотического деления клеток.

В отличие от прокариотических клеток, ДНК-содержащий материал хроматина эукариот, может пребывать в двух паротивоположных состояниях: деконденсированном в интерфазе и в максимально уплотненном в составе митотических хромосом.

В неделящихся (интерфазных) клетках хроматин равномерно заполняет объем ядра или же располагаться отдельными сгустками (хромоцентры). Он особенно четко выявляется на периферии ядра (пристеночный, маргинальный, примембранный хроматин) может образовывать подобие внутриядерной сети переплетения внутри ядра из довольно толстых (около 0,3 мкм) и длинных тяжей. Такие ядра наиболее часто встречаются в клетках растений.

Хроматин интерфазных ядер – это несущие ДНК тельца (хромосомы), которые теряют в это время свою компактную форму, разрыхляются или деконденсируются. Деконденсация хромосом в ядрах разных клеток может быть различной. Полностью деконденсированные хромосомы или их участки называют диффузным хроматином. При неполном разрыхлении хромосом в интерфазном ядре видны участки конденсированного хроматина или так называемого гетерохроматина. Степень деконденсации хромосомного материала, хроматина, в интерфазе отражает функциональную нагрузку этой структуры. Чем более дифффузен хроматин интерфазного ядра, тем выше в нем синтетические процессы. Например, в эритроцитах низших позвоночных практически весь хроматин ядер находится в конденсированном состоянии, и в ядрах не происходит синтеза ни РНК, ни ДНК. Если же ядра этих клеток простимулировать к синтезу РНК, то они переходят в диффузное состояние.

В максимально конденсирован состоянии хроматин наблюдается в хромосомах во время митоза. В этот период хромосомы не несут никаких синтетических нагрузок и в них не происходит синтеза ДНК и РНК. На этом основании считают, что хромосомы клеток могут находиться в двух структурно-функциональных состояниях: в рабочем, частично или полностью деконденсированном, когда с их участием в интерфазном ядре происходят процессы транскрипции и редупликации, и в неактивном – в состоянии метаболического покоя при максимальной их конденсации, когда они выполняют функцию распределения и переноса генетического материала в дочерние клетки.

***Эухроматин и гетерохроматин.***Многими исследователями показано, что конденсация хроматина в интерфазных ядрах может быть выражена в разной степени. Например, в интенсивно делящихся и в мало специализированных клетках ядра имеют диффузную структуру и в них встречается в виде узкого периферического ободка и небольшого числа мелких хромоцентров конденсированный хроматин. В клетках высокоспециализированных, в клетках, заканчивающих свой жизненный цикл, хроматин обнаруживается в виде крупных периферического слоя, хромоцентров или блоков конденсированного хроматина. Такую структуру имеют, например, ядра зрелых лейкоцитов. Эти примеры подчеркивают правило: чем больше в ядре доля конденсированного хроматина, тем меньше метаболическая активность ядра.

Однако из этого правила есть исключение. Оказывается при метаболической активации не всякие участки конденсированного хроматина могут переходить в диффузную форму. В интерфазных ядрах существуют постоянные участки конденсированного хроматина, наличие которого не зависит от степени дифференцированнности ткани или от функциональной активности клеток.

Данные участки получили название гетерохроматина, в отличие от остальной массы хроматина – эухроматина (собственно хроматина). Они никогда не теряют своего особого конденсированного состояния. К ним относятся, прежде всего, центромерные и теломерные участки хромосом. Кроме них постоянно конденсированными находятся некоторые участки в составе плечей хромосом. Им дали название вставочного или интеркалярного гетерохроматина, который в ядрах представлен в виде хромоцентров.

