

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА  
БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ

**Т. Г. Алексєєва**

# **ЗАГАЛЬНА ЦИТОЛОГІЯ**

*НАВЧАЛЬНО-МЕТОДИЧНИЙ ПОСІБНИК*

ОДЕСА  
ОНУ  
2022

УДК 567.3(075.8)  
А471

*Рекомендовано науково-методичною радою  
факультету хімії та фармації ОНУ імені І. І. Мечникова.  
Протокол № 6 від 09.12.21 р.*

**Рецензенти:**

**В. Ю. Страшнюк**, доктор біологічних наук, професор кафедри генетики і цитології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна;

**С. П. Гвоздій**, доктор педагогічних наук, доцент, завідувач кафедри здоров'я людини та цивільної безпеки ОНУ імені І. І. Мечникова;

**І. А. Кравченко**, доктор біологічних наук, професор, завідувач кафедри органічних та фармацевтичних технологій Державного університету «Одеська політехніка».

**Алексєєва Т. Г.**

А 471            Загальна цитологія : навч.-метод. посіб. / Т. Г. Алексєєва.  
– Одеса : Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2022. – 120 с. ; іл.,  
табл.

ISBN 978-617-689-538-1

У навчально-методичному посібнику розглянуто теоретичні відомості та методики виконання лабораторних робіт з курсу загальної цитології, а також подано значний ілюстративний матеріал, покликаний допомогти студентам у засвоєнні програми курсу та самостійній роботі.

Навчально-методичний посібник рекомендовано студентам закладів вищої освіти, що навчаються за спеціальністю 014.05 Середня освіта (Біологія та здоров'я людини).

**УДК 567.3(075.8)**

ISBN 978-617-689-538-1

© Алексєєва Т. Г., 2022

© Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2022

## Зміст

|                                                                                                      |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ВСТУП.....                                                                                           | 4   |
| Тема 1. Оптичні системи в біологічних дослідженнях. Світлова мікроскопія.....                        | 5   |
| Лабораторна робота № 1. Налаштування мікроскопа для дослідження біологічних об'єктів .....           | 9   |
| Тема 2. Виготовлення тимчасових препаратів. Постійні мікропрепарати.....                             | 15  |
| Лабораторна робота № 2. Виготовлення тимчасових мікропрепаратів біологічних об'єктів .....           | 19  |
| Тема 3. Біологічні мембрани. Вакуолярна система клітини .....                                        | 25  |
| Лабораторна робота № 3. Явище плазмолізу і деплазмолізу в клітинах шкірки <i>Allium cepa</i> L. .... | 27  |
| Тема 4. Біологічний цитологічний дослід. Цитометрія клітин. Комп'ютерні програми. ....               | 31  |
| Лабораторна робота № 4. Цитометрія рослинних клітин .....                                            | 32  |
| Тема 5. Компактизація хроматину. Морфологія хромосом.....                                            | 41  |
| Лабораторна робота № 5. Каріотипування рослинних об'єктів.....                                       | 46  |
| Тема 6. Мітоз. Патології мітозу.. ....                                                               | 53  |
| Лабораторна робота № 6. Визначення мітотичного індексу .....                                         | 55  |
| Тема 7. Мейоз і гаметогенез у рослин і тварин.....                                                   | 58  |
| Лабораторна робота № 7. Мікроспорогенез у злакових рослин .....                                      | 61  |
| Тема 8. Клітинний цикл. Межа Гейфліка. Стволові клітини. Клітинна загибель – некроз та апоптоз.....  | 65  |
| Додатки.....                                                                                         | 76  |
| Додаток 1. Окремі методи дослідження клітини .....                                                   | 76  |
| Додаток 2. Ультраструктура деяких клітинних компонентів в електронних мікрофотографіях .....         | 94  |
| Додаток 3. Морфологія клітини, видозміни і патології клітинних органел .....                         | 108 |
| Додаток 4. Прописи найуживаніших реактивів .....                                                     | 116 |
| Додаток 5. Орієнтовні теми для доповідей студентів .....                                             | 117 |
| Додаток 6. Техніка безпеки та охорони праці в біологічній лабораторії.....                           | 119 |

## ВСТУП

Серед біологічних наук, що викладаються у закладах вищої освіти цитологія або, якщо використовувати сучасні терміни, клітинна біологія займає чільне місце завдяки тому, що саме під час вивчення цієї дисципліни створюється фундамент для розуміння усіх напрямів, які вивчають життя на клітинному, субклітинному та молекулярному рівні. Розуміння понять та явищ, отримане в курсі загальної цитології, готує студента – майбутнього вчителя біології та основ здоров'я – до розуміння понять та явищ у курсах мікробіології, вірусології, генетики, молекулярної біології, біохімії, біофізики та ін., забезпечуючи тверде підґрунтя формування якісного фахівця. Надзвичайно важливою метою проведення будь-якого курсу в рамках спеціальності 014.05 є не лише отримання твердих знань предмету у студентів, але й формування у них навичок роботи з науковою та науково-популярною літературою біологічного профілю та онлайн-ресурсами, а також вироблення певних навичок застосування отриманих знань у галузі освіти. Загально прийнятим методом для закріплення подібних навиків є проведення лабораторних або практичних робіт.

У даному навчально-методичному посібнику викладено теоретичні відомості та практичні інструкції щодо проведення лабораторних занять з модулю «Цитологія» нормативного курсу «Загальна цитологія, гістологія, біологія індивідуального розвитку». Згідно зі структурою курсу, на початку кожної теми викладено теоретичні відомості, які є органічним доповненням лекційного матеріалу і, в залежності від потреби, або висвітлюють певні аспекти теми, або ще раз наголошують на важливих ключових моментах, що необхідні для виконання певної лабораторної роботи. Після опрацювання цієї інформації студентам пропонують виконати практичне завдання. За результатами такого виконання та усного опитування викладач має змогу перевірити засвоєння студентами матеріалу та оцінити рівень набутих знань.

Пропонуючи даний навчально-методичний посібник, автор звертала особливу увагу на наочність, велику інформативність та відносну простоту лабораторних робіт, обраних для виконання студентами першого курсу спеціальності 014.05. Усі зазначені теми, після невеликої адаптації, можуть бути з успіхом використані студентами-освітянами у майбутньому під час викладання біології у школі, сприяючи розвитку навичок аналізу та систематизації викладеного вчителями матеріалу у школярів. З огляду на стрімкий розвиток клітинної біології та оновлення наукової інформації в цій галузі знань, доступ до якої можливий за умови використання онлайн-ресурсів, окрему увагу приділено роботі з науковими ресурсами Інтернету та формуванню навичок пошуку якісного контенту.

До складу посібнику входять «Додатки», у яких наведено довідкову інформацію, покликану надати систематизований і структурований матеріал щодо окремих аспектів цитології. Так, у Додатку 1 представлено стислий опис сучасних методів дослідження клітини, Додаток 2 є збіркою електронних мікрофотографій, які надають поняття про ультраструктуру компонентів рослинних і тваринних клітин, Додаток 3 присвячено унаочненню того, як позначаються ті чи інші дефекти органел на функціонуванні макроорганізму. З довідковими цілями наведено інформацію про найуживаніші фіксатори та барвники, які є відносно доступними і підходять для обладнання шкільного біологічного кабінету, для використання при проведенні занять шкільного біологічного гуртка тощо. При укладанні посібника, окрім оригінальних фотографій та рисунків, автор користувалася великою кількістю зображень, що походять із наукових статей, видань освітнього характеру та відкритих джерел Інтернету, кожне з цитованих зображень має відповідне посилання на автора (авторів) або джерело походження.

Основною метою, якою укладач керувалася при створенні даного методичного посібника, є сприяння якісному засвоєнню цитології студентами-освітянами і створення підґрунтя для підготовки майбутніх вчителів до виконання функціональних обов'язків на високому професійному рівні.

## **ТЕМА 1. Оптичні системи у біологічних дослідженнях. Світлова мікроскопія**

### **Теоретичні відомості**

Мікроскоп – оптичний прилад, який використовується для візуальних спостережень, фотографії та точних кількісних вимірів. Цей прилад дозволяє отримати збільшене та зворотне зображення мікрооб'єкта.

В залежності від типу призначення та методу дослідження мікроскопи можуть бути спрощеними, робочими, дослідницькими, універсальними та ін. Мікроскопи бувають різні, але всі вони мають однаковий план будови: механічну і оптичну частини (рис. 1).

До **механічної частини** мікроскопу відноситься його **штатив з основою (1)** і **колонкою** (коробкою з механізмом мікрометричного фокусування) **(2)**, **тубус** (мономолекулярна насадка) – **(3)** з **голівкою (4)**, яка з'єднує тубус і **револьвер (5)**, що утримує об'єктиви. Частина штативу, яку називають **тубусотримач (6)**, також містить механізм макрометричного фокусування. Рухливий **предметний столик (7)** призначений для розміщення препаратів і має лапки для фіксування препарату і маленькі гвинти для його пересування. На **штативі** знаходяться гвинти грубого (**макрогвинт**) – **(8)** і точного (**мікрогвинт**) – **(9)** налаштування, які керують коробкою мікромеханізму. У деяких моделей мікроскопу мікрогвинт розташовано в основі. На колонці також знаходиться **гвинт конденсору – (10)**, за допомогою якого регулюють інтенсивність освітлення.

Оптична частина мікроскопу поділяється на два вузли – **оптичну та освітлювальну системи**.

**Освітлювальна система** призначена для освітлення препарату і складається з **конденсора – (11)** і **дзеркала – (12)** (або іншого джерела освітлення), яке розташоване під конденсатором і направляє в нього світло. В залежності від методу мікроскопії, для якого налаштований даний прилад, конденсор може бути світлопольним,

темнопольним або призначеним для спостережень за методом фазового контрасту тощо.

Конденсор складається із лінз(и), ірисової діафрагми та підтримки для світлофільтрів. Важливо пам'ятати, що при роботі зі слабкими об'єктивами конденсор опускають, з сильними – піднімають. За допомогою ірисової діафрагми регулюють світловий потік. Використання світлофільтрів допомагає робити зображення більш чітким, контрастувати його. При використанні в якості джерела освітлення дзеркала необхідно пам'ятати, що його плоска сторона призначена для роботи зі слабкими об'єктивами, без конденсора і при доброму освітленні, а увігнута сторона використовується з сильними об'єктивами і при слабкому освітленні. Часто дзеркало може бути замінено на **точкове джерело світла**, яке складається із власне освітлювача та реостату для регуляції інтенсивності світлового потоку.



**Рис. 1. Будова робочих мікроскопів Біолам і МБР (пояснення у тексті)<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Тут і далі використовуються зображення автора, окрім тих рисунків, для яких вказане джерело походження

До складу **оптичної системи** входять **об'єктиви – (13, 14, 15)** і **окуляр – (16)** разом з тубусом. Окуляр побудований значно простіше об'єктива, складається тільки з двох лінз і дає уявне збільшене зображення. Об'єктиви є найбільш важливою частиною оптичної системи мікроскопа. Сучасні об'єктиви є складними багатолінзовими конструкціями; від їх якості в основному і залежить зображення об'єкта. Неякісні лінзи в об'єктивах можуть привести до аберацій (спотворення зображення об'єкта): зображення може виявитися розмазаним, викривленим або виникнути хроматизм положення – зображення різних кольорів розташовуються на неоднаковій відстані. Об'єктив дає геометрично подібне об'єкту збільшене зображення зі зворотнім розташуванням частин по відношенню до препарату.

Об'єктиви поділяються на сухі (середовище між об'єктивом і покривним скельцем – повітря) і іммерсійні (такі, що потребують певного рідкого середовища між фронтальною лінзою об'єктиву і покривним склом або препаратом. На оправі іммерсійних об'єктивів є канавки різних кольорів в залежності від виду іммерсії.

Масляна іммерсія – «МИ» або канавка чорного кольору **(14)**

Водяна іммерсія – «ВИ» або канавка білого кольору

Гліцеринова іммерсія – «ГИ» або канавка жовтого кольору.

Важливо знати, що якість об'єктивів визначається не їх збільшенням, а їх роздільною здатністю. **Роздільна здатність** – це мінімальна відстань, на якій оптика мікроскопу здатна розрізнити окремо дві близько розташовані точки.

Для чіткого відокремлення двох точок, що не здатні світитися самотійно (таких, що освітлені ззовні прямим світлом) можна використовувати формулу  $d = \frac{\lambda}{A}$ . При дослідженні об'єктів, що світяться самі, формула має наступний вигляд:  $d = \frac{0.61\lambda}{A}$ . Роздільна здатність залежить від **довжини хвилі  $\lambda$**  і числової або нумеричної **апертури  $A$** .

Апертура – здатність оптичної системи сприймати ту чи іншу кількість світла; її визначають за формулою:  $A = n \cdot \sin \alpha$ , де  $n$  – показник заломлення середовища між фронтальною лінзою об'єктиву

і покривним склом, а  $\alpha$  – половинний кут вхідного отвору об'єктива. Числове значення апертури вказують на об'єктиві. Якісні сухі об'єктиви можуть мати  $A$ , яка дорівнює 0,95, імерсійним властиві більш високі значення  $A$  за рахунок того, що показник заломлення рідини має значення більше одиниці. Найвищі апертури мають олійно-імерсійні об'єктиви ( $A=1,4$ ).

При освітленні звичайним світлом ( $\lambda = 555$  нм) і використанні об'єктива з високою апертурою ( $A = 1,4$ ) найменший діаметр видимих часток складає 0,24 мкм; зменшуючи довжину хвилі світла можна покращити роздільну здатність мікроскопу і побачити ще менші частки.

Збільшення об'єктива також вказано на його оправі, наприклад, 8 $\times$ , 40 $\times$ , 90 $\times$ . Відповідно, апертури цих об'єктивів будуть дорівнювати 0,20, 0,65 і 1,25.

Загальне збільшення мікроскопа визначають:  $V = V_{об} \cdot V_{ок}$

Корисне збільшення мікроскопа вираховується так:

$$V_{корисне} = (500 \div 1000) A$$

Кожен об'єктив характеризується величиною **фокусної робочої відстані** (відстань від препарату до кінцевої лінзи у об'єктиві) у мм. Чим більше збільшення об'єктива, тим меншою у нього буде фокусна відстань. Так, для об'єктиву зі збільшенням 8 $\times$  робоча відстань буде дорівнювати  $\sim 14$  мм, а для об'єктиву 40 $\times$   $\sim 0,6$  мм.

При роботі з мікроскопом важливе значення має товщина покривних і предметних скелець. Цитолог зазвичай працює з типовими предметними (завтовшки 1,2 мм) і покривними скельцями (0,17 мм).

## Лабораторна робота № 1

### Налаштування мікроскопа для дослідження біологічних об'єктів

**Мета роботи:** ознайомитися з правилами налаштування світлопольного біологічного мікроскопа та отримати навички аналізу мікропрепаратів.

## **Матеріали та обладнання**

Мікроскопи біологічні

Набори постійних мікропрепаратів біологічних об'єктів

**Завдання 1.** Засвоїти принципи налаштування світлопольного біологічного мікроскопа

### **Хід роботи**

1. Переносити мікроскопи можна лише двома руками – однією рукою тримають за підшву мікроскопу, а другою притримують його за тубусотримач. Мікроскоп розташовують ближче до лівого плеча, з тим, щоб правою рукою було зручно робити малюнки в робочому зошиті.
2. Уважно роздивіться мікроскоп, запам'ятайте розташування та назви вузлів оптичної системи, визначте загальне збільшення і корисне збільшення мікроскопа для різних об'єтивів
3. Для налаштування освітлення необхідно встановити (відцентрувати) на револьвері мікроскопа об'єтив малого збільшення. Після цього, дивлячись в окуляр, необхідно повертати дзеркало у напрямку променів світла, добиваючись максимально рівномірного і яскравого освітлення поля зору.
4. Препарат кладуть на предметний столик мікроскопа покривним склом наверх і розташовують так, щоб об'єкт, призначений для розгляду, знаходився точно під об'єктивом малого збільшення.
5. Дивлячись на препарат збоку, опускають об'єтив за допомогою макрогвинта так, щоби відстань між фронтальною лінзою об'єктиву малого збільшення і покривним склом була приблизно 1 см. Потім, дивлячись в окуляр, за допомогою макрогвинта підіймають об'єтив до появи чіткого зображення препарату. На цьому етапі зручно регулювати освітлення за допомогою конденсора.
6. Для переведення на велике збільшення необхідно змінити об'єтив шляхом обертання револьвера. Відцентрувавши об'єтив великого збільшення (коли об'єтив стане на місце, почуєте клацання), дивлячись збоку, необхідно максимально

опустити об'єктив вниз, так, щоб відстань між фронтальною лінзою об'єктиву і покривним склом була меншою за 1 мм. Переконавшись у цьому, переводять погляд у окуляр і повільно підіймають тубус вгору до появи чіткого зображення. При необхідності регулюють освітлення за допомогою конденсора. Важливо пам'ятати, що мікроскоп не потрібно повертати більше, ніж на півоберта – він призначений для дуже точного налаштування.