Такие постоянно конденсированные участки хромосом в интерфазных ядрах называют конститутивным (постоянным) гетерохроматином. Участки конститутивного гетерохроматина обладают целым рядом особенностей, которые отличают его от остального хроматина. Конститутивный гетерохроматин генетически не активен, он не транскрибируется, реплицируется он позже всего остального хроматина, в его состав входит особая (сателлитная) ДНК, обогащенная высокоповторяющимися последовательностями нуклеотидов; он локализован в центромерных, теломерных и интеркалярных зонах митотических хромосом. Доля конститутивного хроматина может быть неодинаковой у разных объектов. Так у млекопитающих на него приходится 10-15% всего генома, а у некоторых амфибий – даже до 60%. Предполагается, что он несет ряд важных функций, связанных со спариванием гомологов в мейозе, со структуризацией интерфазного ядра, выполняет некоторые регуляторные функции.

Вся остальная, основная масса хроматина ядра может менять степень своей компактизации в зависимости от функциональной активности, она относится к эухроматину. Эухроматические неактивные участки, которые находятся в конденсированном состоянии, стали называть факультативным гетерохроматином, подчеркивая необязательность такого его состояния. Примером факультативного гетерохроматина служит X-хромосома в организме человека. В клетках мужской особи X-хромосома деконденсирована, она активна, транскрибируется и морфологически не выявляется из-за своего рыхлого, диффузного состояния. В клетках женского организма, где присутствуют две X-хромосомы, одна из них находится в активном, диффузном состоянии, а вторая – в неактивном, конденсированном, она временно гетерохроматизована.

В высоко дифференцированных клетках около 10% генов находятся в активном состоянии, остальные гены – в неактивном и находятся в составе конденсированного факультативного гетерохроматина. В таблице 1. показаны сравнительные характеристики эухроматических и гетерохроматических районов интерфазных хромосом.

Хромосомный цикл. Половые женские и мужские клетки имеют одинарный набор хромосом и содержат в 2 раза меньше ДНК, чем все остальные клетки организма, поэтому половые клетки (сперматозоиды и ооциты) с одинарным набором хромосом называются гаплоидными. Плоидность обозначают буквой n и как результат этого, клетки с 1n – гаплоидны, с 2n – диплоидны, с 3n – триплоидны и т.д. Соответственно количество ДНК на клетку (с) зависит от ее плоидности. В результате оплодотворения происходит слияние двух клеток, каждая из которых несет 1n набор хромосом, поэтому образуется исходная диплоидная (2n, 2c) клетка или зигота. При дальнейшем делении диплоидной зиготы развивается организм, клетки которого, кроме половых, диплоидны.

Процессу деления клеток, как известно, предшествует фаза синтеза, редупликации ДНК, что приводит к появлению клеток с 4с количеством ДНК, у которых количество хромосом 4n, т.е. в два раза больше, чем у исходной диплоидные клетки. После деления тетраплоидной (4с) клетки снова возникают две исходные диплоидные клетки.

Хромосомы как четкие, плотные, хорошо видимые в световой микроскоп тела выявляются только незадолго перед клеточным делением. В интерфазе хромосом в виде плотных тел не видно, так как они находятся в разрыхленном состоянии. В интерфазе происходит удвоение или редупликация хромосом.

В этот период происходит синтез ДНК, поэтому он называется синтетическим, или s-периодом. В этот период в клетках удваивается количество ДНК. После завершения s-периода количество ДНК в интерфазном ядре равно 4с. Вместе с тем зарегистрировать удвоение числа хромосом на этой стадии не всегда возможно, поэтому хромосомы как нитевидные плотные тела обнаруживают с помощью микроскопа в профазе митоза, то есть в начале процесса деления клетки. Подсчет числа хромосом в профазе свидетельствует, что их количество равно 2n. Но на самом деле в профазе каждая из хромосом двойная в результате их редупликации. На этой стадии пары хромосом тесно соприкасаются друг с другом и взаимно спирализуются, поэтому в микроскоп не видна двойственность их структуры. Позднее хромосомы в каждой такой паре начинают обосабливаться, раскручиваться и в конце профазы видно, что число хромосом в делящейся клетке равно 4n. Из этого следует, что в митоз хромосомы вступают в виде двух сестринских хромосом, или хроматид.

Далее, в метафазе, сестринские хромосомы остаются связанными друг с другом в виде пары. В этой стадии они выстраиваются в экваториальной плоскости клетки, и здесь происходит их окончательное разъединение. Как в профазе, так и в метафазе клетки тетраплоидны.