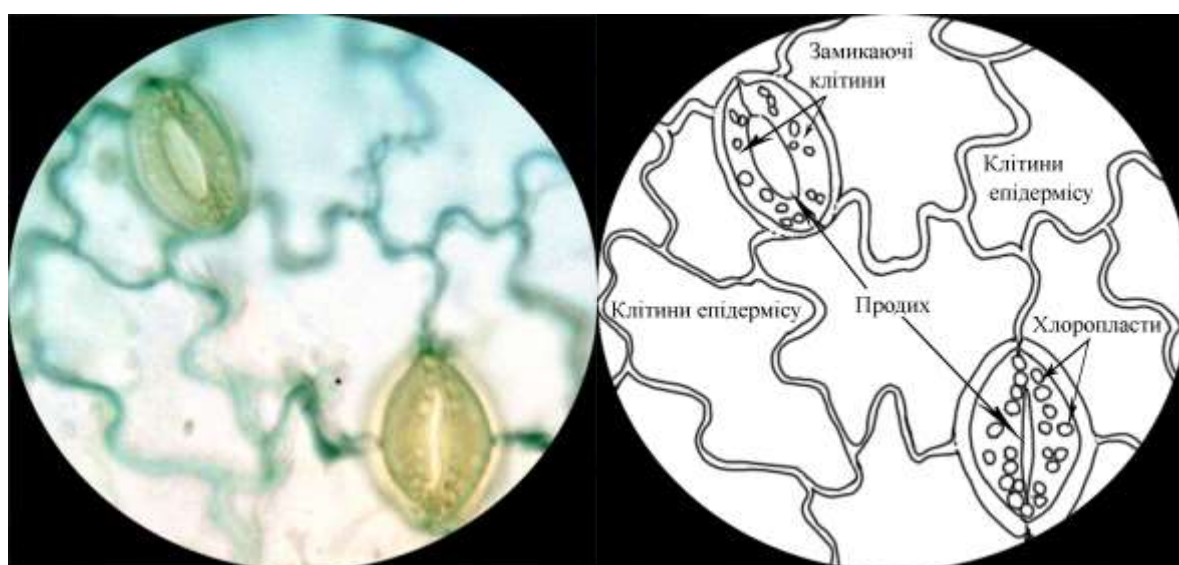
7. Для роботи з імерсійним олійним об'єктивом необхідно зсунути об'єктив великого збільшення, на поверхню покривного скла нанести краплину спеціальної мінеральної імерсійної олії і обертом револьверу встановити імерсійний об'єктив. Він повинен зануритися у олійну краплю. Іноді олійну краплю наносять і на лінзу об'єктиву. Робоча відстань імерсійного об'єктиву складає 0,6 мм, тому налаштування його потрібно проводити особливо обережно, для уникнення пошкодження лінзи об'єктива і препарату. Важливо пам'ятати, що після закінчення роботи з імерсійним об'єктивом, необхідно протерти його спочатку сухою, а потім змоченою у етиловому спирті серветкою.
8. Після закінчення роботи мікроскоп переводять на мале збільшення, а потім у неробочий стан.

**Завдання 2.** Розглянути у мікроскоп постійні мікропрепарати рослинних і тваринних об'єктів. Знайти загальні і відмінні риси клітин різного походження

### **Хід роботи**

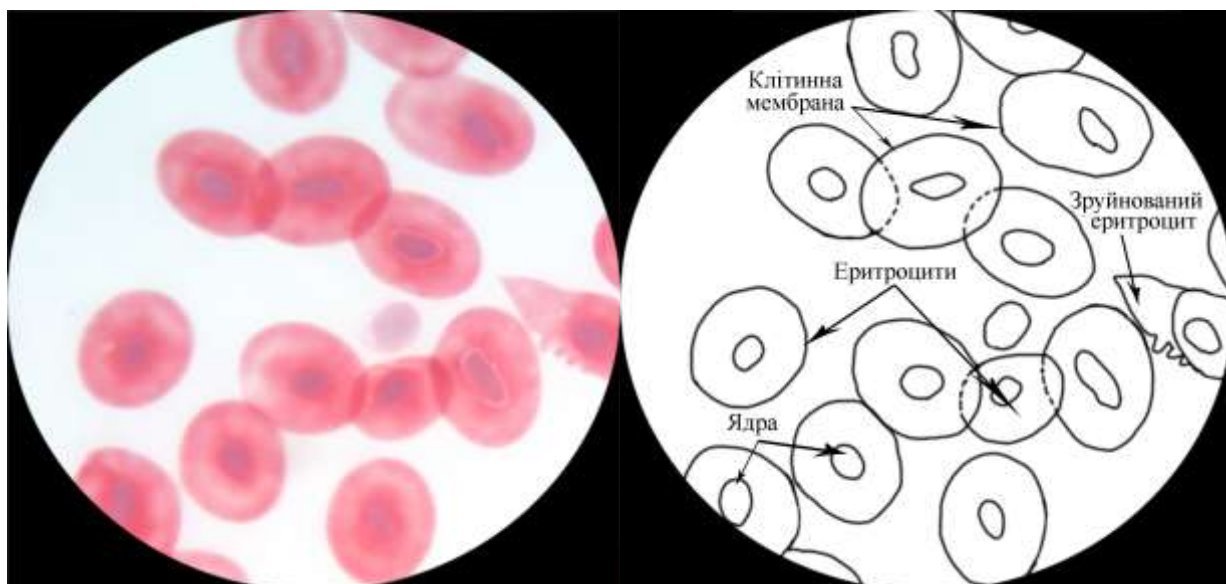
1. Налаштувавши мікроскоп на мале, а потім велике збільшення, роздивитися постійні мікропрепарати рослинних об'єктів із запропонованого набору. Необхідно уважно роздивитися обраний рослинний об'єкт, замалювавши його в зошит на великому і на малому збільшенні. На малюнках необхідно знайти і позначити усі компоненти рослинних клітин, які

можна розгледіти і ідентифікувати при даних збільшеннях. При можливості студенти можуть сфотографувати препарати, використовуючи власні смартфони (рис. 2, 3). В залежності від типу та якості камери смартфона зображення можуть різнитися, проте, майже завжди можна отримати більш-менш якісну світлинку. Звичайно, фотографії, зроблені таким чином, не є придатними для проведення цитометричних досліджень та цитологічного аналізу, проте, вони надають чудову можливість зафіксувати зображення об'єкта під мікроскопом.



**Рис. 2. Приклади виконання завдання 2.1 лабораторної роботи № 1**

2. За тим же принципом роздивитися постійні мікропрепарати тваринних об'єктів із запропонованого набору. Необхідно уважно роздивитися обраний препарат, замалювавши його у зошит на великому і на малому збільшенні і проаналізувавши зображення. При можливості студенти можуть сфотографувати препарати, використовуючи власні смартфони (рис. 3).



**Рис. 3. Приклади виконання завдання 2.2 лабораторної роботи № 1**

3. Зробити висновок про спільні і відмінні риси будови рослинних і тваринних клітин.

**Завдання 3.** Ознайомитися з методами дослідження клітини (додаток 1). Розглянути мікрофотографії ультраструктури рослинних і тваринних клітин (додаток 2). Ознайомитися з присвяченими цитології сайтами (перелік корисних ресурсів)

**Питання для підготовки та контролю:**

1. Методи мікроскопії
2. Типи світлових мікроскопів
3. Якість оптичних систем
4. Алгоритм налаштування світлового мікроскопа
5. Додаткове обладнання для світлового мікроскопа
6. Принципи роботи та використання флуоресцентної мікроскопії
7. Принципи роботи та використання конфокальної мікроскопії
8. Для дослідження яких об'єктів і процесів краще використовувати світлопольну мікроскопію?
9. Для дослідження яких об'єктів і процесів краще використовувати темнопольну мікроскопію?
10. Для дослідження яких об'єктів і процесів краще використовувати фазово-контрастну мікроскопію?

### **Література:**

1. Варенюк І.М., Держинський М.Е. Методи цито-гістологічної діагностики: навчальний посібник. – Київ: Інтерсервіс, 2019. – 256 с.
2. Трускавецький Э. С. Цитологія: підручник. – К. : Вища школа, 2004. – 254 с.
3. Держинський М. Е., Скрипник Н. В., Гарматіна С. М., Островська Г. В., Варенюк І. М., Пустовалов А. С., Вороніна О. К., Пазюк Л. М., Бузинська Н. О. Загальна цитологія та гістологія. Частина І: Загальна цитологія: навчальний посібник. – К. : Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2006. – 275 с.
4. Kohen E., Santus R., Hirschberg J. G., Ozkutuk N. Atlas of cell organelles fluorescence. – CRC Press, 2004. – 214 p.
5. Dashek W. V., Miglani G. S. Plant cells and their organelles. – Hoboken, N.J. : Wiley, 2017. – 413 p.

### **Перелік корисних on-line ресурсів**

6. MicroscopyU: The source for microscopy education. – Електр. дан. – Режим доступу: <https://www.microscopyu.com>: (дата звернення 01.02.2022). – Загол. з екрана.
7. A Selection of Antique Microscope Slides from the Victorian Era c. 1830s ~ 1900: . – Електр. дан. – Режим доступу: <http://www.victorianmicroscopeslides.com/slides.htm> : (дата звернення 01.02.2022). – Загол. з екрана.
8. The Project Gutenberg eBook, Micrographia, by Robert Hooke. – Електр. дан. – Режим доступу: <http://www.gutenberg.org/files/15491/15491-h/15491-h.htm> : (дата звернення 01.02.2022). – Загол. з екрана.
9. Dr. Jastrows electron microscopic atlas. – Електр. дан. – Режим доступу: <http://www.drjastrow.de/EMAtlasE.html> : (дата звернення 01.02.2022). – Загол. з екрана.

## **ТЕМА 2. Виготовлення тимчасових препаратів. Постійні мікропрепарати**

### **Теоретичні відомості**

При роботі (дослідженні, вивченні) з біологічними об'єктами на клітинному рівні дослідник стикається з необхідністю зробити мікроскопічні препарати самостійно. Нижче наведені стислі відомості про типи і методики виготовлення мікроскопічних препаратів.

За **типом зберігання** препарати можна поділити на дві великі категорії – **тимчасові** і **постійні** мікропрепарати. Біологічні об'єкти на постійних мікропрепаратах заключні у прозоре середовище, яке із часом твердіє, і зверху покриті покривним склом. Вони можуть зберігатися дуже довго, роками і десятиріччями. На тимчасових препаратах біологічні об'єкти занурені у рідке середовище; час їх придатності вимірюється годинами, але з ними можна проводити досліді (наприклад, додавати реактиви, барвники тощо).

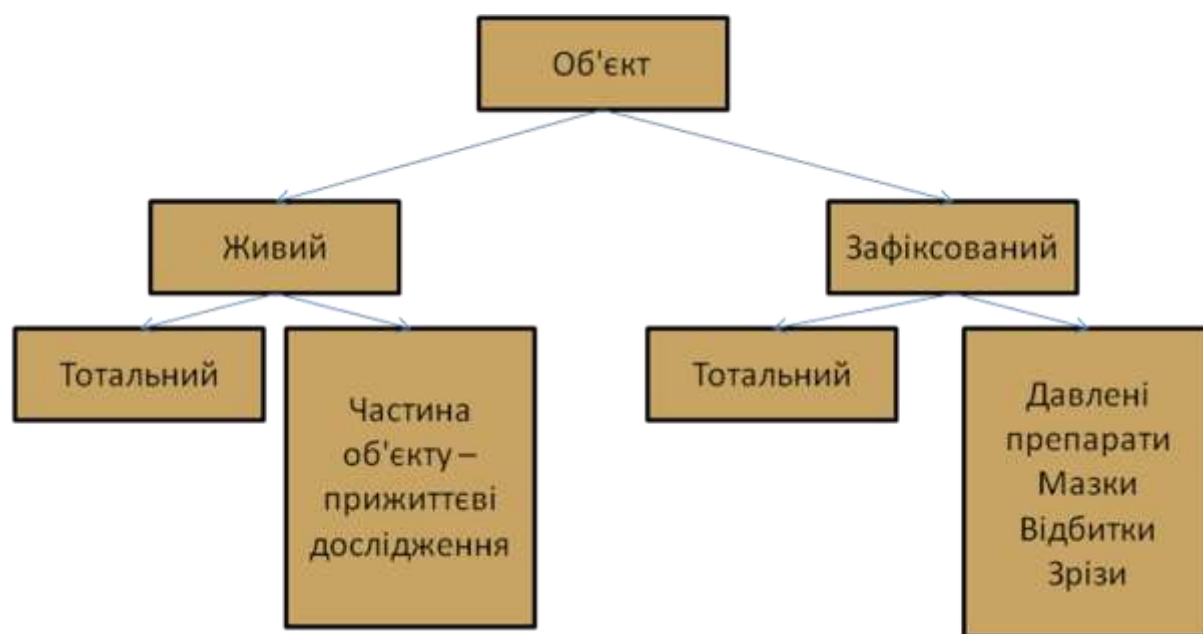
Якщо на препараті представлений організм повністю, або його невелика частина (листок, ротовий апарат комахи), такий препарат має назву **тотальний**.

За **типом об'єкта** мікропрепарати можна поділити на дві категорії: якщо досліджуваний об'єкт залишається у живому стані, то такі препарати називають **вітальними** (прижиттєвими) (рис 4). Проте, в переважній більшості випадків, перш ніж приступити до вивчення об'єкта, його необхідно піддати фіксації.

**Фіксація** – це швидка консервація клітин в спеціальних розчинах отруйних реактивів, які незворотно переривають життєві процеси у клітині. При цьому колоїди протопласта переходять в нерозчинний стан (хімічна фіксація). Фізичній фіксації піддають об'єкти за допомогою термічної обробки, нагріваючи або заморожуючи їх. При певних методиках виготовлення препаратів об'єкти перед хімічною фіксацією піддають спеціальній обробці, яка необхідна для кращого виявлення тих чи інших структур на препараті.

Кожен фіксатор має своє призначення. Надзвичайно важливо вибрати той фіксатор, який, вбиваючи клітину, зовсім або не сильно деформує її прижиттєву структуру і відповідає цілям дослідження.

Найчастіше фіксатор – суміш реактивів, кожен з яких рідко використовується окремо завдяки односторонності своєї дії. Часто до складу фіксаторів входять розчинники (хлороформ, ацетон, різні спирти). Найчастіше використовують етанол та метанол (він дешевше, проте отруйний). Етанол має нейтральну реакцію, осаджує нуклеїнові кислоти, альбуміни, глобуліни, але розчиняє ліпоїди, викликає деформацію та розриви структур клітини, сильне зморщування і затвердіння тканин. Фіксатори готують або на спирті або на дистильованій воді безпосередньо перед використанням.



**Рис. 4. Класифікація мікропрепаратів за типом об'єкта**

Спиртові фіксатори швидко проникають в тканину (час фіксації від 30 хвилин до 12 годин). Вони більш грубі за своєю дією, ніж водні, їх можна готувати заздалегідь, вони більш стійкі. Водні фіксатори діють м'якше, в них об'єкти витримують протягом доби і більше. Детальніше про склад простих, проте ефективних фіксаторів можна дізнатися в Додатку 4.

При фіксації необхідно дотримуватися наступних принципів:

- Об'єм рідини для фіксації повинен в 50-100 разів перевищувати об'єм матеріалу.
- Фіксують тільки свіжі об'єкти. Непотрібні частини великих об'єктів (пелюстки, ості і т. д.) видаляють до фіксації
- Час фіксації краще підбирати відповідно до об'єкта (його розміру, походженню тощо).

Із зафіксованих об'єктів можна виготовити як тимчасові, так і постійні мікротомні мікропрепарати.

Виготовлення постійних мікротомних препаратів складається із тривалої процедури, яка включає в себе особливий етап – заключення м'якого біологічного об'єкту у тверде середовище (наприклад, лабораторний парафін або спеціалізовані смоли), яке просочує об'єкт повністю і дозволяє отримати дуже тонкі зрізи – від 25 до 5 мкм завтовшки. Дуже стисло процедуру виготовлення постійних препаратів можна описати наступним чином:

1. Підготовка об'єктів до фіксації.
2. Фіксація об'єктів.
3. Повне збезводнення об'єктів за допомогою серії розчинів етилового спирту.
4. Просочування об'єктів розчинниками твердого середовища (хлороформ, ксилол чи ін. розчинники парафіну).
5. Просочування об'єктів парафіном.
6. Заливання досліджуваного матеріалу в парафін – виготовлення так званих «пряників».
7. Виготовлення блоків із об'єктів, просочених парафіном.
8. Отримання тонких серійних зрізів за допомогою спеціального приладу – мікротому.
9. Наклеювання тонких парафінових зрізів на предметне скло – формування препарату.
10. Видалення парафіну із зрізів ксилолом, ксилолу – етиловим спиртом, а спирту – дистильованою водою.

11. Забарвлення препаратів за обраною методикою забарвлення.
12. Заключення забарвлених зрізів у канадський бальзам або інше середовище.
13. Етикетування препаратів.

Виготовлення тимчасових препаратів є значно простішим. Залежно від типу об'єкта розрізняють такі типи тимчасових препаратів – мазки, зрізи, відбитки, давлені препарати та їх різновиди.

Препарати-**мазки** зазвичай готують із рідких тканин, наприклад, крові. Невелику краплину досліджуваної рідини наносять на предметне скло, чистим шліфованим склом обережно торкаються краплини, і проводять по поверхні предметного скла, «розмазуючи» рідину. Грубі препарати-**зрізи**, виготовлені вручну, без застосування мікротомів, є придатними для приблизного аналізу структур органів і тканин; бувають поздовжніми та поперечними. Ще один тип препарату, який дозволяє вивчати рельєф поверхні непрозорого біологічного об'єкта – це **репліка**. Для отримання репліки на поверхню об'єкта наносять тонкий шар прозорої речовини (можна навіть використовувати прозорий лак для нігтів), чекають висихання – утворення плівки) і відокремлюють його від об'єкта. Отриману таким чином репліку поверхні досліджують під мікроскопом. Препарати-**відбитки** готують шляхом доторкання (впродовж 1-2 секунд) чистого предметного скла до досліджуваної тканини чи органу. Після нанесення препарату на скло його зазвичай висушують, фіксують, при необхідності забарвлюють і піддають аналізу. Особливістю виготовлення **давлених** препаратів є роздавлювання підготовлених біологічних об'єктів між предметним і покривним скельцями безпосередньо перед аналізом препарату. Метою роздавлювання є отримання моношару клітин, що полегшує їх аналіз.

## **Лабораторна робота № 2**

### **Виготовлення тимчасових мікропрепаратів біологічних об'єктів**

**Мета роботи:** ознайомитися з методикою виготовлення різних типів тимчасових мікропрепаратів для дослідження представників еукаріот (царства Рослини, Тварини, Гриби) і прокаріот (Ціанобактерії)

### **Матеріали та обладнання**

Мікроскопи біологічні

Предметні і покривні скельця

Крапельниці з водою

Вітальний барвник – водний розчин метиленового синього

Пінцети

Препарувальні голки

Фільтрувальний папір

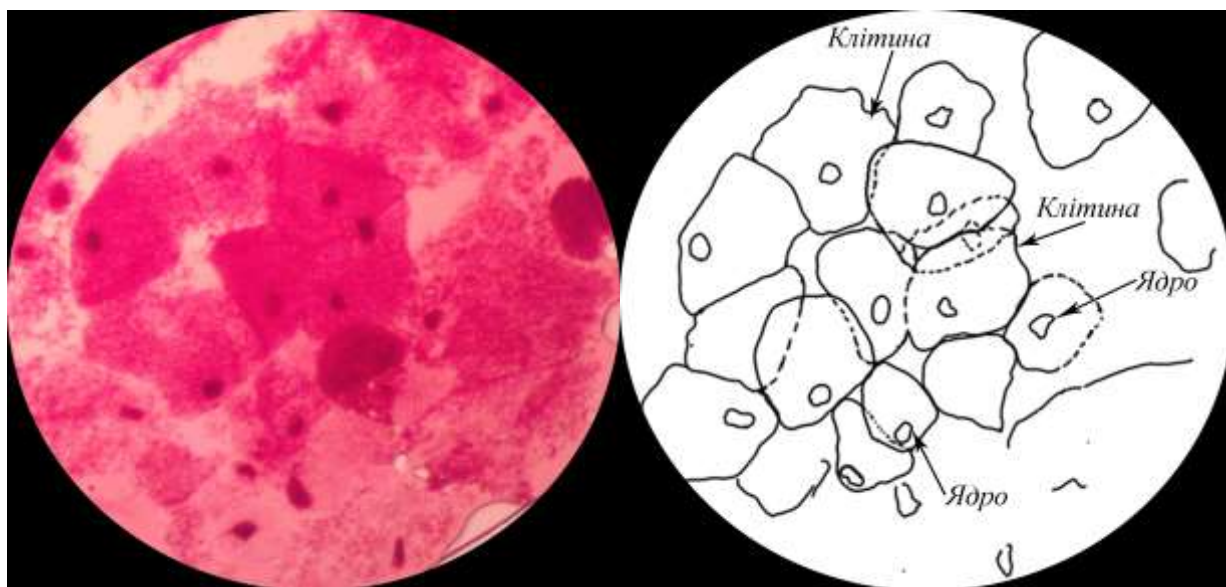
Біологічні об'єкти (тваринні, рослинні, плісняві гриби, синьо-зелені водорості (ціанобактерії))

**Завдання 1.** Виготовити тимчасовий давлений препарат клітин слинних залоз личинки дрізофіли *Drosophila melanogaster*

### **Хід роботи**

1. Підготувати предметне скло, протерти його і нанести краплину фізіологічного розчину посередині, покласти всередину краплини личинку дрізофіли.
2. Обережно за допомогою пінцета і препарувальної голки виділити слинні залози личинки. Прибрати зайві тканини личинки.
3. Нанести краплину оцтоорсеїну (Додаток 3) і почекати 15 хвилин для кращого забарвлення тканини.
4. Обережно фільтрувальним папером відтягнути барвник, нанести на препарат краплину 45 % оцтової кислоти.

5. Тримаючи покривне скло під кутом до краплини, акуратно опустити його на залози.
6. Обережно тупим кінцем препарувальної голки постучати по препарату для розправлення клітин залоз.
7. Зробити замальовки та фотографії, позначити на рисунку окремі клітини слинних залоз та ядра.



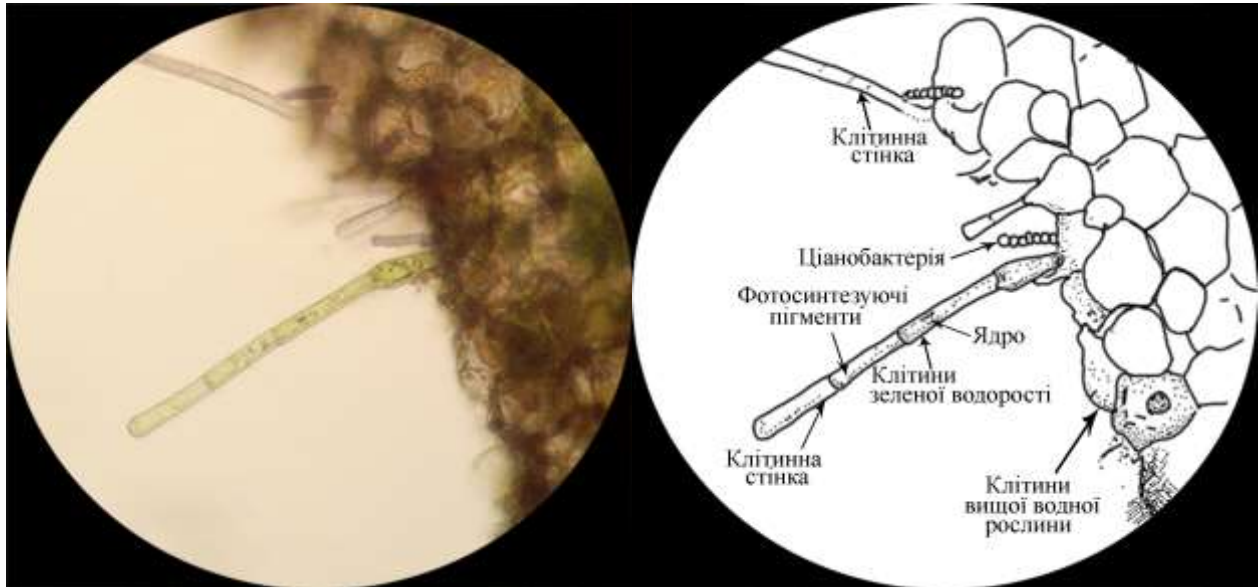
**Рис. 5. Приклади виконання 1 завдання лабораторної роботи № 2**

**Завдання 2.** Виготовити тимчасовий препарат водоростей та ціанобактерій (синьо-зелених водоростей)

### **Хід роботи**

1. Підготувати предметне скло, протерти його і нанести краплину води посередині.
2. Обережно пінцетом взяти шматок талому печінкового моху або іншої водної рослини із акваріуму зі стабільною біотою, розрівняти його і покласти у краплину води.
3. Тримаючи покривне скло під кутом до краплини води, акуратно опустити його на препарат.

4. Уважно розглянути поверхню рослини, шукаючи обростання зеленими та синьо-зеленими водоростями.
5. Зробити замальовки та фотографії, позначити на рисунку клітини, клітинну стінку, звернути увагу на відсутність оформленого ядра у клітинах.
6. Порівняти будову клітин зелених водоростей (еукаріот) та ціанобактерій (прокаріот).

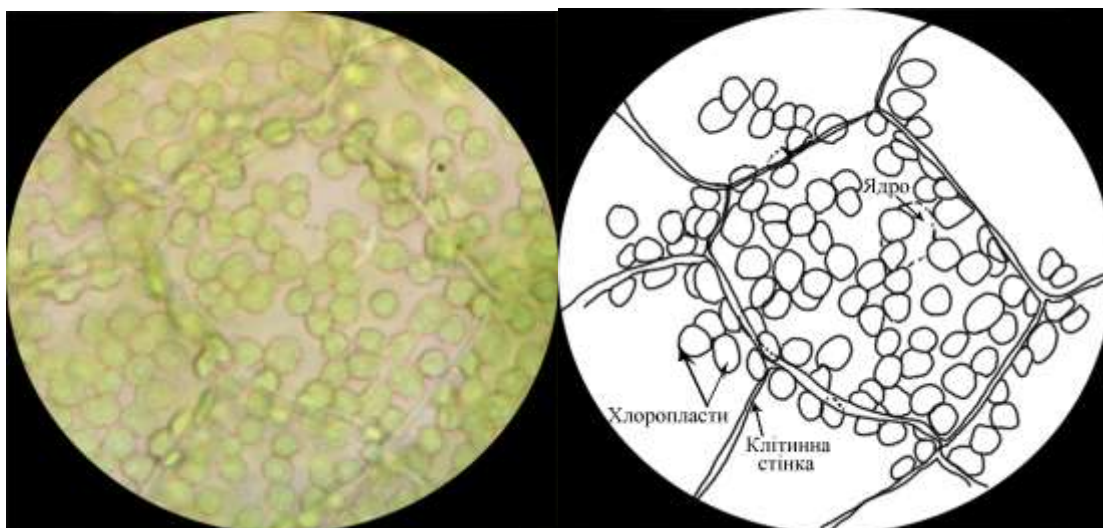


**Рис. 6. Приклад виконання 2 завдання лабораторної роботи № 2**

**Завдання 3.** Виготовити тимчасовий препарат вищої водної рослини *Ceratophyllum spp*

### **Хід роботи**

1. Підготувати предметне скло, протерти його і нанести краплину води посередині.
2. Обережно пінцетом взяти листок роголисніку, розрівняти його і покласти у краплину води.
3. Тримавши покривне скло під кутом до краплини води, акуратно опустити його на препарат.
4. Зробити замальовки та фотографії, позначити на рисунку клітини, хлоропласти, ядра, клітинні стінки, вакуолі.

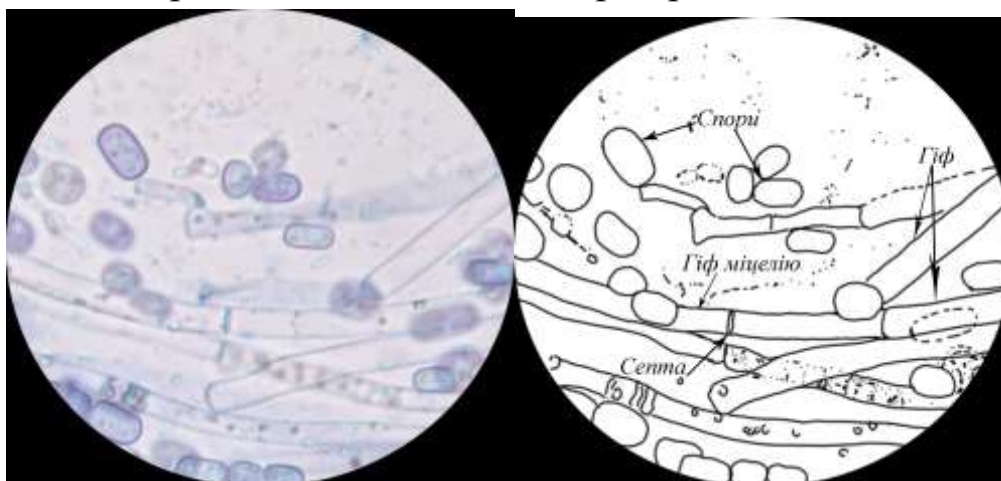


**Рис. 7. Приклад виконання 3 завдання лабораторної роботи № 2**

**Завдання 4.** Виготовити тимчасовий препарат пліснявих грибів  
*Aspergill sp.*

#### **Хід роботи**

1. Підготувати предметне скло, протерти його і нанести краплину води посередині.
2. Обережно пінцетом підхопити частину міцелію з ураженого цвіллю продукту і покласти у краплину води.
3. Додати краплину метиленового синього. Прибрати залишки води і барвника фільтрувальним папером.
4. Тримавши покривне скло під кутом до забарвленого об'єкта, акуратно опустити його на препарат.
5. Зробити замальовки та фотографії, позначити на рисунку гіфи міцелію, ядра, клітинні стінки, спори грибів тощо

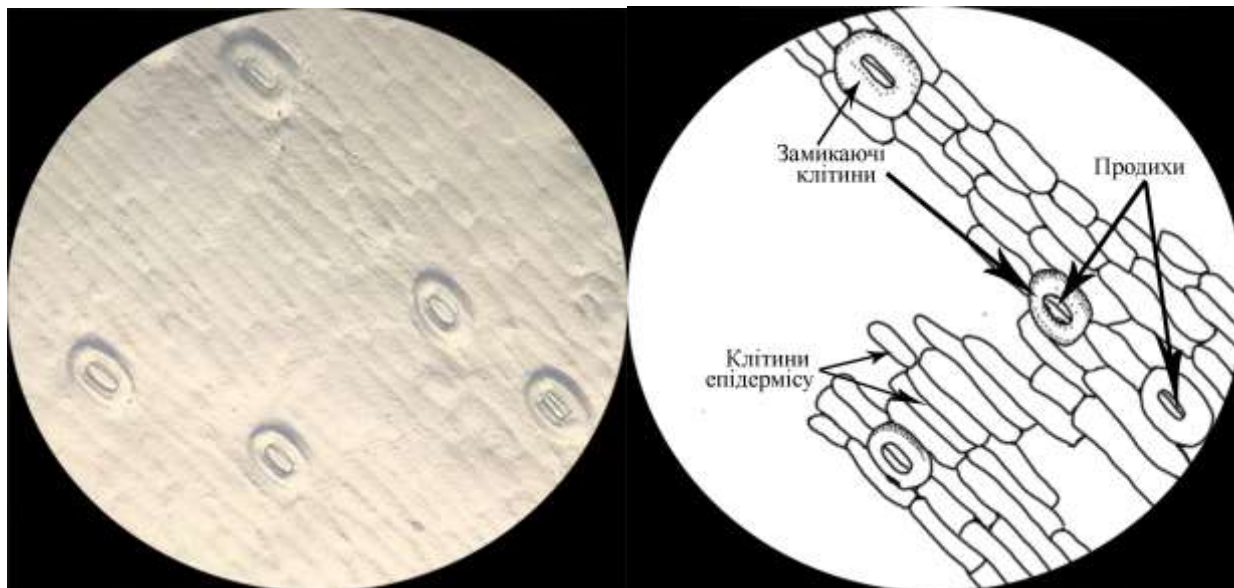


**Рис. 8. Приклад виконання завдання 4 лабораторної роботи № 2**

**Завдання 5.** Виготовити препарат-репліку поверхні листа покритонасінної рослини

### Хід роботи

1. Підготувати лист *Sansevieria sp.* На поверхню листа прикріпити невеличку смугу скотчу (прозорої липкої стрічки).
2. Обережно нанести товстий шар прозорого лаку для нігтів так, щоб шар лаку починався на стрічці скотчу. Дочекатися висихання лаку.
3. Пінцетом підчепити скотч і зняти шар лаку. Покласти його на предметне скло тією стороною, яка була звернута до поверхні листа і обережно розправити отриману плівку.
4. Зробити замальовки та фотографії, позначити на рисунку клітини епідермісу, продихи, замикаючі клітини продихів тощо.
5. Підрахувати кількість продихів у полі зору, звернути увагу на взаємне розташування продихів та жилок листа.



**Рис. 9. Приклад виконання 5 завдання лабораторної роботи № 2**

Зробити висновок про структури клітини, які можна спостерігати у світловий мікроскоп при малому (8×) та великому (40×) збільшенні.

**Питання для підготовки та контролю:**

1. Фіксатори, які використовуються у мікроскопії.
2. Барвники, які використовуються у мікроскопії.
3. Охарактеризуйте тимчасові мікропрепарати.
4. Які типи тимчасових препаратів ви знаєте?
5. Охарактеризуйте постійні мікропрепарати.
6. Перелічить етапи виготовлення постійних мікропрепаратів.
7. Назвіть основні характеристики водних фіксаторів.
8. Назвіть основні характеристики спиртових фіксаторів.
9. Наведіть класифікацію барвників, які використовують у мікроскопії.
10. Охарактеризуйте зв'язок між фіксатором і барвником.

**Література:**

1. Новак В. П., Мельниченко А. П. Цитологія, гістологія, ембріологія: навч. посібник. – Біла Церква, 2005. – 256 с.
2. Білий Р. О., Ковалишин В. І., Челпанова І. В., Єлісеєва О. П., Балущ Л. В., Наконечна О. В., Ященко А. М., Луцик О. Д. Цитологія, ембріологія та загальна гістологія: навчальний посібник-атлас. – Львів: Кварт, 2017. – 59 с.
3. Варенюк І.М., Держинський М.Е. Методи цитогістологічної діагностики: навчальний посібник. – Київ: Інтерсервіс, 2019. – 256 с..

### ТЕМА 3. Біологічні мембрани. Вакуолярна система клітини

#### Теоретичні відомості

Усі клітини, що існують у сучасному світі, оточені плазматичною мембраною, яка складається із амфіпатичних молекул, для яких властива гідрофільність однієї частини і гідрофобність іншої. Коли такі молекули потрапляють у воду, вони розташовуються так, що їх гідрофобні частини приходять до тісного контакту одна з одною, а гідрофільні частини – до контакту з водою. Такі молекули здатні спонтанно агрегувати, утворюючи двошарові структури у вигляді маленьких замкнених пухирців, які ізолюють водний вміст від зовнішнього середовища.

Вважають, що формування зовнішньої мембрани було однією із вирішальних подій, які призвели до утворення першої клітини, тому що відбір молекул генетичних кислот за якістю білків, які вони кодують (і, відповідно, їх еволюція) не міг початися раніше, ніж з'явився певний замкнений простір (компартмент).

Компартмент – це ділянка клітини, що обмежена біологічною мембраною, у якій відбуваються специфічні для даного компартменту біохімічні процеси. Таким чином, більшість органел в еукаріотичній клітині є компартментами, хоч і не кожен компартмент є органелою. У прокаріот компартментом можна вважати увесь вміст клітини, який, у свою чергу, може бути поділений на мікрокомпартменти. Сутність компартменталізації полягає у збільшенні ефективності біохімічних процесів.

Складність будови мембран – одна із головних особливостей усіх клітин. Мембрани оточують **ядро, мітохондрії та хлоропласти** (у рослин). Вони утворюють лабіринти **гладкого та шорсткого ендоплазматичних ретикулумів**, в яких синтезуються ліпіди і мембранні білки, а також інші матеріали, призначені для експорту із клітини. Вони формують пласкі стопки пухирців-цистерн, з яких складається **апарат Гольджі**, що приймає участь у синтезі, модифікаціях та транспорті різноманітних органічних

молекул. Мембрани оточують **лізосоми**, які містять запас ферментів, необхідних для внутрішньоклітинного травлення і тим самим захищають клітину від дії цих ферментів. Мембранними пухирцями є і **пероксисоми**, в яких у процесі окиснення різних молекул утворюються і розкладаються небезпечні високореакційно здатні пероксиди. Також завдяки мембранам утворюються маленькі **везикули** (пухирці) та великі, заповнені рідиною **вакуолі**. Саме на мембранах відбувається ряд найважливіших реакцій, які пов'язані з надходженням у клітину сировини для метаболізму та виходом відповідних продуктів у зовнішньоклітинний простір. Між внутрішньоклітинними, оточеними мембранами структурами і зовнішньоклітинним середовищем відбувається обмін, який здійснюється завдяки двом унікальним для еукаріотичних клітин процесам – **ендоцитозу** і **екзоцитозу**. При ендоцитозі деякі ділянки зовнішньої поверхневої мембрани вп'ячуються і відриваються, утворюючи мембранні пухирці (**ендосоми**), що містять речовини, які до того знаходилися у зовнішньому середовищі або були адсорбовані на поверхні клітини. Таким чином у цитоплазму можуть потрапити досить великі частинки і навіть цілі клітини (**фагоцитоз**). Екзоцитоз – зворотній процес, при якому внутрішньоклітинні мембранні пухирці зливаються з плазматичною мембраною, вивільнюючи у такий спосіб свій вміст у зовнішнє середовище.