В следующей стадии – анафазе - хроматиды каждой хромосомы расходятся к противоположным полюсам клетки, после чего начинает делиться тело исходной клетки. Затем в телофазе разошедшиеся диплоидные (2n) наборы хромосом начинают деконденсироваться и терять свои четкие очертания. На этом заканчивается один хромосомный цикл и начинается следующий.

Общая морфология митотических хромосом. Хромосомы всех эукариотических клеток имеют общее строение. Они состоят из трёх основных частей: центромеры, собственно тело хромосомы (плечо), теломеры (конечный участок). Хромосомы животных и растений представляют собой палочковидные структуры разной длины, как правило, с постоянной толщиной, обычно имеющие два хромосомных плеча, соединенных в зоне центромеры. Зона называется первичной перетяжкой. Оба плеча хромосомы оканчиваются теломерами. Хромосомы с равными или почти равными плечами называют метацентрическими, с плечами неодинаковой длины – субметацентрическими. Палочковидные хромосомы с очень коротким вторым плечом – акроцентрические.

В области первичной перетяжки (центромеры) расположен кинетохор – дискообразная пластинчатая структура. От кинетохора подходят пучки микротрубочек митотического веретена, идущие в направлении к центриолям. Пучки микротрубочек необходимы для обеспечения передвижения хромосом к полюсам клетки при митозе.

Обычно каждая хромосома имеет только одну центромеру (моноцентрические хромосомы), но встречаются хромосомы (дицентрические, полицентрические) со множественными кинетохорами.

В зоне первичной перетяжки находится центромерная или сателлитная ДНК, отличающаяся большим количеством повторенности нуклеотидных последовательностей.

Отдельные хромосомы имеют вторичную перетяжку. Обычно она располагается вблизи дистального конца хромосомы и отделяет маленький участок или спутник. Вторичные перетяжки называют еще ядрышковыми организаторами, так как именно на этих участках хромосом в интерфазе происходит образование ядрышка. В зоне вторичной перетяжки локализуется ДНК, ответственная за синтез рРНК. В хромосомах человека ядрышковые организаторы расположены в коротких плечах вблизи центромер.

Плечи хромосом оканчиваются конечными участками или теломерами, которые не способны соединяться с другими хромосомами или их фрагментами, в отличие от концов хромосом, лишенных теломерных участков (в результате разрывов), которые могут присоединяться к таким же разорванным концам других хромосом. В теломерах локализована теломерная ДНК, защищающая хромосому от укорачивания в процессе синтеза ДНК.

Размеры хромосом у разных организмов варьируют в широких пределах, и их длина может колебаться от 0,2 до 50 мкм. Самые мелкие хромосомы обнаруживают у некоторых простейших, грибов, водорослей, очень мелкие хромосомы – у льна; они настолько малы, что почти не видны в световой микроскоп. Самые длинные хромосомы описаны у прямокрылых насекомых, у амфибий и у лилейных. Длина хромосом человека установлена в пределах 1,5-10 мкм.

Число хромосом характерно для каждого вида животных и растений. Рекордсменом среди растений по их числу является папоротник ужовник (около 500), 308 хромосом у тутового дерева, у речного рака 196 хромосом. Наименьшее количество хромосом обнаружена у одной из рас аскариды (1 хромосома на гаплоидный набор).

Совокупность числа, величины и морфологии хромосом называется кариотипом вида. Кариотип – лицо вида. Все клетки индивидуумов одного вида имеют идентичные наборы хромосом. Морфологический анализ убедительно показывает различия в кариотипах даже у близких видов, поэтому структура кариотипа является таксономическим (систематическим) признаком, который используется в систематике животных и растений.

В практике хромосомного анализа широко используют метод дифференциального окрашивания хромосом, который разработал Касперссон. Оказалось, что после обработки препаратов митотических хромосом акрихинипритом на них видна поперечная исчерченность по длине хромосом. В хромосомах видны поперечные светящиеся полосы («бэнды») (Q– полосы, Q–окраска), расположение которых характерно для каждой хромосомы.

В результате дифференциальной окраски появилась возможность детально изучить строение хромосом человека. Весь набор из 46 хромосом человека подразделяют по их размерам на 7 групп (A, B, C, D, E, F, G). Окрашивание позволяет не только отличить крупные (1, 2) хромосомы от мелких (19, 20), метацентрические от акроцентрических (13-я), но и внутри групп различить одну хромосому от другой. Например, в группе C 6-я и 7-я хромосомы не только схожи между собой, но и с X-хромосомой. Благодаря окрашиванию хромосомы не только стали четко отличать друг от друга, но в сочетании с генетическими наблюдениями это позволило начать составлять хромосомные карты человека (находить места расположения генов на участках хромосом).

Наблюдения свидетельствуют, что избирательное окрашивание хромосом связано с локализацией так называемого гетерохроматина, ДНК которого обогащена A- и T-основаниями.

Клеточный цикл эукариот. Эукариотические клетки удваивают число своих хромосом в результате синтеза ДНК задолго до цитотомии. Как правило время протекания клеточного цикла у эукариот значительно больше времени клеточного цикла прокариот. Если у бактерий время от деления до деления клетки составляет 20-30 мин., то у одноклеточной эукариотической инфузории туфелька клеточный цикл занимает уже 10-20 часов, у амебы - около 1,5 суток, у многоклеточных организмов - около 1 суток.

Клетки многоклеточных организмов обладает разной способностью к делению. В организме высших позвоночных имеются клетки полностью потерявшие свойство делиться: это большей частью специализированные, дифференцированные клетки (например, клетки центральной нервной системы, кардиомиоциты, клетки хрусталика глаза). В организме есть постоянно обновляющиеся ткани (различные эпителии, кровь, клетки рыхлой и плотной соединительных тканей). В этом случае в таких тканях существует часть клеток, которые постоянно делятся (например, клетки базального слоя покровного эпителия, клетки крипт кишечника, кроветворные клетки костного мозга и селезенки), заменяя отработавшие или погибающие клеточные типы. Многие клетки, не размножающиеся в обычных условиях, приобретают вновь это свойство при процессах репаративной регенерации органов и тканей.

У растительных организмов встречаются примерно такие же типы клеток по способности их вступать в деление. Это камбиальные клетки, дающие начало различным органам и тканям, клетки интенсивно делящиеся, это клетки, возобновляющие деление при регенерации, это дифференцированные клетки, потерявшие в естественных условиях способность делиться.

Клетки животных и растений, так же как одноклеточные эукариотические организмы, вступают в процесс деления после ряда подготовительных процессов, важнейшим из которых является синтез ДНК.

Весь смысл клеточного деления заключается в равномерном распределении редуплицированного генетического материала по двум новым клеткам.

Исследования показали, что синтез ДНК происходит только в интерфазе, которая состоит из пресинтетического периода или G1–периода, отрезка времени, предшествующего началу синтеза ДНК. За ним следует синтетический период или S-период, в котором происходит синтез ДНК. Время от завершения синтеза ДНК и до начала митоза – это время интерфазы после S-периода, постсинтетический период или G2–период. В итоге весь клеточный цикл состоит как бы из четырех отрезков времени: собственно митоз (М), пресинтетический (G1), синтетический (S) и постсинтетический (G2) периоды интерфазы. Общая продолжительность не только клеточного цикла, но и отдельных его периодов у разных организмов значительно варьируют.

Различные периоды клеточного цикла отличаются друг от друга по общему содержанию в клетках белка, ДНК и РНК и интенсивности их синтеза.

В G1-периоде клетки имеют диплоидное содержание ДНК на ядро (2с), в S-периоде содержание ДНК колеблется от 2с до 4с, в G2-периоде содержание ДНК соответствует тетраплоидному.