Згідно з сучасним уявленням, усі одномембранні органели, різноманітні за будовою і функціями (ендоплазматичний ретикулум, апарат Гольджі, лізосоми, ендосоми, секреторні вакуолі, транспортні везикули), які виконують загальні функції синтезу, перебудови (модифікації), сортування і виведення (експорту) із клітини біополімерів, головним чином білків-глікопротеїдів, а також функцію синтезу мембран цієї системи і плазматичної мембрани, об'єднані у **вакуолярну систему**. Вакуолярна система має одне джерело утворення (гранулярний ендоплазматичний ретикулум. Для неї властиві кооперативність

функціонування, взаємозв'язок і послідовність етапів утворення, перебудови, транспорту і експорту синтезованих біополімерів.

Дослідження функціонування вакуолярної системи клітини були відмічені двома Нобелівськими преміями. У 2013 році Ренді Шекман, Томас Зюдгоф і Джеймс Ротман отримали Нобелівську премію за відкриття механізмів регуляції везикулярного транспорту – основної транспортної системи еукаріотичних клітин. У 2016 році Йосинорі Осумі було нагороджено Нобелівською премією за відкриття механізмів автофагії – процесу перетравлення клітиною власних органел та ділянок цитоплазми за допомогою лізосом.

### **Лабораторна робота № 3**

#### **Явище плазмолізу і деплазмолізу в клітинах шкірки *Allium* *cepa* L.**

Цитоплазматична мембрана живої клітини є еластичною і напівпроникною. При втраті води об'єм цитоплазми зменшується, а при надходженні води збільшується до початкового. Ця властивість дозволяє клітинам переносити тимчасове зневоднення і підтримувати сталість свого складу. З властивостями еластичності і напівпроникності цитоплазматичної мембрани рослинних клітин можна ознайомитися на досліді з плазмолізу і деплазмолізу.

Плазмоліз – штучно викликане відставання протопласту клітини від жорсткої клітинної оболонки. Деплазмоліз – зникнення плазмолізу. Плазмоліз можна викликати, занурюючи клітину в розчин солі або цукру, концентрація якого вище концентрації клітинного соку (**гіпертонічний розчин**).

Якби цитоплазматична мембрана була повністю проникною, то відбувалося б вирівнювання концентрацій клітинного соку і гіпертонічного розчину шляхом дифузного переміщення води і розчинених речовин з клітини в розчин і назад. Однак цитоплазматична мембрана, маючи властивість напівпроникності, не пропускає всередину клітини розчинені у воді речовини. Навпаки, вода, згідно із законами осмосу, буде висмоктуватися гіпертонічним

розчином з клітини. Об'єм вакуолі рослинної клітини зменшується і внаслідок цього процесу протопласт клітини відстає від клітинної оболонки спочатку у куточках, потім у багатьох місцях з утворенням увігнутих поверхонь (**увігнутий плазмоліз**), а потім протопласт приймає округлу форму (**опуклий плазмоліз**). При зануренні плазмолізованої клітини у воду або гіпотонічний розчин спостерігається деплазмоліз – відновлення вихідного стану клітини.

**Мета роботи:** вивчити здатність цитоплазми живої клітини до плазмолізу завдяки напівпроникності клітинної мембрани.

### **Матеріали та обладнання**

Мікроскопи біологічні

Предметні і покривні скельця

Крапельниці з водою

Спиртівка

Пінцети

Препарувальні голки

Фільтрувальний папір

Цибуля з антоціановим забарвленням лусок

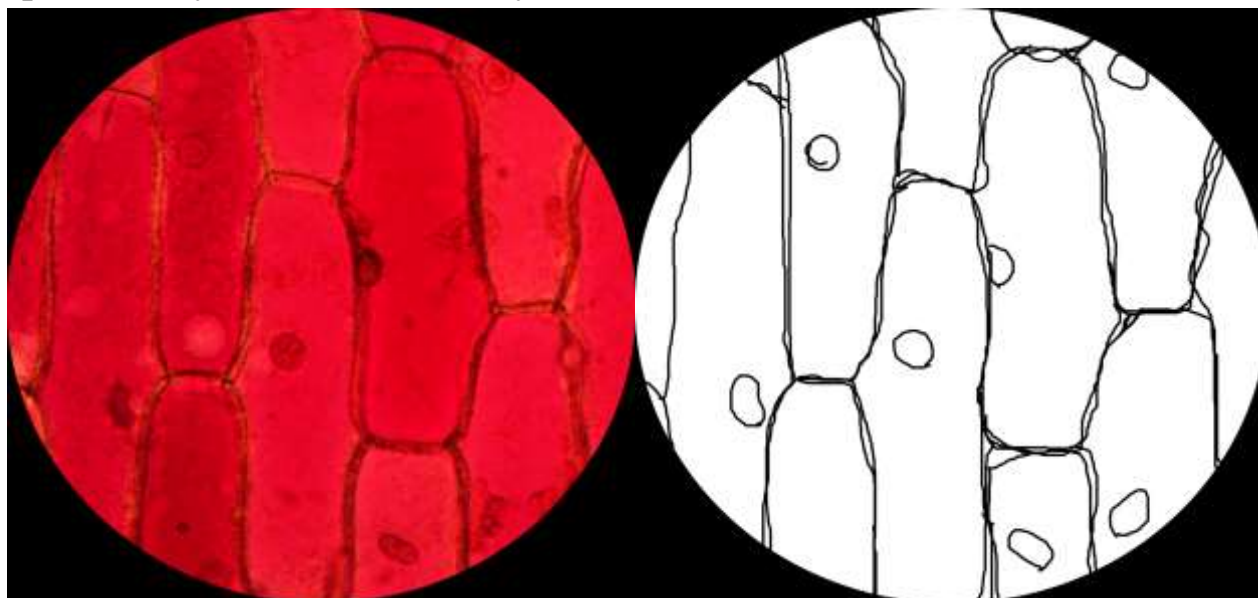
Концентрований розчин NaCl

### **Хід роботи**

1. Обережно зняти тонкий шар забарвленого епідермісу цибулі, помістити його в краплю води на предметному склі. Розправити епідерміс препарувальними голками і накрити покривним склом. Так як концентрація речовин у клітинному соці вища за концентрацію зовнішнього (гіпотонічного) розчину, за рахунок ендоосмосу в клітинах виникає тургор (тиск цитоплазми на клітинну стінку). Необхідно зробити замальовки або фотографії інтактних тургорних клітин цибулі (рис. 10).

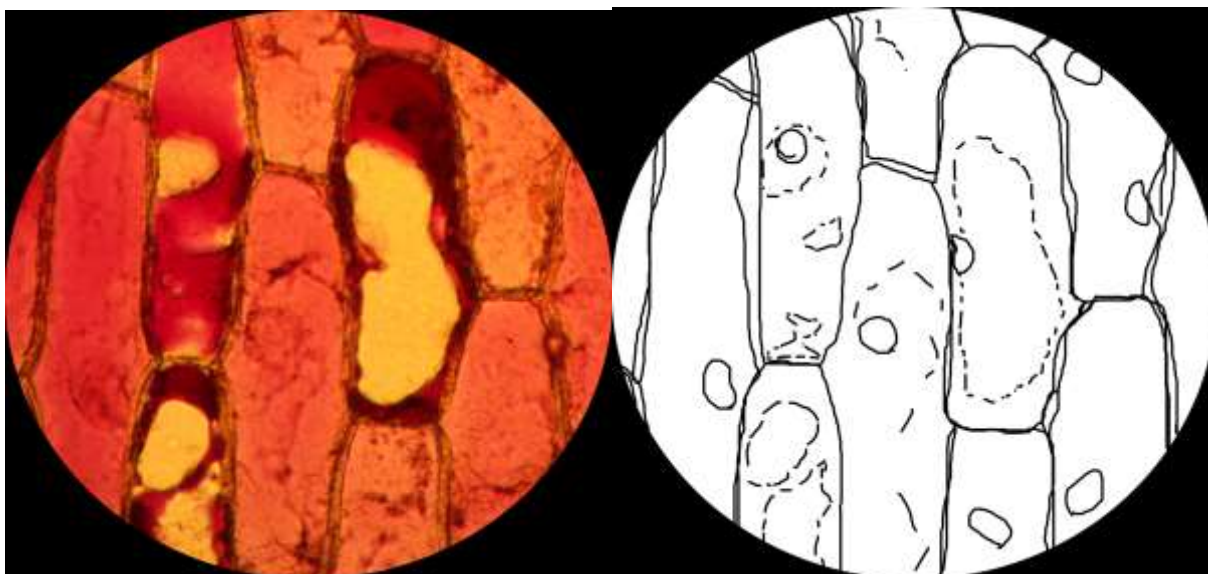
2. Залишаючи препарат під мікроскопом, замінюють воду на концентрований розчин солі. Для цього фільтрувальним папером відтягують воду з одного боку препарату, а на протилежний бік додають декілька краплин насиченого розчину NaCl. Так як

концентрація зовнішнього розчину буде більше концентрації клітинного соку, вода починає виходити з вакуолей, а цитоплазма відділятися від клітинних стінок спочатку в куточках (кутовий плазмоліз), а потім – на всьому протязі, приймаючи округлу форму. Після спостережень роблять замальовки або фотографії клітин з різним ступенем плазмолізу.



**Рис. 10. Клітини епідермісу цибулі сорту Алеко**

3. Препарат з ознаками деплазмолізу піддають дії дистильованої води за зазначеною раніше процедурою і спостерігають явище деплазмоліз – процес повернення протопласта кліток рослин зі стану плазмолізу в початковий стан, якому властивий нормальний тургор (рис. 11).



**Рис. 11. Плазмолізовані клітини епідермісу цибулі сорту Алеко**

4. Клітини цибулі вбивають, прогріваючи над спиртівкою, не допускаючи повного випаровування води. Препарат охолоджують, воду відтягують фільтрувальним папером, наносять краплю концентрованого розчину солі і спостерігають відсутність деплазмолізу.

5. Зробити висновок про властивості біологічних мембран, завдяки яким забезпечені ті явища, які спостерігалися в досліді.

### **Питання для підготовки та контролю:**

1. Важливість компартменталізації для функціонування живої клітини.
2. Будова і функції клітинної мембрани.
3. Транспорт крізь клітинну мембрану: молекулярний .
4. Транспорт крізь клітинну мембрану: везикулярний.
5. Загальна схема функціонування вакуолярної системи клітини.
6. Складові вакуолярної системи, їх будова і функції.
7. Патології вакуолярної системи.
8. Що таке плазмоліз?
9. Осмотичний тиск та явище тургора у рослинних клітинах.

### **Література:**

1. Трускавецький Э. С. Цитологія: підручник. – К. Вища школа, 2004. – 254 с.
2. Lodish H., Besk A., Zupursky S. L., Matsudaira P., Balksimore D., Darnell J. Molecular cell biology. 6<sup>th</sup> edition. L.: Freeman, W. H. & Company, 2007. — 1150 p.
3. Plopper G., Sharp D., Sikorski E. (Eds.) Lewin's Cells. Jones and Bartlett Learning, 2015. — 1080 p.

## **ТЕМА 4. Біологічний цитологічний дослід. Цитометрія клітин. Комп'ютерні програми**

### **Теоретичні відомості**

Просте спостереження препаратів у мікроскоп є важливим методом, проте недостатнім для отримання об'єктивних даних, особливо при порівняльних дослідженнях. Важливо, щоб отримані результати були об'єктивними, а не суб'єктивними, тобто тими, що залежать від конкретного дослідника. Такі можливості надають сучасні комп'ютерні програми, які здатні аналізувати отримані цифрові зображення.

Наприкінці 90-х років минулого віку у США агентство National Institutes of Health виступило з ініціативною розробки програми, яка могла б проводити автоматичний аналіз візуальних даних і була загальносуспільним надбанням, тобто була безкоштовною для усіх. Така програма з відкритою архітектурою була розроблена у 1997 році Вейном Расбандом (Wayne Rasband) у дослідницькому відділенні Національного інституту психіатрії в Бетесді, Меріленд і отримала назву ImageJ. Модернізація цієї програми силами користувачів продовжується й зараз. Оскільки програма розроблена на Java, вона є незалежною від операційної системи і може працювати на більшості платформ: MS Windows, Mac Os, Linux. Деякі модифікації виділилися у самостійний продукт, наприклад, Fiji (Fiji is just ImageJ), й розвиваються паралельно.

Fiji – дистрибутив ImageJ, який орієнтований на роботу з медико-біологічними зображеннями. Програма дозволяє отображати, редагувати, аналізувати, зберігати і друкувати 8-, 16- і 32-бітні зображення. У Fiji можна працювати з більшістю форматів зображення (\*.jpeg, \*.bmp, \*.tiff, \*.png, \*.gif та ін.). Серед можливостей програми – проведення вимірів, розрахунків площин, статистичні показники піксельних значень різних виділених областей інтересу на зображеннях, виділення даних областей вручну або за допомогою порогових функцій. Взагалі дана програма дуже

пластична і має величезну кількість налаштувань. У мережі Інтернет, окрім «офіційних сайтів» [rsbweb.nih.gov](http://rsbweb.nih.gov) та [imagejdocu.tudor.lu](http://imagejdocu.tudor.lu) знаходиться безліч відеороликів з навчальними матеріалами та інших публікацій, які зможуть стати у пригоді для розширення уявлення про можливості аналізу зображень, отриманих за допомогою мікроскопа.

Використання смартфонів для отримання зображень мікроскопічних об'єктів та комп'ютерних програм для аналізу цих зображень може стати потужним інструментом у зацікавленні учнів старшого шкільного віку в дослідженні мікроміру та застосуванні отриманих на уроках біології знань у повсякденному житті.

### **Лабораторна робота № 4**

#### **Цитометрія рослинних клітин**

**Мета роботи:** за допомогою комп'ютерної програми аналізу зображень провести порівняльне дослідження розмірів ядер та ядерцець у клітин, які знаходяться на різних стадіях клітинного циклу.

#### **Матеріали та обладнання**

Мікроскоп з системою цифрової візуалізації

Об'єкт-мікрометр ОМП 0,01 мм

Калібровочна фотографія лінійки об'єкт-мікрометра, зроблені для об'єктива 40×

Мікрофотографії клітин археспорію м'якої пшениці (інтерфаза), отримані для об'єктива 40×

Мікрофотографії мікроспороцитів м'якої пшениці (профаза I мейозу), отримані для об'єктива 40×

Персональні комп'ютери з передвстановленою програмою ImageJ у версії Fiji

#### **Хід роботи**

1. За допомогою обладнаного камерою мікроскопа зробити фотографії клітин чоловічих генеративних структур м'якої озимої

пшениці на різних стадіях розвитку пиляків на збільшенні об'єктива 40×. Важливо зберігати фотографії у форматах «bmp», «png» або «tiff», які забезпечують належну якість фотографії для її подальшого аналізу засобами комп'ютерного забезпечення. При цьому ж збільшенні необхідно сфотографувати лінійку об'єкт-мікрометра ОМП 0,01 мм. Об'єкт-мікрометр – це предметне скло з мікрометричною сіткою (калібрувальною лінійкою). Воно призначено для калібрування мікроскопа або цифрової камери для мікроскопа при вирахуванні лінійних розмірів об'єкта, який досліджують під мікроскопом. Ціна поділку калібрувальної лінійки складає 10 мкм. Потрібно пам'ятати, що при роботі з об'єктивами 40× і вище необхідно враховувати товщину рисок поділків, тому при визначенні еталонної відстані потрібно використовувати відстань між лівою стороною лівої риски і лівою стороною правої риски. Окрім того, при визначенні еталонної відстані бажано використовувати максимальну кількість поділків у полі зору – це зменшить похибку калібрування і, відповідно, похибку усіх наступних вимірів.