Количество РНК в интенсивно делящихся клетках в течение интерфазы увеличивается как минимум в 2 раза. После митоза в пресинтетический период (G1) дочерние клетки поступают по общему содержанию белков и РНК вдвое меньшие, чем исходная родительская клетка. В этот период начинается рост клеток за счет накопления клеточных белков, что определяется увеличением количества РНК на клетку. В связи с тем, что в течение всего митоза (от поздней профазы до средней телофазы) в клетке синтез РНК не происходит, поэтому накопление клеточных белков и РНК связано с синтезом РНК в начале нового клеточного цикла. В S-периоде уровень синтеза РНК возрастает соответственно увеличению количества ДНК и достигает своего максимума в середине G2-периода. В конце G2-периода или в профазе синтез РНК резко падает по мере конденсации митотических хромосом и снова полностью прекращается во время митоза.

Синтез белка во время митоза падает до 25% от исходного уровня и затем в последующих периодах достигает своего максимума в G2-периоде, в общем повторяя характер синтеза РНК.

Отдельные периоды интерфазы отличаются друг от друга не только общим содержанием и активностью синтезов ДНК, РНК и белка, но и характером синтезируемых РНК и белков.

Регулярное повторение последовательности клеточных циклов наблюдают во время роста клеток культуры ткани. В естественных условиях в растущих тканях растений и животных всегда есть клетки, которые не проходят регулярно из G1- в S-, затем в G2- и потом в M-фазу; такие клетки принято называть клетками G0-периода. Эти клетки представляют собой, так называемые покоящиеся, переставшие размножаться клетки. Под действием специфических белковых ростовых факторов или митогенов они могут снова вступать в клеточный цикл и начать делиться. В некоторых тканях, например, в кроветворной, клетки G0-фазы могут находиться длительное время, не изменяют морфологические свойства, способны к делению и превращаются в камбиальные, стволовые клетки. Потеря (хотя бы и временная) способности делиться чаще обусловлена специализацией, дифференцировкой клеток. В этом случае дифференцирующиеся клетки выходят из цикла, но в особых условиях могут снова входить в цикл.

У многоклеточных зрелых организмов большая часть клеток находится в G0-фазе. Прохождение клетками клеточного цикла как в интенсивно размножающихся популяциях, так и в клетках стимулированных к размножению, регулируется целой сложной системой циклирующих белков.

Эндорепродукция и полиплоидия. Во многих органах и тканях нормальных диплоидных организмов животных и растений встречаются клетки с крупными ядрами, количество ДНК в которых кратно больше 2n, количество хромосом у них также кратно увеличено по сравнению с обычными диплоидными клетками. Эти клетки являются результатом соматической полиплоидии или эндорепродукции. Появление полиплоидных клеток происходит в результате блокады митоза. Блокада может наступить при переходе от G2-периода к собственно митозу, в профазе и метафазе, в последнем случае происходит при нарушении целостности веретена деления. И наконец, нарушение цитотомии также может привести к появлению двуядерных и полиплоидных клеток.

При естественной блокаде митоза в самом его начале, при переходе G2 в профазу, клетки приступают к следующему циклу репликации, который приводит к прогрессивному увеличению количества ДНК в ядре. При этом не наблюдается никаких морфологических особенностей таких ядер, кроме их больших размеров. При увеличении ядер в них не выявляются хромосомы митотического типа.

Такой тип эндорепродукции без митотической конденсации хромосом встречается как у позвоночных и беспозвоночных животных, так и у растений.

У беспозвоночных в результате блока митоза степень полиплоидии может достигать огромных значений. Так, в гигантских нейронах моллюска тритонии, ядра которых достигают величины до 1 мм, содержится более 200 000 гаплоидных наборов ДНК. Гигантские клетки железы пищевода аскариды могут содержать до 100000c ДНК.

Особым случаем эндорепродукции является увеличение плоидности путем политении.

При политении в S-периоде при репликации ДНК новые дочерние хромосомы остаются в деспирализованном состоянии, располагаются друг около друга, не расходятся, не претерпевают митотическую конденсацию. В таком истинно интерфазном виде хромосомы снова вступают в следующий цикл репликации, снова удваиваются и не расходятся. Постепенно в результате репликации и нерасхождения хромосомных нитей образуется многонитчатая, политенная структура хромосомы интерфазного ядра, которая никогда не участвует в митозе, более того - это истинно интерфазные хромосомы, участвующие в синтезе ДНК и РНК.