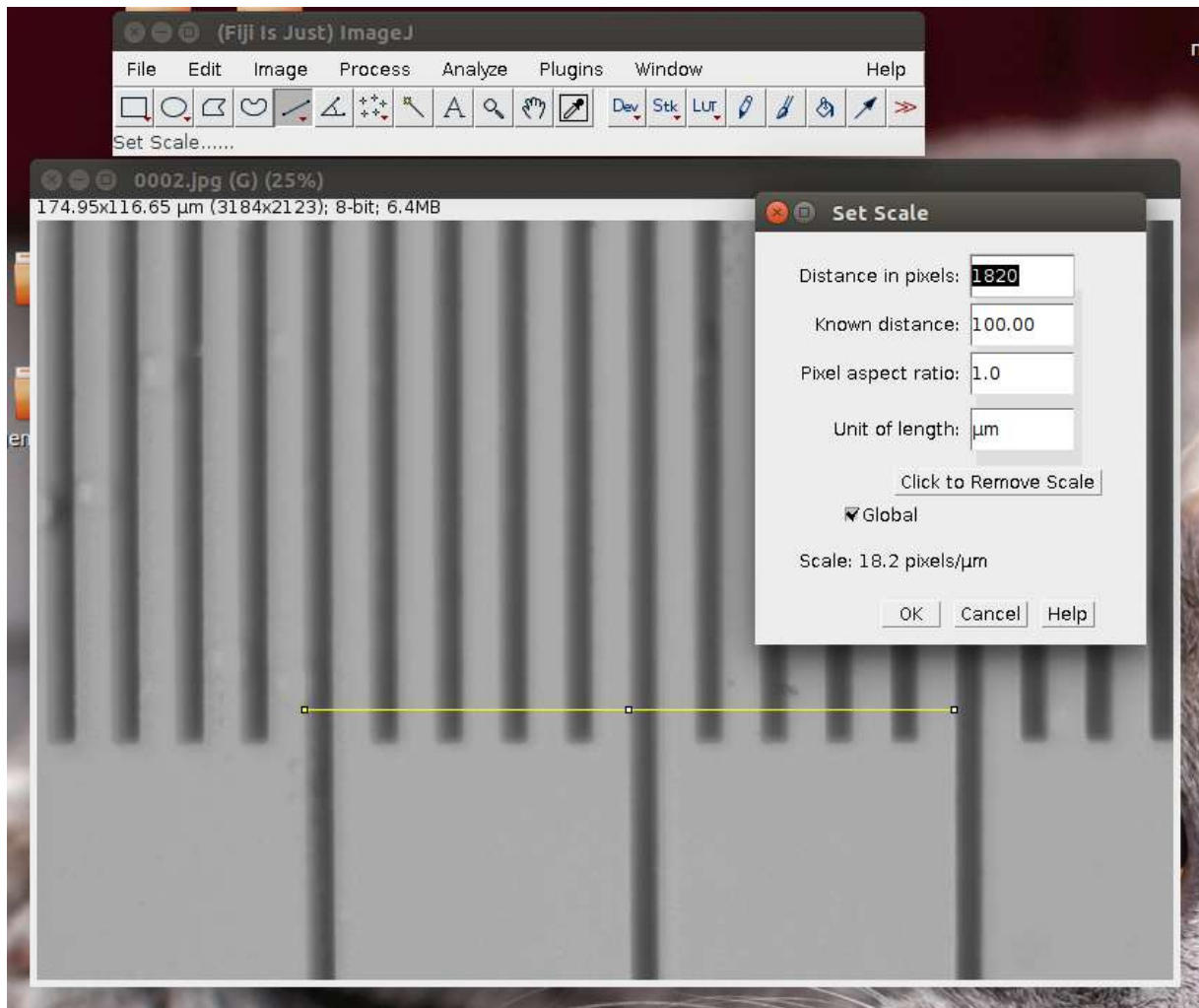
2. Запустити програму Fijі. Загрузити у програму фото лінійки об'єкт-мікрометра для проведення калібрування. Здійснити калібрування для перерахунку кількості одиниць-пікселів у мікрометрі. Калібрування проводиться наступним чином:

2.1. Перш за все необхідно відкрити меню «Image», вибрати пункт меню «Type» і встановити режим «8-bit». Програма автоматично переведе кольорову фотографію у режим «Greyscale», необхідний для здійснення коректного аналізу.

2.2. Потім, використовуючи інструмент «Stright», провести пряму лінію (для того, щоб лінія була дійсно прямою, потрібно утримувати клавішу «Shift») від першої обраної риски до другої обраної риски (рис. 12), що складає у даному випадку 100 мкм. Після цього необхідно відкрити вкладку «Analyze» і вибрати у меню строку «Set scale» (рис. 12).

2.3. У першому пункті меню «Set scale» «Distance in pixels» вказана автоматично визначена довжина лінії у пікселях (у даному випадку – 1820 пікселей). У наступному пункті меню – «Known distance» –

необхідно вказати довжину лінії у мікрометрах. Її визначають, пам'ятаючи, що ціна поділку калібрувальної лінійки об'єкт-мікрометра дорівнює 10 мкм. Третій пункт «Pixel aspect ratio» визначає співвідношення довжини і висоти зображення у пікселях, яке повинно дорівнювати 1,0 і встановлюється автоматично. Останній пункт меню «Unit of length» визначає одиниці виміру. Для вибору мкм необхідно ввести символи «um».



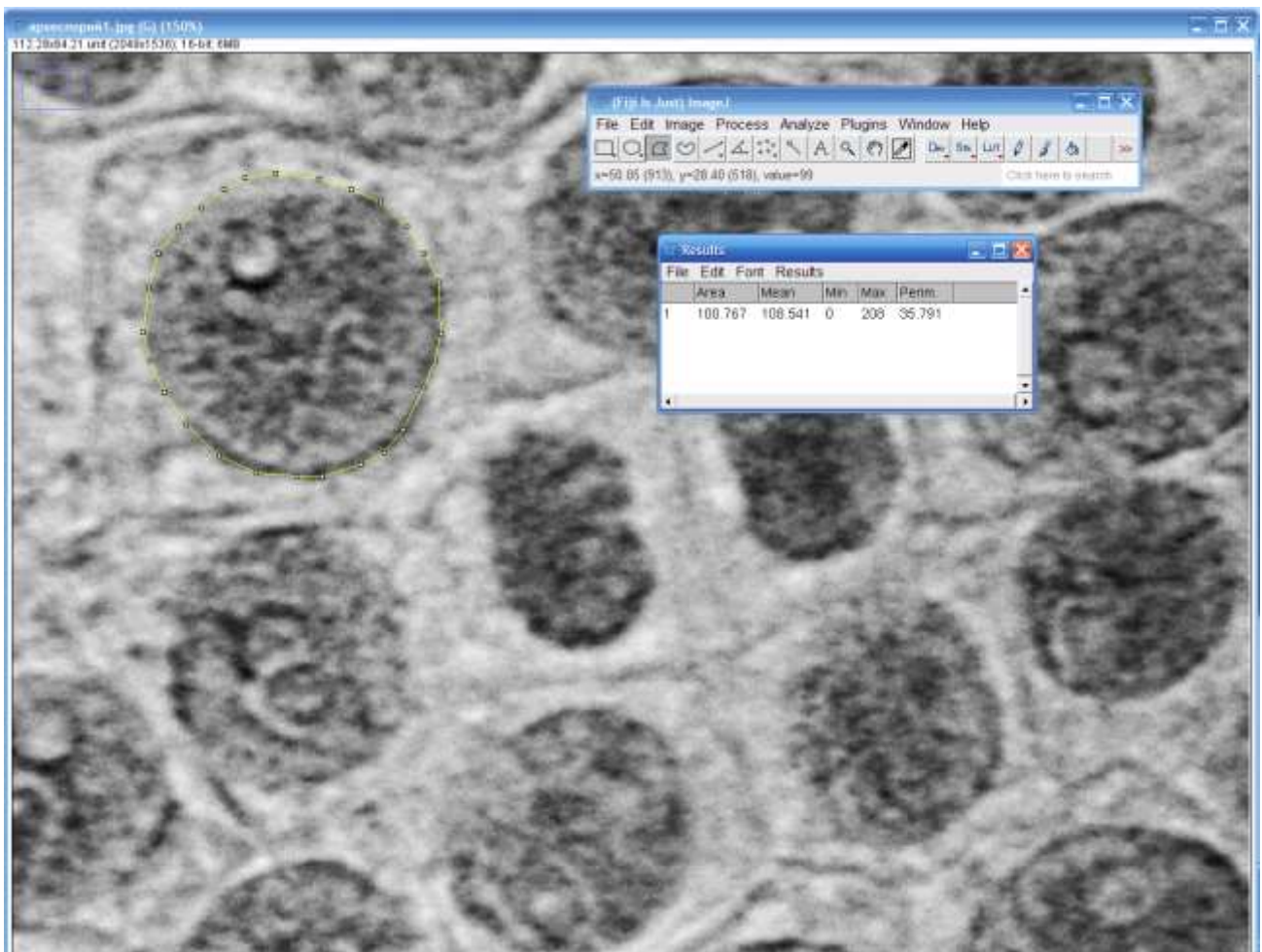
**Рис. 12. Скріншот програми Fiji: калібрування об'єктива мікроскопа (пояснення у тексті)**

2.4. Для подальшого використання даного калібрування в аналізі серії зображень необхідно в меню «Set scale» встановити галочку в пункті «Global». Це збереже настройки і дозволить використовувати їх в подальшій роботі.

3. Провести вимірювання площини ядер і ядерець клітин чоловічих генеративних структур м'якої озимої пшениці на різних стадіях розвитку пиляка.

3.1. Вимірювання площі клітин відбувається наступним чином: у програмі Фіжі відкривають мікрофотографію препарату археспоріальних клітин (рис. 13) і переводять її у 8-бітне зображення (пункт 2.1)

3.2. За допомогою інструменту «Polygon selections» виділити – обвести ядро по периметру. Замкнути виділення (рис. 13).

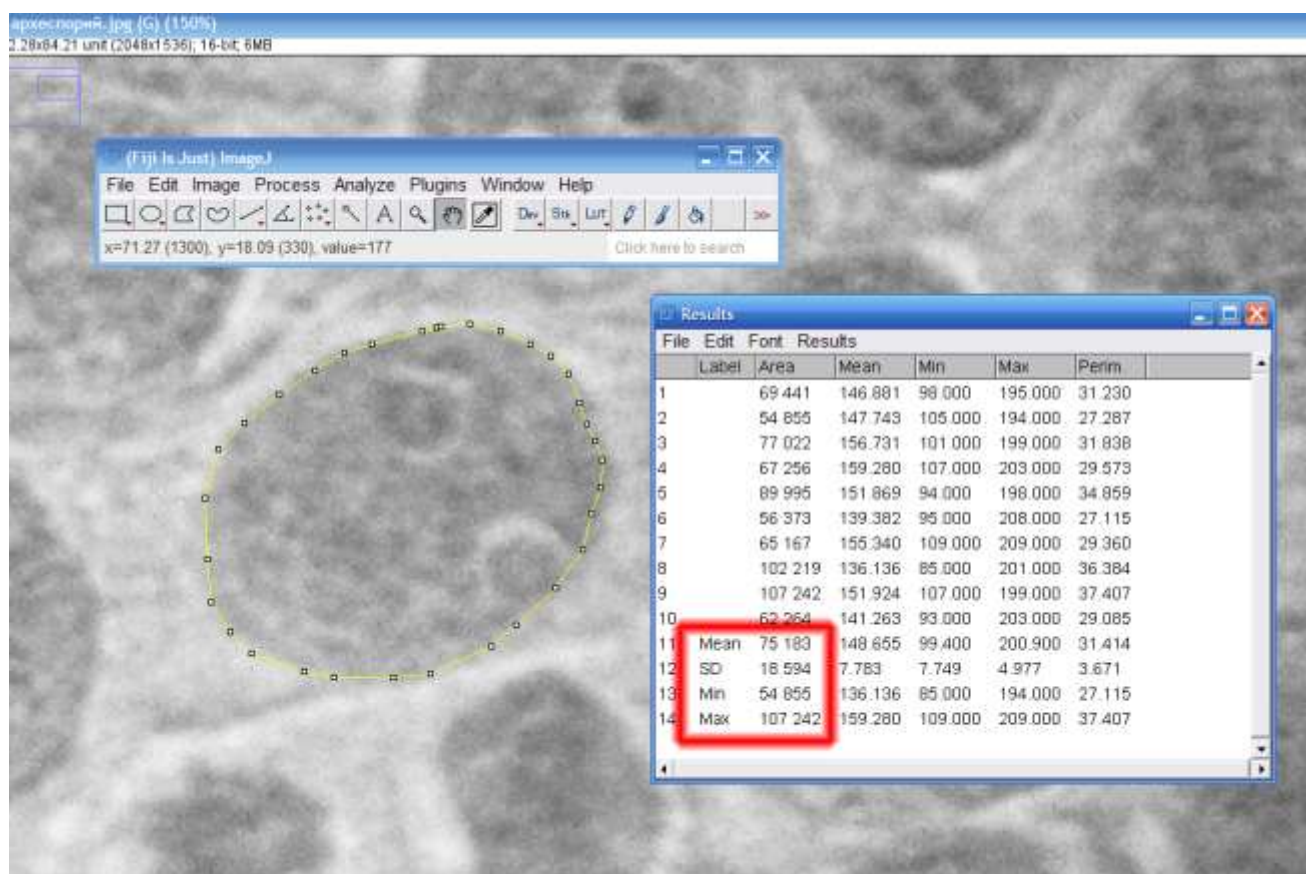


**Рис. 13. Скріншот програми Фіжі: вимірювання площі ядра клітини археспорію м'якої озимої пшениці (пояснення у тексті)**

3.3. Вибрати меню Analyze-Measure (або натиснути на клавіатурі комбінацію Ctrl-M). З'явиться віконце «Results», в якому будуть наведені результати автоматично проведених розрахунків. Серед

показників нас цікавить перша колонка – «Area» – «Площина» (рис. 13).

3.4. За наведеним вище алгоритмом вимірюють 10 клітин археспорію (меристематична тканина молодих пиляків покритонасінних рослин). Після проведення останнього виміру необхідно зняти показники. Для цього у відкритому вікні «Results», де відображені усі виміри, необхідно вибрати строку меню «Results» і у ньому вибрати пункт «Summarize». За цією командою для кожного з розрахованих показників програма визначить середнє значення, стандартне відхилення і вкаже максимальний і мінімальний варіанти (рис. 14, червоне виділення). Для того, щоб зберегти результати вимірів у файл Excel або OpenOffice, необхідно у відкритому файлі «Results» вибрати пункт «Save as» і задати шлях збереження файлу.



**Рис. 14. Скріншот програми Fiji: розрахунок статистичних показників площі ядра клітини археспорію м'якої озимої пшениці (пояснення у тексті)**

3.5. У тій же послідовності провести виміри площі ядерець клітин археспорію м'якої пшениці і отримати середнє значення та стандартне відхилення площі ядерець

4. Після завершення роботи з фотографіями клітин археспорію м'якої пшениці, необхідно повторити усю процедуру (загрузка, вимірювання площин, розрахунок середніх значень та стандартного відхилення площин ядер та ядерець клітин на наступній стадії розвитку – мікроспороцитів I порядку м'якої пшениці. Ці клітини знаходяться у профазі I мейозу. Для них характерне збільшення об'єму ядра, активна робота ядерець, конденсація та спіралізація хроматину.

5. Після проведення розрахунків засобами програми Fijі необхідно заповнити наступну таблицю, в яку вносять розраховані параметри для кожного з чотирьох проаналізованих масивів даних (табл. 1).

Таблиця 1

**Каріометричні показники археспоріальних клітин та мікроспороцитів м'якої пшениці**

| Показники                                           | Археспорій | Мікроспороцити |
|-----------------------------------------------------|------------|----------------|
| <b>Ядра клітин</b>                                  |            |                |
| Кількість клітин, шт                                | 10         | 10             |
| Середня арифметична площі ядер, мкм <sup>2</sup>    | 75183      | 144954         |
| Середньоквадратичне відхилення                      | 18594      | 19992          |
| <b>Ядерця клітин</b>                                |            |                |
| Кількість клітин, шт.                               | **         | **             |
| Середня арифметична площі ядерець, мкм <sup>2</sup> | **         | **             |
| Середньоквадратичне відхилення                      | **         | **             |

6. Дослідник має право стверджувати, що визначені ним показники подібні або різняться одне від одного лише після

проведення статистичного аналізу, який покликаний встановити вірогідність відмінностей між розрахованими показниками, які характеризують групи, що порівнюються. Отримавши первинні дані по площинам ядер і ядерець клітин м'якої пшениці на різних етапах розвитку пиляка, студенти повинні визначити вірогідність відмінностей за допомогою обраного статистичного критерію, наприклад, критерію Крамера-Уелча.

Критерій Крамера-Уелча базований на використанні статистичних показників, у даному випадку це середні арифметичні та показники середньоквадратичного відхилення для чотирьох масивів (площі ядер і ядерець археспоріальних клітин, площі ядер і ядерець мікроспороцитів) (дані табл. 1).

Як і інші статистичні критерії, він є статистичним правилом, за яким приймається чи відкидається нульова гіпотеза. Нульова гіпотеза формулюється так: середні арифметичні генеральних сукупностей, з яких узяті вибірки, не розрізняються – це означає, що за нульовою гіпотезою, незважаючи на різні стадії клітинного циклу, площа ядер і ядерець у археспорію і мікроспороцитів повинна бути однаковою. Статистична перевірка повинна підтвердити чи відкинути це твердження. Для цього розраховують фактичне значення критерію ( $t_{\text{факт}}$ ) і порівнюють його з критичним значенням ( $t_{\text{кр}}$ ). Критичні значення для критерію Крамера-Уелча залежать лише від рівня значущості  $\alpha$ . Для рівня значущості 0,05 і довірчої ймовірності  $P = 0,95$ , які є придатними для більшості біологічних досліджень, приймають критичне значення  $t_{\text{кр}} = 1,96$ .

Правило прийняття рішення для критерію Крамера-Уелча таке: якщо  $T_{\text{факт}} \leq t_{\text{кр}}$ , то нульова гіпотеза про рівність генеральних середніх залишається чинною, різниця між вибірковими середніми вважається випадковою. Якщо  $T_{\text{факт}} > t_{\text{табл}}$ , то нульова гіпотеза відхиляється на прийнятому рівні значущості  $\alpha$ , різниця між вибірковими середніми вважається вірогідною.  $T_{\text{факт}}(0,05) = t_{\text{кр}}(0,05; \infty) = 1,96$ .

7. Розрахунок критерію Крамера-Уелча для площі ядер проводять за формулою:

$$T = \frac{\sqrt{mn}(\bar{x} - \bar{y})}{\sqrt{ns_x^2 + ms_y^2}} = T = \frac{\sqrt{n_1 n_2}(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}},$$

де для першої вибірки (клітини археспорію)  $n_1 = 10$  клітин,  $\bar{x}_1 = 75183$ ,  $s_1 = 18594$ , а для другої вибірки (мікроспороцити) ці показники відповідно складуть  $n_2 = 10$ ,  $\bar{x}_2 = 144954$ ,  $s_2 = 19992$ .

$$T = \frac{\sqrt{n_1 n_2}(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}} = \frac{\sqrt{10 \times 10}(75183 - 144954)}{\sqrt{10 \times 18594^2 + 10 \times 19992^2}} = -8,08$$

8. Оскільки отримане значення за абсолютною величиною (8,08) є більшим, ніж 1,96, то нульова гіпотеза відкидається. На рівні значущості 0,05 можна стверджувати, що відмінності між вибірками є не випадковими і зробити висновок про те, що перехід клітин археспорію до профазі I мейозу супроводжується вірогідним збільшенням площі ядер майже у два рази.

9. За наведеним алгоритмом визначити вірогідність відмінностей для показників площі ядерця клітин м'якої озимої пшениці на двох послідовних стадіях клітинного циклу і зробити висновок про напрямок змін площі ядерця досліджуваних клітин протягом клітинного циклу.

### **Питання для підготовки та контролю:**

1. Спостереження та експеримент як методи пізнання у біології.
2. Комп'ютерна цитометрія і цитофотометрія.
3. Отримання цифрових зображень.
4. Методи цифрової обробки зображень.
5. Доступні програми аналізу цифрових зображень – ImageJ, FiJi.
6. Калібрування об'єктивів для проведення цитометричних досліджень.
7. Що таке первинні дані у експерименті?
8. Обґрунтуйте необхідність статичної обробки даних при проведенні біологічного експерименту.

### **Література:**

1. Колесников О. В. Основи наукових досліджень. 2-ге вид. випр. та доп. Навч. посіб.– К.: Центр учбової літератури, 2011. – 144 с.
2. Трускавецький Є. С. Цитологія. К.: Вища школа. – 2004. – 256 с.
3. Dougherty G. Digital image processing for medical applications. – Cambridge University Press. – 2009. – 485 p.
4. Lodish H., Besk A., Zupursky S. L., Matsudaira P., Balksimore D., Darnell J. Molecular cell biology. 6<sup>th</sup> edition. L.: Freeman, W. H. & Company, 2007. — 1150 p.
5. Plopper G., Sharp D., Sikorski E., Lewin B. Lewin's cells. — 3rd ed. – USA. : Courier Companies, 2015. – 1056 p.

### **Перелік корисних on-line ресурсів**

6. ImageJ: Image processing and analysis in java. – Електр. дан. – Режим доступу: <https://imagej.nih.gov/ij/> : (дата звернення 01.02.2022). – Загол. з екрана.
7. Fiji. – Електр. дан. – Режим доступу: <https://fiji.sc/> : (дата звернення 01.02.2022). – Загол. з екрана.

## ТЕМА 5. Компактизація хроматину. Морфологія хромосом

### Теоретичні відомості

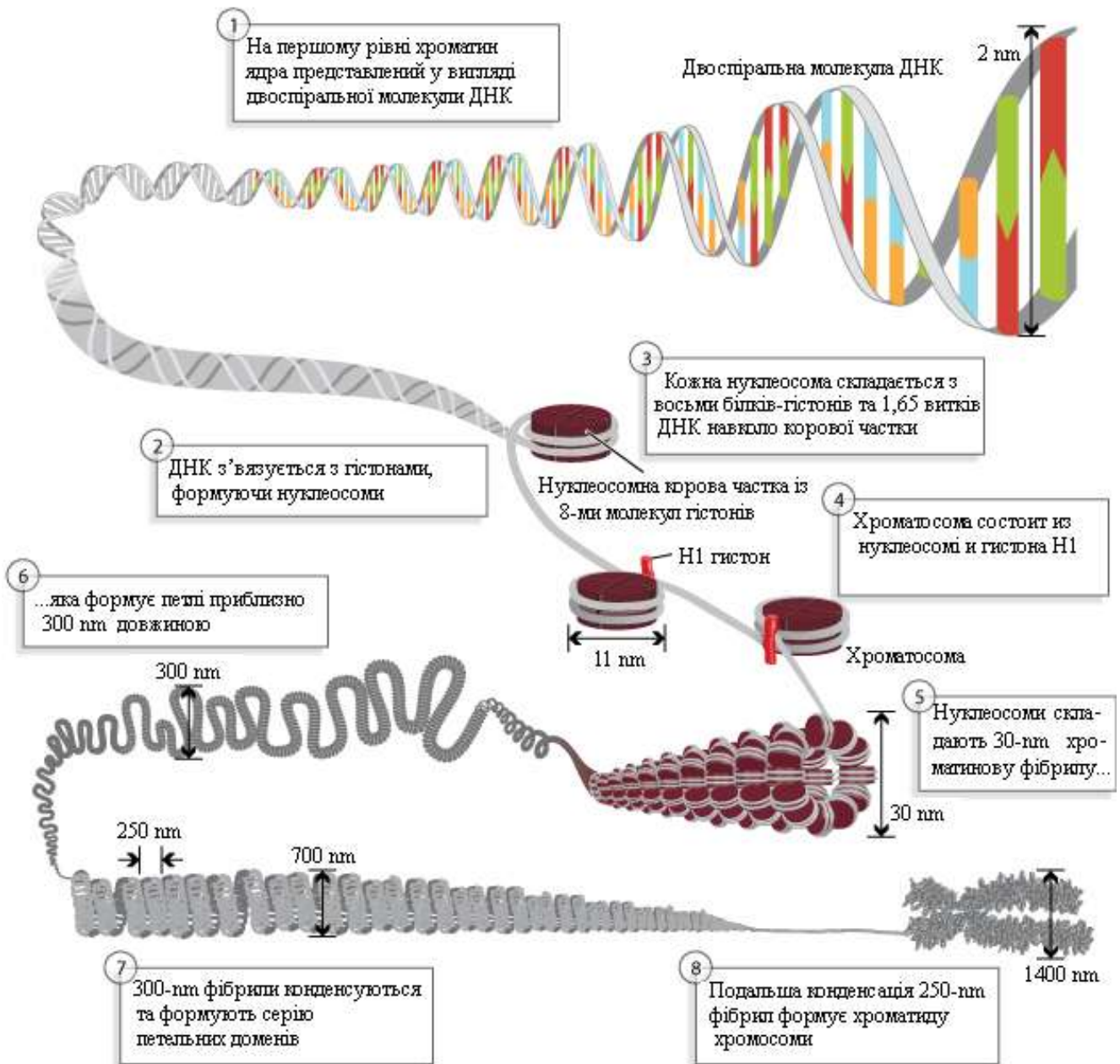
ДНК у складі як інтерфазних, так і мітотичних хромосом виконує роль зберігання і реалізації генетичної інформації. Однак, для виконання цих функцій у складі інтерфазних ядер клітина повинна мати чітку структурну основу, яка дозволила б розташувати величезні за довжиною молекули ДНК у суворому порядку, завдяки якому стають можливими процеси як синтезу РНК, так і реплікації ДНК. У середньому на інтерфазне ядро ссавців приходить близько двох метрів ДНК, яка локалізується у сферичному ядрі діаметром близько 10 мкм. Це значить, що така величезна довжина ДНК повинна бути дуже щільно укладена, при цьому в ядрі повинен бути збережений певний порядок у розташуванні частково або повністю конденсованих хромосом. Окрім того, повинні бути реалізовані умови для впорядкованого функціонування хромосом. Зрозуміло, що цим вимогам не зможе відповідати безструктурна, хаотична система.

Згідно з сучасним уявленням, які сформовані за допомогою світлової і електронної мікроскопії, компактизація ДНК у ядрі досягається з рахунок зв'язування двоспірального ланцюгу ДНК з білками. Білки першого рівня пакування ДНК називаються гістонами, а комплекс ДНК-білок має назву хроматину.

Гістони є родиною невеликих позитивно заряджених білків: Н1, Н2А, Н2В, Н3 й Н4. Молекула ДНК має негативний заряд за рахунок фосфатних груп в її фосфатно-цукровому остові; саме тому гістони дуже тісно зв'язуються з нею.

Основною структурною і функціональною одиницею хроматину є **нуклеосома**, яка містить вісім білків гістонів і близько 146 пар основ ДНК: по дві молекули білків Н2А, Н2В, Н3 й Н4 об'єднуються і утворюють кóрову частку – гістоновий октамер, навколо якого обертається двоспіральна молекула ДНК, роблячи 1,7 витка. Приєднання ще одного білка Н1 додає ще 20 пар основ, що призводить до двох повних оборотів навколо октомера і формує

структуру, яку називають **хроматосомою** (рис. 15). Кожна хромосома еукаріот містить сотні тисяч нуклеосом, і ці нуклеосоми з'єднані з ДНК, що проходить між ними (у середньому близько 20 пар основ). Ця ДНК має назву **лінкерної**. Таким чином, кожна хромосома складається з довгого ланцюга нуклеосом, яка на електронних мікрофотографіях виглядає як намисто із бусин.



**Рис. 15. Пакування хромосомної ДНК у ядрі** (цит. за Annunziato A. T., 2008, <https://go.nature.com/3jrO606>, з модифікаціями)

Позитивно заряджені гістони, які мають сильну спорідненість до негативно зарядженої ДНК, утворюють комплекси, які мають назву нуклеосом.

Кожну нуклеосому (**I рівень укладки ДНК**) огортає ДНК, яка намотана у 1,65 раз навколо корової частки октамеру – таку частку називають хроматосоною. Хроматосоми складаються, утворюючи 30 нм хроматинову фібрилу (**II рівень укладки ДНК**), яка утворює петлі довжиною 300 нм у середньому (**серія петельних доменів, III рівень конденсації ДНК**). Фібрили довжиною 300 нм конденсуються і складаються таким чином, щоб утворити фібрилу завширшки 250 нм, яка щільно згортається у хроматиду хромосом. **IV** і останній рівень укладки хромосом – це **метафазна хромосома**.

Хроматиновий матеріал у метафазі клітинного поділу набуває найщільнішої укладки та компактизації; це пов'язано з необхідністю швидко і точно поділити генетичний матеріал ядра материнської клітини між двома дочірніми. Саме тому морфологічні особливості хромосомного набору клітин вивчають на стадії метафази. Самі хромосоми у цій стадії виглядають як паличкоподібні структури, утворені з двох субодиниць конденсованої ДНК, з'єднаної з білками. Субодиниці – **хроматиди** розміщені одна поряд з іншою і з'єднані лише у ділянці, яка має назву **первинної перетяжки**. Ця перетяжка поділяє хромосому на два плеча – ліве та праве. На первинній перетяжці метафазної хромосоми знаходиться **центромера**. Це ділянка хромосоми, на якій з обох боків формуються дископодібні структури – **кінетохори**. У метафазі до кінетохорів прикріплюються тубулінові мікротрубочки веретена поділу. На деяких хромосомах є **вторинні перетяжки**. Їх вигляд є індивідуальним і постійним для кожної такої хромосоми. Ділянки вторинних перетяжок називають **ядерцевими організаторами**, оскільки саме на них утворюються ядерця в інтерфазі. В окремих випадках вторинна перетяжка відокремлює від основного тіла хромосоми невелике кулясте потовщення. Така хромосома носить назву хромосоми із супутником або сателітом (sat-хромосоми). Кожна хромосома на кінцях плечей має **теломери** – кінцеві ділянки ДНК, які складаються із великої

кількості маленьких однакових повторів нуклеотидних послідовностей. Основна роль теломер – захист ДНК. Теломери також допомагають правильному приєднанню ділянок хромосом у процесі репарації («ремонт») ДНК хромосом в інтерфазі.

Важливо знати, що на різних стадіях клітинного циклу хромосоми однієї і тієї ж клітини існують у двох варіантах – **s-хромосоми**, побудовані з однієї хроматиди, і **d-хромосоми**, що мають у своєму складі дві хроматиди. Таким чином, відразу ж після поділу у дочірніх клітинах знаходяться хромосоми s-типу; після ж проходження інтерфазу у ядрі відбувається дуплікація ДНК і хромосоми стають подвійними, перетворюються у d-хромосоми.

Виходячи із форми хромосом на стадії метафази або анафази, розрізняють такі їх типи (рис. 16): метацентричні хромосоми – мають плечі рівної або майже рівної довжини і нагадують літеру V, субметацентричні – з плечима неоднакової довжини, що нагадують за формою літеру L, телоцентричні – паличковидні хромосоми з центромерою на проксимальному кінці, акроцентричні – паличковидні хромосоми з дуже коротким, майже непомітним другим плечем. Певний тип будови є постійним для кожної пари гомологічних хромосом.

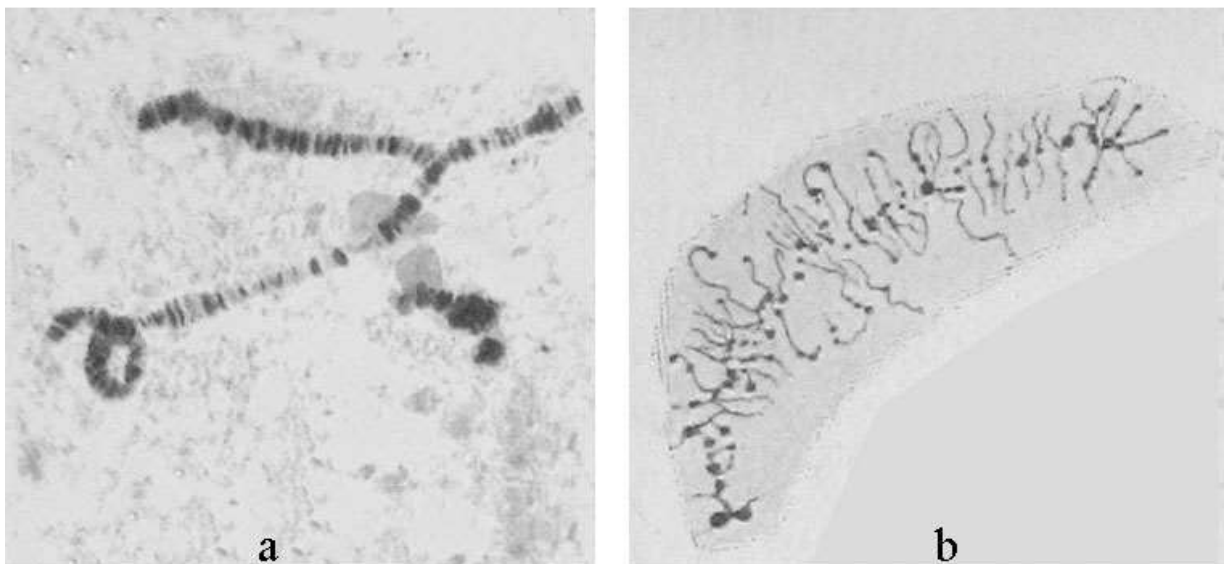


**Рис. 16. Залежність форми хромосом у метафазі від положення центромери**

1, 7 – метацентричні, 2 – субметацентрична, 3, 4, 5 – акроцентричні, 6 – телоцентрична, 8 – акроцентрична із вторинною перетяжкою, 9 – хромосома із супутником; центромери позначено світлим кружком (цит. за Тоцький В. М., Генетика, 2008 (рис. 2.13))

За стадіями мітозу хромосоми поділяються на профазні, метафазні (s-хромосоми) та анафазні і телофазні (d-хромосоми). Розрізняють також **соматичні (аутосоми)** і **статеві** (одна пара) хромосоми. В залежності від того, однаковий чи різний вигляд мають статеві хромосоми, що належать до однієї пари, розрізняють гомогаметну (з однаковими хромосомами) чи гетерогаметну (з різними хромосомами) статі.

В деяких клітинах на певних стадіях їх життєвого циклу спостерігаються особливі гігантські хромосоми, яким властиві величезні розміри. До гігантських хромосом відносяться політенні хромосоми і хромосоми типу лампових щіток (рис. 17).



**Рис. 17. а – політенна хромосома *D. melanogaster*; б – хромосома типу лампових щіток із ядра ооциту тритону (фото б наведено за О. Hertwig, 1909, *Wikimedia Commons*, <https://bit.ly/3tAQmXC>)**

Політенні хромосоми можна знайти у клітинах слинних залоз двокрилих комах, в ядрах клітин кишківника, мальпігієвих судин, а також у деяких рослин в ядрах синергід. Так, у *Drosophila melanogaster* політенні хромосоми за об'ємом у 1000 разів більші, ніж звичайні, і до 200 разів довші. Такі величезні розміри є наслідком ендомітозу – здійснюється 9-10 послідовних циклів редуплікації хромонем без наступного їх розходження, що збільшує кількість ДНК

до 1000-2000 разів. Сотні гомологічних хромосом залишаються тісно кон'югованими одна з іншою. Вддовж усієї політенної хромосоми розташовуються темні смуги різної ширини – диски, які чергуються із світлими ділянками – міждисковими проміжками, утворюючи характерний і індивідуальний смугастий малюнок. Темні диски є ділянками неактивного конденсованого хроматину, а світлі міждискові проміжки – це активний хроматин, на якому відбувається експресія генів – іде інтенсивна транскрипція з цих ділянок, утворюються іРНК. Політенні хромосоми вважають інтерфазними хромосомами (рис. 17а).

Інший тип гігантських хромосом – це хромосоми типу лампових щіток, які спостерігаються в ооцитах на стадії першого поділу мейозу. Їх довжина навіть більша, ніж політенних хромосом. Найбільш крупні хромосоми типу лампових щіток виявляються у ооцитах деяких хвостатих амфібій. Хромосоми типу лампових щіток мають множинні тонкі бокові вирости-випетлювання, які і надають цим хромосомам характерного вигляду. Центральна вісь такої хромосоми складається з двох сплечених гомологів, у яких лінійно розташовуються хромери – розетки з надспіралізованих петель конденсованої ДНК. Ріст хромосом типу лампових щіток здійснюється за рахунок збільшення розміру хромерів. Бокові, звичайно парні вирости мають форму петель. Бокові петлі, крім того утримують наростаючі фрагменти РНК, які утворюються внаслідок транскрипції з них (рис. 17b).

## Лабораторна робота № 5

### Каріотипування рослинних об'єктів

#### Завдання 1

Хромосоми містяться у каріоплазмі і характеризуються постійністю кількісного і якісного складу у клітинах даного виду. Кількісний та якісний склад хромосом, властивий особинам даного виду, називається **каріотипом**. У диплоїдному наборі хромосом соматичної клітини слід розрізняти парні гомологічні хромосоми,

тобто такі, що мають однакову морфологію, проте походження – із різних геномів: одна від материнської гамети, друга від батьківської. Каріотип клітин зазвичай досліджують на давлених препаратах або в мазках; для цього придатні клітини на стадії метафази. Так звані **метафазні пластинки** фотографують і проводять каріотипування.

Усі хромосоми, що входять до каріотипу, можна розташувати у вигляді **каріограми** (візуальне представлення повного хромосомного набору). Для цього з фотографії метафазної пластинки акуратно вирізають хромосоми, розбивають їх на пари гомологів, ранжують і наклеюють на лист паперу, враховуючи будову. Каріотип певної особини або даного виду може бути представлений у вигляді схеми (**ідіограми**), на якій пари гомологів розташовуються рядами у порядку зменшення розмірів. Складання ідіограми базовано на вимірюванні кожної хромосоми, обліку довжин плечей, положення первинних перетяжок-центромер, вторинних перетяжок і супутників, що дозволяє досить точно ідентифікувати хромосоми.