От митотических хромосом интерфазные отличаются размерами. Они в несколько раз толще (состоят из пучка неразошедшихся хроматид) - по объему политенные хромосомы дрозофилы в 1000 раз больше митотических - и в 70-250 раз длиннее из-за того, что менее конденсированы (спирализованы), чем митотические хромосомы.

Политенные хромосомы отличаются и своим строением: они структурно неоднородны по длине, состоят из дисков, междисковых участков и пуфов. Расположение дисков строго характерно для каждой хромосомы и отличается даже у близких видов животных.

Диски представляют собой участки конденсированного хроматина. Хромомерное строение дисков политенных хромосом отчетливо проявляется при искусственной деконденсации хромосом. Диски могут отличаться друг от друга по толщине. Общее их число у политенных хромосом, например, хирономид достигает 1,5-2,5 тыс, у дрозофилы - около 5 тыс. дисков.

Диски разделены междисковыми пространствами, состоящими, так же как и диски, из фибрилл хроматина, только более рыхло упакованных.

Пуфы возникают на местах некоторых дисков за счет их деконденсации и разрыхления. В пуфах выявляется РНК, которая там же и синтезируется. Следовательно, пуф является местом транскрипции на этих интерфазных хромосомах.

Пуфы являются временными образованиями на хромосомах, и в процессе развития организма существует определенная последовательность в их появлении и исчезновении на генетически различных участках хромосомы. Эта последовательность различна для разных тканей. Установлено, что образование пуфов на политенных хромосомах - это выражение генной активности: в пуфах синтезируются РНК, необходимые для проведения белковых синтезов на разных этапах развития насекомого. У двукрылых особенно активны в отношении синтеза РНК два самых крупных пуфа, так называемые кольца Бальбиани, который описал их 100 лет тому назад. Совсем недавно с помощью микроманипулятора удалось выделить кольца в достаточном количестве, чтобы определить тип их РНК. Это оказалась информационная РНК с гигантским мол. весом (70 тыс. нуклеотидов), кодирующая образование секреторных белков слюнных желез. Эта же РНК была выделена из полисом цитоплазмы. Размер гранул РНП, которые образуются в кольцах (пуфах) Бальбиани, достигает 40-60 нм.

В других случаях эндорепродукции полиплоидные клетки возникают в результате нарушений аппарата деления - веретена: при этом происходит митотическая конденсация хромосом. Такое явление носит название эндомитоз, потому что конденсация хромосом и их изменения происходят внутри ядра, без исчезновения ядерной оболочки.

Впервые явление эндомитоза было изучено в клетках водяного клопа - геррии. В начале эндомитоза хромосомы конденсируются, благодаря чему становятся хорошо различимы внутри ядра, затем хроматиды обособляются, вытягиваются. Эти стадии по состоянию хромосом могут соответствовать профазе и метафазе обычного митоза. Затем хромосомы в таких ядрах исчезают, и ядро принимает вид обычного интерфазного ядра, но размер его увеличивается в соответствии с увеличением плоидности. После очередной редупликации ДНК такой цикл эндомитоза повторяется. В результате могут возникнуть полиплоидные (32n) и даже гигантские ядра.

Аналогичный тип эндомитоза описан при развитии макронуклеусов у некоторых инфузорий, у целого ряда растений. Так, в клетках клубней картофеля хромосомы практически все время находятся в спирализованном состоянии, время собственно интерфазы здесь значительно укорочено.

Еще один вариант появления полиплоидных клеток связан с отсутствием веретена на стадии метафазы: при этом происходит слияние двух хромосомных наборов, как в случае применения колхицина.