У багатьох рослин, а іноді і тварин, окрім постійних компонентів каріотипу – так званих А-хромосом – в ядрах деяких особин даного виду виявляються додаткові або В-хромосоми. Їх кількість варіює у досить широких межах. Ці додаткові хромосоми утворюються внаслідок фрагментації або перебудови хромосом основного набору (А-хромосом). Їх присутність збільшує генетичну варіабельність популяцій.

**Мета роботи:** Провести каріотипування і скласти ідіограму морфометричним методом, використовуючи фотографії метафазних пластинок сільськогосподарчих рослин.

### **Матеріали та обладнання**

Фотографії метафазних пластинок

Ножиці

Клей

Папір

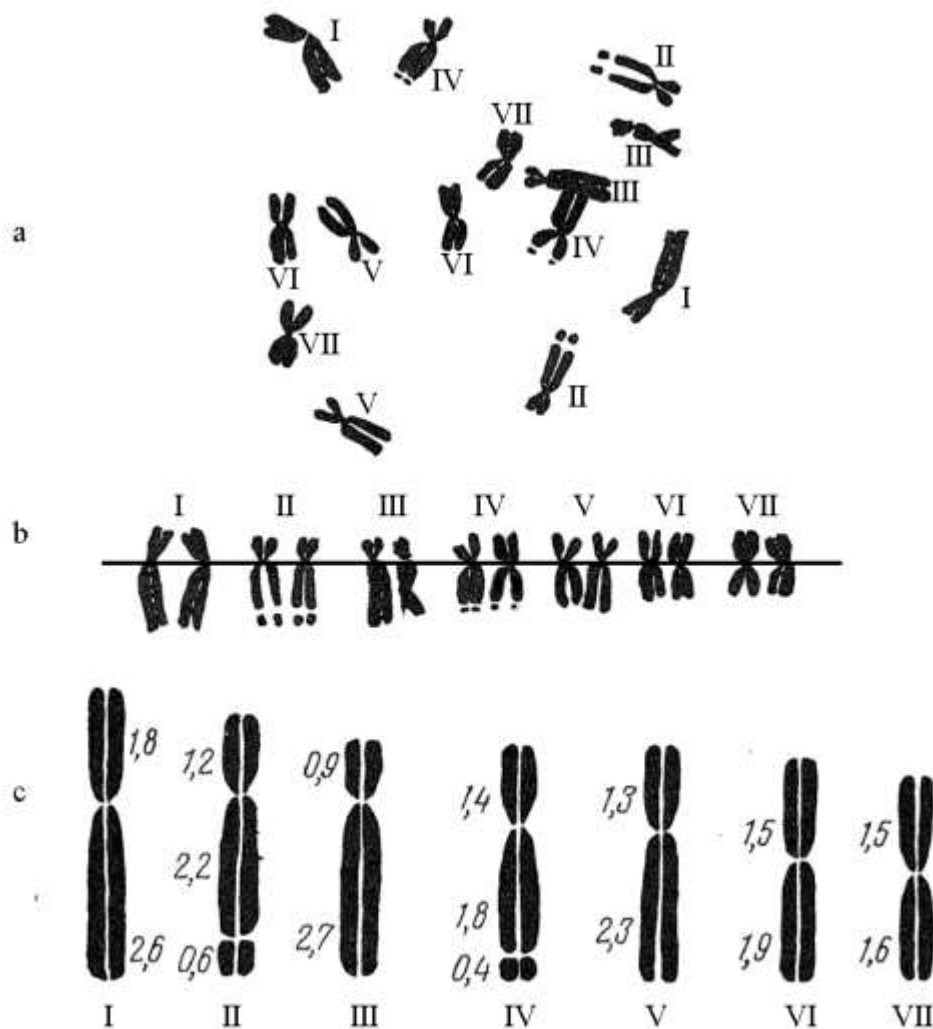
Міліметрова лінійка

## Хід роботи

1. Фотографію метафазної пластинки обраної рослини уважно розглядають, вирізають хромосоми і попарно розкладають їх на папері, ранжуючи від самих великих до найменших хромосом (рис. 18а).

2. Хромосоми наклеюють на папір так, щоб центромерні ділянки приходилися на проведену на папері лінію, а більш довгі плечі знаходилися знизу від лінії – побудувати каріограму (рис. 18b)

3. Побудувати ідіограму – схематичне зображення каріотипу (рис. 18с).



**Рис. 18.** а – метафазна пластинка, б – каріограма і с – ідіограма гороху (*Pisum sativum* L.)  
(адаптовано за Паушевою, 1984)

4. Класифікувати хромосоми, позначити метацентричні, аероцентричні, телоцентричні та супутничні хромосоми.

5. Ідентифікувати кожну хромосому за допомогою морфометричного методу, використовуючи наступні показники:

5.1. Абсолютна довжина хромосоми,  $L^a$ , мкм

5.2. Відносна довжина хромосоми,  $L^r$ , мкм

$$L^r = \frac{\text{довжина хромосом}}{\text{довжина усіх хромосом ядра}}, \%$$

5.3. Плечовий індекс ( $I^B$ )

$$I^B = \frac{\text{довжина довгого плеча хромосоми}}{\text{довжина короткого плеча хромосоми}}, \%$$

5.4. Центромерний індекс ( $I^C$ )

$$I^C = \frac{\text{довжина короткого плеча хромосоми}}{\text{довжина усієї хромосоми}}, \%$$

5.5. Індекс спіралізації

$$I^s = \frac{\text{сумарна довжина двох коротких хромосом}}{\text{сумарна довжина двох довгих хромосом}}, \%$$

6. Навести аргументи на користь проведення цитогенетичних досліджень.

**Завдання 2 (додаткове).** Ознайомитися з ідеями, завданням та результатами програми 4D Nucleome Program<sup>2</sup>

Актуальним і важливим завданням у клітинній біології є дослідження структури ДНК вищих, ніж нуклеосоми і хроматосоми, порядків, а також, яким чином ці структури зв'язані з функціонуванням і експресією генетичного матеріалу клітини. У зв'язку з цим агентство National Institutes of Health (США) започаткувало і проводить Міжнародну програму 4D Nucleome Program, яка присвячена вивченню функціонування ядра в інтерфазі.

4D Nucleome Program спрямована на розуміння принципів, що лежать в основі ядерної організації в просторі і часі, тієї ролі, яку

<sup>2</sup> Окрім програми 4D Nucleome для ознайомлення можна запропонувати студентам будь-яку з міжнародних наукових програм досліджень (як актуальних, так і завершених), інформація про які наявна в мережі Інтернет

ядерна архітектура відіграє в експресії генів і клітинній функції, і як зміни в ній впливають на нормальний розвиток і на можливість розвитку різноманітних захворювань. У рамках програми розроблено технології, ресурси і дані, що дозволяють вивчати функціонування ядра у чотирьох вимірах, враховуючи часові зміни. Науковці-учасники працюють над створенням нових інструментів і засобів для вивчення динамічної ядерної архітектури та розумінням її ролі в програмах експресії генів, взаємозв'язку між ядерною організацією і функцією як в нормальному розвитку так і за патологічних станів. Окремим важливим напрямом є створення довідкових карт-атласів ядерної архітектури в різних клітинах і тканинах.

Надзвичайно важливо для майбутніх педагогів сформувати у себе розуміння необхідності постійного удосконалення власних знань і навички працювати з різними джерелами наукової і науково-популярної інформації. Студенти повинні усвідомлювати, що біологічні знання завдяки динамічному і стрімкому розвитку сучасних біологічних наук дуже швидко оновлюються; завдяки мережі Інтернет можливий доступ до якісного наукового контенту, що, у свою чергу, потребує навичок його аналізу. Особливої важливості подібні завдання і форми робіт, націлені на формування навичок пошуку якісного контенту, роботи з першоджерелами та їх аналізу набувають у сучасних реаліях надлишку легкодоступної інформації різної якості.

Результатом виконання другого завдання даної теми є невеличкий реферат, присвячений сучасному стану виконання наукового проекту 4D Nucleome (або іншого з урахуванням актуального стану світових наукових досліджень). Реферат бажано створювати за схемою:

- Назва наукової програми, її актуальність та важливість.
- Пункти програми (наукова проблема, яку вирішують, основні результати).
- Перспективи та подальший розвиток досліджень (по кожному пункту окремо).

### **Питання для підготовки та контролю:**

1. Хроматин інтерфазного ядра і ядерна архітектура.
2. Рівні укладки (конденсації хромосом).
3. Що входить до складу нуклеосоми?
4. Морфологія метафазних хромосом.
5. Що таке каріотип і ідіограма?
6. Що таке А-хромосоми та В-хромосоми?
7. Біологічний сенс появи гігантських хромосом.
8. Які типи гігантських хромосом вам відомі?
9. Морфометричний метод ідентифікації хромосом каріотипу.

### **Література:**

1. Сиволоб А. В., Афанасьєва К. С. Молекулярна організація хромосом : навч. посіб. – Київ : Київський університет, 2014. – 286 с.
2. Annunziato A. T. DNA packaging: Nucleosomes and chromatin // Nature education. 2008. – Vol. 1(1). – P. 26.
3. Тоцький В. М. Генетика. – Одеса: Астропринт, 2008. – 712 с.
4. Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. Molecular cell biology. 6<sup>th</sup> edition. L.: Freeman, W. H. & Company, 2007. — 1150 p.
5. Plopper G., Sharp D., Sikorski E., Lewin B. Lewin's cells. — 3rd ed. – USA. : Courier Companies, 2015. – 1056 p.

### **Перелік корисних on-line ресурсів**

6. Chromosomes and Cytogenetics: Genetics. – Topic Room // Scitable by nature education: Library. – Електр. дан. – Режим доступу: <https://go.nature.com/3q017k0> : (дата звернення 01.02.2022). – Загол. з екрана.
7. Cell Biology. – Topic Room // Scitable by nature education: Library. – Електр. дан. – Режим доступу: <https://www.nature.com/scitable/topic/cell-biology-13906536/> : (дата звернення 01.02.2022). – Загол. з екрана.
8. 4DNUCLEOME program. – Електр. дан. – Режим доступу: <https://commonfund.nih.gov/4dnucleome> : (дата звернення 01.02.2022). – Загол. з екрана.

9. Big data for knowledge program. – Електр. дан. – Режим доступу: <https://commonfund.nih.gov/bd2k/highlights> : (дата звернення 01.02.2022). – Загол. з екрана.

10. Big data for knowledge program. – Електр. дан. – Режим доступу: <https://commonfund.nih.gov/bd2k/highlights> : (дата звернення 01.02.2022). – Загол. з екрана.

11. Bioinformatics and Computational Biology program. – Електр. дан. – Режим доступу: <https://commonfund.nih.gov/bioinformatics> : (дата звернення 01.02.2022). – Загол. з екрана.

12. Evpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. – Електр. дан. – Режим доступу: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24009897/> : (дата звернення 01.02.2022). – Загол. з екрана.

13. Ou H.D., Phan S., Deerinck T. J., Thor A., Ellisman M. H., O'Shea C. C. ChromEMT: visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells // Science. – Електр. дан. – Режим доступу: <https://science.sciencemag.org/content/357/6349/eaag0025> : (дата звернення 01.02.2022). – Загол. з екрана.

## ТЕМА 6. Мітоз. Патології мітозу

### Теоретичні відомості

Мітотичний поділ є основним типом поділу для соматичних еукаріотних клітин. Власне поділ складається із чотирьох послідовних фаз, тривалість яких у клітин різних організмів і навіть у різних клітин одного організму може бути різною. Мітоз, незалежно один від одного, був відкритий і описаний цілим рядом вчених; так, детальні описи мітозу у рослин залишив Е. Страсбургер, а у тварин – В. Флемінг; відмінності у проходженні мітозу у рослинних і тваринних клітинах зібрані у табл. 2.

Таблиця 2

### Порівняльна характеристика мітозу в рослинних і тваринних клітинах

| Рослинна клітина                                      | Тваринна клітина                                           |
|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Немає центросоми і центріолей                         | Центросома з центріолями                                   |
| Анастральний тип організації веретена поділу          | Астральний тип організації веретена поділу                 |
| Утворення серединної пластинки (фрагмопласту)         | Серединна пластинка не утворюється                         |
| Під час цитокінезу не утворюється борозна (перетяжка) | Під час цитокінезу утворюється борозна                     |
| Головним чином мітози мають місце у меристемах        | Мітози відбуваються у різних тканинах і ділянках організму |

Процес мітозу – це плавна і неперервна зміна основних фаз – профазі, метафазі, анафазі і телофазі, яка завершується цитокінезом – обособленням дочірніх клітин.

У **профазі** збільшується об'єм ядра і за рахунок спіралізації хроматина формуються хромосоми. Вже наприкінці профазі кожна хромосома складається з двох хроматид. Поступово розчиняється ядерна оболонка, зникають ядерця і хромосоми вільно і несистемно розташовуються у цитоплазмі клітини. Центріолі розходяться до полюсів клітин і формують **ЦОМТи** – **центри організації веретена мікротрубочок**. Починає формуватися ахроматинове веретено

поділу; частина його ниток йде від полюсу до полюсу, а частина – прикріплюється до кінетохорів на центромерах хромосом.

Під час метафази d-хромосоми досягають максимальної спіралізації і розташовуються на екваторі клітини; у анафазі кожна хромосома розпадається на дві хроматиди (дочірні s-хромосоми). Прикріплені до їх кінетохорів нитки веретена скорочуються і розтягують дочірні хромосоми до протилежних полюсів клітини. Таким чином, біля кожного полюсу клітини сконцентровано диплоїдний набір s-хромосом. У телофазі хромосоми деспіралізуються, навколо них починає формуватися ядерна оболонка, у дочірніх ядрах утворюються ядерця. Зникає веретено поділу, розпочинається поділ цитоплазми. Таким чином, після поділу ядра (каріокінезу) розпочинається цитокінез – формування двох відокремлених дочірніх клітин.

### **Нетипові та патологічні форми мітозу**

**Ендомітоз.** Відхилення від нормального ходу мітозу найчастіше відбувається у диференційованих клітинах. Так, якщо в інтерфазі відбувається нормальне подвоєння хромосом, але з якоїсь причини не утворюється веретено поділу і не зникає ядерна оболонка, то ядро із диплоїдного стане тетраплоїдним. Це явище має назву ендомітоз; внаслідок цього утворюються поліплоїдні клітини. У нормі такі клітини зустрічаються в тканинах, які інтенсивно функціонують (наприклад, печінка ссавців), хоча з точки зору генетики – це геномна соматична мутація.

При **амітозі** (прямому поділі ядра) поділ ядра здійснюється у інтерфазі. У цьому випадку інтерфазне ядро як би перешнуровується навпіл і приймає форму пісчаного годинника або гантелей. Хромосоми і характерні для мітоза структурні зміни в клітині не візуалізовані, веретено не утворюється, ядерна оболонка не зникає. Описаний тип поділу зустрічається в клітинах деяких спеціалізованих тканин і в патологічних випадках. Амітоз ніколи не зустрічається в клітинах, яким потрібне збереження повноцінної генетичної інформації.

**К-мітоз.** Під дією опромінення і різних отрут також можуть виникнути аномалії мітозу.

К-мітоз відноситься до патології, пов'язаної з пошкодженням мітотичного апарату (веретена поділу, центромер, центріолей). При цьому поділ клітини зупиняється у метафазі. Викликають К-мітоз колхіцин, аценафтен, колцемід та інші отрути. При цьому спостерігається пошкодження хромосом мітотичного апарату, порушення цитокінезу, що призводить до фрагментації, злипання, нерозходження хромосом, утворенню мостів, мікроядер, багатоплюсності, асиметрії у мітозі, затримці або відсутності цитокінезу.

## **Лабораторна робота № 6**

### **Визначення мітотичного індексу**

**Мета роботи:** визначити мітотичний індекс для клітин меристем корінців цибулі.

#### **Матеріали та обладнання**

Мікроскопи

Постійні мікропрепарати зрізів корінців цибулі

#### **Хід роботи**

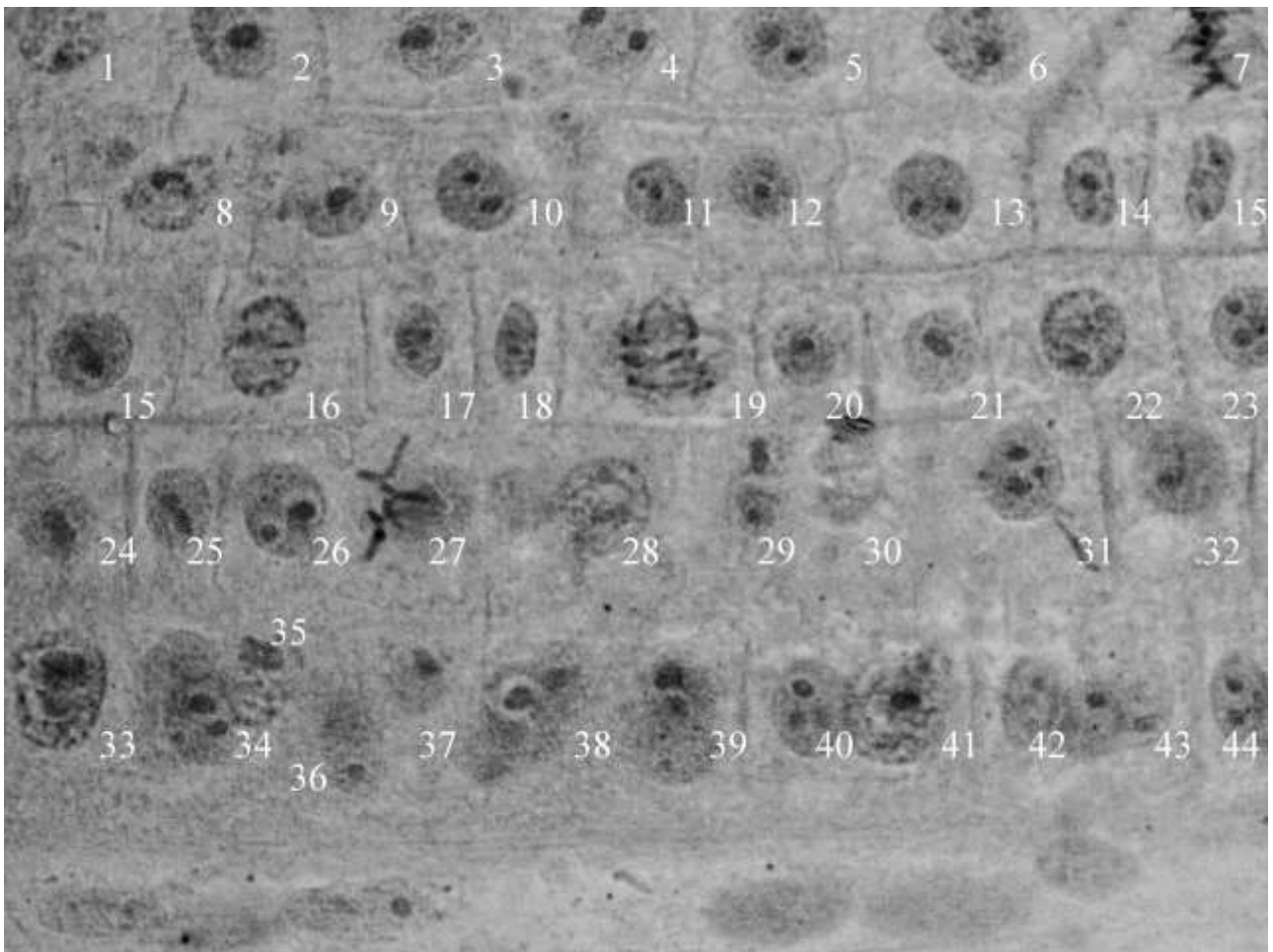
1. Встановити препарат під мікроскоп, налаштувати зображення клітин кореневої меристеми на малому збільшенні. Перевести мікроскоп на велике збільшення.