Иной вариант появления полиплоидных соматических клеток в результате блокады деления клеточного тела изучен на клетках млекопитающих. Было обнаружено, что после S-периода клетки, имеющие 4c количество ДНК, вступают в митотическое деление, проходят все его стадии, включая телофазу, но не приступают к цитотомии. В итоге образуется двуядерная клетка (2 х 2n), которая снова может пройти S-период, в результате чего оба ядра в такой клетке станут содержать по 4c ДНК и 4n хромосом. Такая двуядерная клетка входит в митоз, на стадии метафазы происходит объединение хромосомных наборов (общее число хромосом равно 8n), а затем нормальное деление, в результате которого образуются две тетраплоидные клетки. Процесс попеременного появления двуядерных и одноядерных клеток может привести к появлению ядер с 8n, 16n и даже 32n количеством хромосом. Таким способом образуются полиплоидные клетки в печени, в эпителии мочевого пузыря, в пигментном эпителии сетчатки, в ацинарных отделах слюнной и поджелудочной желез, на ранних стадиях образования мегакариоцитов и др.

Процессы эндорепродукции используются организмом как для построения тканей, так и для их функционирования. Соматическая полиплоидизация характерна для специализированных, дифференцированных клеток и не встречается при генеративных процессах, таких, как эмбриогенез (исключая провизорные органы) и образование половых клеток, нет полиплоидии среди стволовых клеток. Гигантские полиплоидные клетки в деление не вступают; клетки с политенными хромосомами также не делятся и в процессе метаморфоза насекомых лизируются. Многоядерные и полиплоидные клетки у млекопитающих встречаются главным образом у стареющих организмов.

Считают, что главным результатом соматической полиплоидии является увеличение размера клеток и тем самым увеличение их продуктивности.

Пространственное расположение хромосом в интерфазном ядре.Представление о том, что митотические хромосомы после деления клеток превращаются в хроматин интерфазного ядра, не теряют своей целостности (не распадаются на фрагменты), а сохраняют свою физическую индивидуальность, переходя лишь в разрыхленное, деконденсированное состояние, было высказано Т. Бовери еще в 1887 г. Эти представления получили название теории непрерывности хромосом, которая гласит: хромосомы, вошедшие в состав дочернего ядра в телофазе, сохраняются в нем хотя бы и в очень измененном виде в качестве индивидуальных структур и появляются снова в собственном смысле слова в следующей профазе.

Основой для этого вывода послужило наблюдение Е. Бовери за поведением хромосом в дробящихся яйцах одного из видов аскариды (Ascaris megalocephala univaiens), в клетке которой всего две хромосомы. Было обнаружено, что в профазе первых двух делений зиготы хромосомы вновь обнаруживаются в местах бывших телофазных хромосом предыдущего деления, повторяя их форму и локализацию (рис. 48). Конечно эти наблюдения не могут служить прямым доказательством этой теории, но являются основой для высказывания предположения о судьбе хромосом в клеточном цикле. Однако, кроме этого наблюдения существует целая серия косвенных данных, говорящих в пользу теории непрерывности хромосом. Вот некоторые из них.

Было найдено, что в интерфазных ядрах целого ряда объектов удается регистрировать отдельные специфические участки, аналогичные по своим свойствам теломерам и центромерам митотических хромосом. Так, например, у некоторых луков все хромосомы имеют постоянно конденсированные участки на теломерах. Эти теломеры митотических хромосом обладают свойством окрашиваться как C-сегмент. В интерфазных ядрах этих видов также обнаруживаются C-положительные зоны, в количестве вдвое меньшем, чем число плечей митотических хромосом, вероятно, за счет того, что в интерфазе эти теломерные участки соседних хромосом могут ассоциировать друг с другом. Интересно, что в интерфазном ядре эти участки располагаются на одном из полюсов, как бы повторяя теломерную ориентацию хромосом в митозе.

Подобным же образом можно наблюдать в интерфазных ядрах центромерные участки хромосом. Так у мыши центромеры всех акроцентрических хромосом интенсивно окрашиваются по методике выявления C-сегментов (рис. 50). Таким же свойством обладают связанные с периферией ядра плотные участки интерфазного хроматина - хромоцентры. Показано, что эти участки по своей молекулярной композиции аналогичны центромерным участкам митотических хромосом.

Наконец, в интерфазных клетках можно наблюдать целые отдельные хромосомы; например, одну из X-хромосом самок млекопитающих. Правда, такие целиком конденсированные хромосомы (тельца Барра) не обладают общей морфологией митотических хромосом, но по объему и количеству ДНК полностью соответствуют X-хромосоме в митозе. У пашенной полевки (Microtus agrestis) Х половые хромосомы обладают способностью целиком интенсивно окрашиваться по C-методике. В интерфазных ядрах различных клеток этого животного можно с помощью этой же окраски видеть два больших блока интенсивно окрашенного хроматина в клетках самок.

Каково же пространственное расположение отдельных деконденсированных интерфазных хромосом в трехмерном объеме клеточного ядра? Существует ли какой-либо порядок в размещении хромосом в интерфазном ядре или же они хаотически разбросаны внутри ядра? Первые исследования о порядке расположения хромосом внутри ядра принадлежат К. Раблю (1885), который изучая профазные ядра растений, предположил, что внутри ядра хромосомы повторяют свою анафазную ориентацию (центромеры - на одном полюсе, теломеры на другом) в течение всего клеточного цикла.

В пользу этого говорит расположение в интерфазном ядре центромерных и теломерных участков деконденсированных хромосом. Но особенно демонстративно это положение было показано при изучении пространственной локализации политенных хромосом. С помощью послойных оптических разрезов, используя компьютерную технику воспроизведения изображения, удалось создать объемную стереоскопическую реконструкцию интерфазного ядра и проследить в его трехмерном пространстве каждую из четырех гигантских политенных хромосом (рис. 51). Было обнаружено, что действительно в объеме ядер хромосомы располагаются повторяя ана-телофазную ориентацию (т.н. ориентацию по Раблю). При этом каждое плечо хромосомы занимает определенную зону, объем которой не заходит в объем соседних хромосом, хотя они расположены тесно друг с другом. Каждая из хромосом образует пологую правую спираль (5-7 витков), которая в нескольких местах связана с ядерной оболочкой, как бы фиксируясь на ней. Фиксированы на ядерной оболочке и теломерные участки всех хромосом, которые располагаются на одном из полюсов интерфазного ядра. На противоположном полюсе ядра также в связи с ядерной оболочкой располагаются центромерные районы хромосом, часто объединенные в один хромоцентр - крупный блок интерфазного хроматина.

Прямые наблюдения за локализацией в ядре интерфазных хромосом были сделаны используя метод FISH (флуоресцентная in situ гибридизация нуклеиновых кислот) в сочетании с конфокальной микроскопией. Вначале были выделены индивидуальные митотические хромосомы, из них были получены ДНК, которые метились разными флуорохромами. Такие меченые хромосомные ДНК наносились на препараты интерфазных ядер, ДНК которых была предварительно денатурирована. В результате молекулярной гибридизации флуоресцирующая ДНК ренатурировала только со сходной хромосомой. С помощью конфокального микроскопа просматривалась флуоресцентная метка в трехмерном пространстве интерфазного ядра. Было обнаружено, что интерфазное ядро состоит из тесно расположенных хромосомных территорий, объем которых значительно превосходил объем митотических хромосом. Некоторые особенно крупные хромосомы действительно проявляли ана-телофазную ориентацию.

Суммируя общие представления о формах организации хромосом можно прийти к заключению, что они могут находиться в двух альтернативных состояниях, в двух морфологических выражениях: 1 - максимально конденсированное, компактное, метаболически неактивное, транспортное состояние, предназначенное для того, чтобы в минимальном объеме без структурных нарушений перенести во время клеточного деления огромные по длине молекулы ДНК; 2 - деконденсированное, при котором линейная длина развернутых хромосом увеличивается в десятки, а иногда и в сотни раз, метаболически активное состояние, связанное с синтезом ДНК и РНК (интерфаза).

Отличительной особенностью интерфазной хромосомы от митотической, кроме всего, является то, что по своей длине она может быть деконденсирована, развернута неравномерно - есть участки полной деконденсации и есть участки, находящиеся в плотном, деконденсированном и, соответственно, в неактивном состоянии.