2. У п'яти полях зору підрахувати загальну кількість клітин та кількість клітин, які знаходяться в різних фазах поділу: профазі, метафазі, анафазі, телофазі (рис. 19).

3. За формулою розрахувати мітотичний індекс – відсоток клітин, що поділяються, від загального числа проаналізованих клітин

$$MI = \frac{(P + M + A + T)}{N} \times 100 (\%), \text{ де}$$

P – кількість клітин у профазі, M – у метафазі, A – у анафазі, T – у телофазі відповідно, N – загальна кількість клітин у полі зору.



**Рис. 19. Мікрофотографія клітин меристеми корінців цибулі (постійний мікропрепарат)** Профаза – № 16, 28; Метафаза – № 7, 27; Анафаза – № 19; Телофаза – відсутня, усі решта клітин – інтерфазні. Загальна кількість клітин у полі зору – 44

4. Розрахувавши мітотичний індекс для кожного з п'яти досліджених полів зору окремо, визначити середнє арифметичне.

5. Зробити висновок про активність меристематичної тканини корінців цибулі.

6. Описати біологічне значення мітозу.

### **Питання для підготовки та контролю:**

1. Мітоз як тип поділу соматичних клітин.
2. Фази мітозу.

3. Біологічне значення мітозу.
4. Порівняльна характеристика мітозу у рослинних і тваринних клітинах.
5. Що таке цитокінез?
6. Назвіть та охарактеризуйте нетипові та патологічні форми мітозу.
7. Яким чином визначають показник мітотичного індексу?
8. З якою метою визначають мітотичний індекс тканини?

### **Література:**

1. Загальна цитологія і гістологія : підручник / М. Е. Держинський, Н. В. Скрипник, Г. В. Островська та ін. ; за ред. М. Е. Держинського ; упорядкування Н. В. Скрипник – К.: Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2010. – 575 с.
2. Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. Molecular cell biology. 6<sup>th</sup> edition. L.: Freeman, W. H. & Company, 2007. — 1150 p.
3. Plopper G., Sharp D., Sikorski E., Lewin B. Lewin's cells. — 3rd ed. — USA. : Courier Companies, 2015. – 1056 p.

### **Перелік корисних on-line ресурсів**

1. Mitosis: Gallery Images // MicroscopyU. – Електр. дан. – Режим доступу: <https://bit.ly/33YLWxY> : (дата звернення 01.02.2022). – Загол. з екрана.
2. Mitosys. – Cell Biology. – Topic Room // Scitable by nature education: Library. – Електр. дан. – Режим доступу: <https://go.nature.com/3Mxg0Fg> : (дата звернення 01.02.2022). – Загол. з екрана.

## ТЕМА 7. Мейоз і гаметогенез у рослин і тварин

### Теоретичні відомості

Мейозом називають особливий вид поділу еукаріотичних клітин, який складається з двох послідовних поділів, аналогічних мітотичним (з певними відмінностями), інтерфаза між якими дуже скорочена або відсутня. Вперше мейоз був описаний і вивчений у яйцях морських їжаків німецьким зоологом Оскаром Гертвігом (О. Hertwig) у 1876 р. Проте, важливість мейозу у спадковості була підкреслена лише у 1890 р. А. Вейсманом. Мейоз – універсальне явище, властиве усім еукаріотам. При мейозі відбувається не лише редукція кількості хромосом до гаплоїдного числа, але й здійснюється надзвичайно важливий генетичний процес – обмін ділянками між гомологічними хромосомами, який має назву кросинговер.

У табл. 3 наведена порівняльна характеристика двох типів поділів, властивих еукаріотичним клітинам.

Для тварин і деяких нижчих рослин властивий **гаметний тип** мейозу, який відбувається під час дозрівання гамет із попередників – зрілих статевих клітин (у тварин та деяких нижчих рослин). Власне, усі клітини багатоклітинних тварин можна поділити на дві групи: соматичні, із яких буде утворюватися клітини усіх тканин і органів, і гермінативні, що дають початок статевим клітинам. І лише клітини цих клонів будуть при дозріванні ділитися мейотично; сам процес формування зрілих гамет називається **гаметогенезом**.

Як і усі клітини організму, що розвивається, вихідні клітини зародкового шляху диплоїдні. Їх кількість може збільшуватися внаслідок мітозу, повторюючи усі стадії звичайного клітинного циклу. Однак на певних стадіях розвитку при статевому розвитку особин гермінативні клітини перетворюються у гоніальні (оогонії – жіночі і сперматогонії – чоловічі клітини-попередники). При цьому, як для жіночих, так і для чоловічих клітин починається перший цикл мейозу. На цій та наступній стадії мейозу статеві клітини отримують назву **сперматоцитів** і **ооцитів** (I і II порядків) відповідно. В процесі

гаметогенезу виділяють такі основні періоди: період розмноження, період росту, період дозрівання і період формування (рис. 20).

Таблиця 3

### Порівняльна характеристика мітозу і мейозу

| Мітоз                                                                                         | Мейоз                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Риси подібності</b>                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Перед поділом відбувається редуплікація ДНК (у S-періоді інтерфази) та конденсація d-хромосом |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Однакові фази поділу (профаза, метафаза, анафаза, телофаза)                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Відмінності</b>                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Один поділ – до полюсів розходяться ідентичні хроматиди                                       | Два послідовних поділи. Перший поділ мейозу – <b>редукційний</b> (кількість хромосом редукується, до полюсів відходять цілі хромосоми, які можуть виявитися неідентичними внаслідок кросинговеру)<br>Другий поділ – <b>екваційний</b> – до полюсів розходяться хроматиди після розділення центромерних ділянок |
| У метафазі всі подвоєні хромосоми розташовуються на екваторі окремо                           | Гомологічні подвоєні хромосоми попарно розташовуються на екваторі у метафазі I (у вигляді бівалентів)                                                                                                                                                                                                          |
| У профазі відсутня кон'югація хромосом і кросинговер                                          | У профазі I відбувається кон'югація гомологічних хромосом і кросинговер                                                                                                                                                                                                                                        |
| У профазі мітозу відсутня транскрипція і синтез білків                                        | У профазі I мейозу йдуть активні процеси трансляції і транскрипції, а також реплікація певної частини ДНК                                                                                                                                                                                                      |
| Подвоєння молекул ДНК відбувається в інтерфазі, яка розділяє поділи                           | Між першим і другим поділом мейозу немає інтерфази і не відбувається реплікація молекул ДНК                                                                                                                                                                                                                    |
| Утворюються дві диплоїдні клітини                                                             | Утворюються чотири гаплоїдні клітини                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Відбувається в соматичних клітинах                                                            | Відбувається у статевих клітинах, що дозрівають                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Є основою нестатевого розмноження                                                             | Є основою статевого розмноження                                                                                                                                                                                                                                                                                |

Як у тварин, так і у рослин мейоз при гаметогенезі має спільні риси і проходить фактично однаково у представників різної статі; проте, існують деякі важливі відмінності.



**Рис. 20. Сперматогенез (а) і овогенез (б) у вищих тварин**  
(зображення з сайту <https://bit.ly/3p0bALd>)

У тварин чоловічої статі розділення клітини відбувається наприкінці як першого, так і другого поділів мейозу. Дочірні клітини відразу ж втрачають зв'язок одна з іншою і стають незалежними. Усі чотири продукти мейозу виживають, перетворюючись у **сперматиди**, а потім у **спермії (сперматозоїди)**. У пиляках рослин після поділу **мікроспороцитів I і II порядку** відбувається формування клітинних стінок і дочірні клітини залишаються зв'язаними, утворюючи наприкінці першого поділу **діаду**, а наприкінці другого – **тетраду** мікроспор. Усі продукти мейозу в рослин також виживають і перетворюються у **пилкові зерна**.

Як у тварин, так і у рослин при формуванні жіночих гамет із чотирьох продуктів мейозу виживає лише один, який утворює ядро **яйцеклітини** (тварини) або мегаспору (**рослини**). У тварин перший поділ мейозу асиметричний – він призводить до утворення овоциту II порядку і **полярного** або **напрямого тільця**. Другий поділ мейозу також асиметричний: овоцит II порядку поділяється на яйцеклітину і друге полярне тільце (перше полярне тільце також може поділитися на два, проте усі полярні тільця дегенерують). Таким чином, внаслідок мейозу утворюється лише одна функціональна гаплоїдна клітина – жіноча гамета (яйцеклітина).

У жіночому гаметогенезі рослин мейоз призводить до формування чотирьох клітин – мегаспор. Проте функціональною, тою, що виживе, є лише одна мегаспора, а три інші дегенерують.

Четверта мегаспора дає початок **зародковому мішку**. Її гаплоїдне ядро тричі поділяється шляхом мітозу і формує усі структури і клітини зародкового мішка.

## **Лабораторна робота № 7**

### **Мікроспорогенез у злакових рослин**

#### **Завдання 1. Дослідження мікроспорогенезу у пиляках м'якої пшениці**

**Мета роботи:** Виготовити тимчасові давлені препарати пиляків пшениці і визначити фази мікроспорогенезу.

#### **Матеріали та обладнання**

Мікроскопи біологічні

Предметні і покривні скельця

Крапельниці з водою

Ацетокармін

Пінцети

Препарувальні голки

Фільтрувальний папір

Набір фіксатів пиляків сільськогосподарчих злаків на різних етапах мікроспорогенезу

#### **Хід роботи**

1. Підготувати предметне скло, протерти його і нанести краплину барвника ацетокарміну посередині, покласти всередину краплини пиляк пшениці.
2. Обережно за допомогою пінцета і препарувальної голки розділити пиляк на частини, за можливості убрати оболонки пиляка.

3. Над полум'ям спиртівки прогріти краплину, не доводячи її до кипіння. Це необхідно для кращого забарвлення ядер клітин.
4. Обережно фільтрувальним папером відтягнути барвник, нанести на препарат краплину 45 % оцтової кислоти.
5. Тримаючи покривне скло під кутом до краплини, акуратно опустити його на об'єкт.
6. Обережно тупим кінцем препарувальної голки постукати по препарату для отримання моношару клітин на препараті
7. Зробити замальовки та фотографії, позначити на рисунку клітини, вказати стадію мейозу (рис. 21)



**Рис. 21. Приклади виконання 1 завдання лабораторної роботи № 7**

8. Повторити процедуру, знайти і проаналізувати інші стадії мікроспорогенезу.

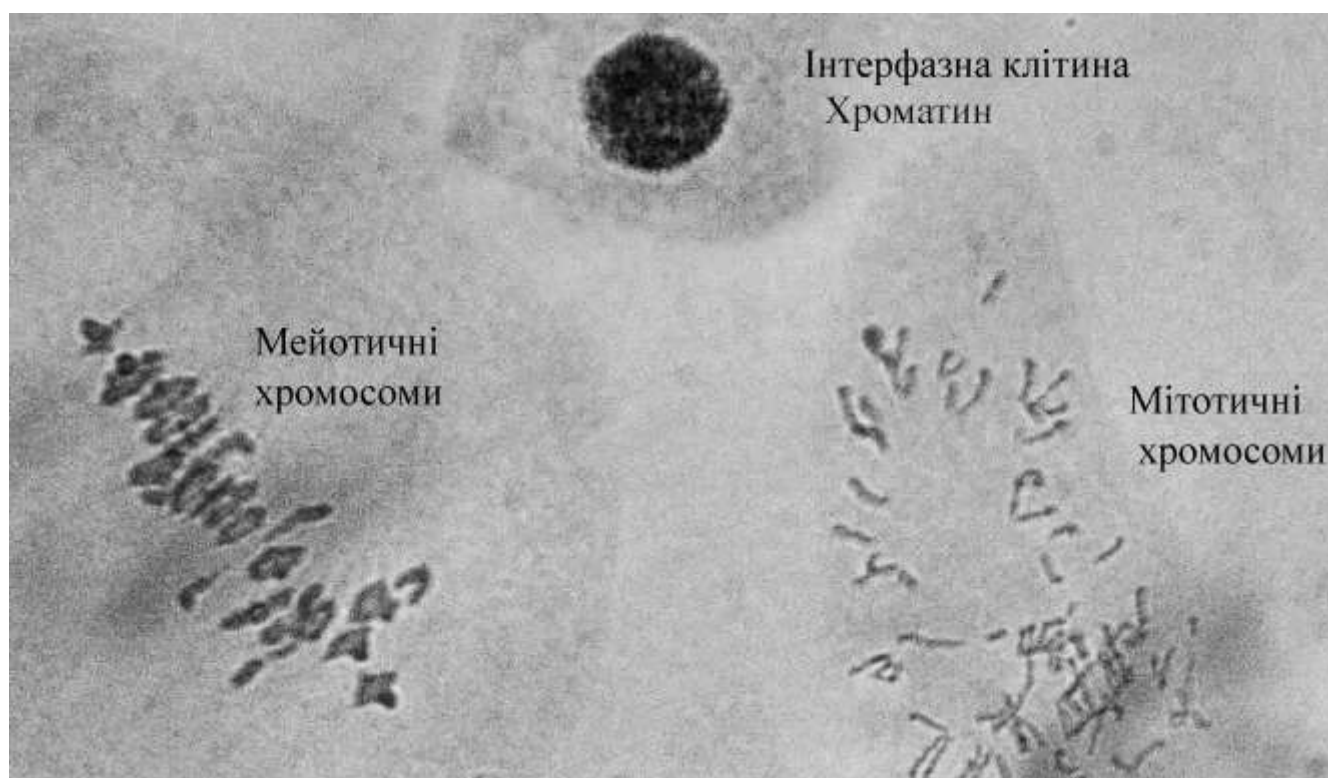
**Завдання 2.** Скласти порівняльну таблицю проходження фаз поділу при мейозі і мітозі, зазначивши основні події, стан хроматину та плоїдність клітин (для мітозу заповнювати лише першу частину таблиці).

**Завдання 3.** Проаналізувати рис. 22 – мікрофотографію пиляка пшениці, у якому одночасно відбуваються обидва типи клітинних поділів, звернувши увагу на стан хромосом, фази поділу, кількість ДНК у клітині тощо.

Таблиця 4

**Порівняльна характеристика фаз мітозу і мейозу**

| Фази        | Мейоз | Мітоз         |
|-------------|-------|---------------|
| Інтерфаза   |       |               |
| Профаза I   |       |               |
| Метафаза I  |       |               |
| Анафаза I   |       |               |
| Телофаза I  |       |               |
| Профаза II  |       | Фази відсутні |
| Метафаза II |       |               |
| Анафаза II  |       |               |
| Телофаза II |       |               |
| Цитокінез   |       |               |



**Рис. 22.** Тимчасовий давлений мікропрепарат пиляка м'якої пшениці. У поле зору одночасно потрапили клітини у стані метафазі I мейозу (зліва, мікроспороцит, генеративна клітина) і у стані метафазі мітозу (справа, поділ ядер клітин тапетуму, які складають внутрішню оболонку пиляка (соматична клітина). Зверху поля зору знаходиться інтерфазна клітина, хромосоми перебувають у деспіралізованому стані у вигляді хроматину

### **Питання для підготовки та обговорення:**

1. Мейоз як особливий вид клітинного поділу.
2. Типи мейотичного поділу.
3. Порівняльна характеристика мітозу і мейозу.
4. Гаметогенез у тварин і рослин.
5. Біологічне значення і роль мейозу.

### **Література:**

1. Загальна цитологія і гістологія : підручник / М. Е. Держинський, Н. В. Скрипник, Г. В. Островська та ін. ; за ред. М. Е. Держинського ; упорядкування Н. В. Скрипник – К.: Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2010. – 575 с.
2. Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. Molecular cell biology. 6<sup>th</sup> edition. L.: Freeman, W. H. & Company, 2007. — 1150 p.
3. Plopper G., Sharp D., Sikorski E., Lewin B. Lewin's cells. — 3rd ed. — USA. : Courier Companies, 2015. — 1056 p.

### **Перелік корисних on-line ресурсів**

4. Meiosis: Gallery Images // MicroscopyU. – Електр. дан. – Режим доступу: <https://bit.ly/33YLVxY> : (дата звернення 01.02.2022). – Загол. з екрана.
5. Cell Cycle and Cell Division. – Cell Biology. – Topic Room // Scitable by nature education: Library. – Електр. дан. – Режим доступу: <https://go.nature.com/2Lu024W> : (дата звернення 01.02.2022). – Загол. з екрана.

## ТЕМА 8. Клітинний цикл. Межа Гейфліка. Стволові клітини. Клітинна загибель – некроз та апоптоз

### Теоретичні відомості

Період існування клітини від поділу до поділу носить назву **клітинного циклу**. Його тривалість залежить від типу клітин і дії чинників зовнішнього середовища (температура, поживні речовини і постачання кисню).

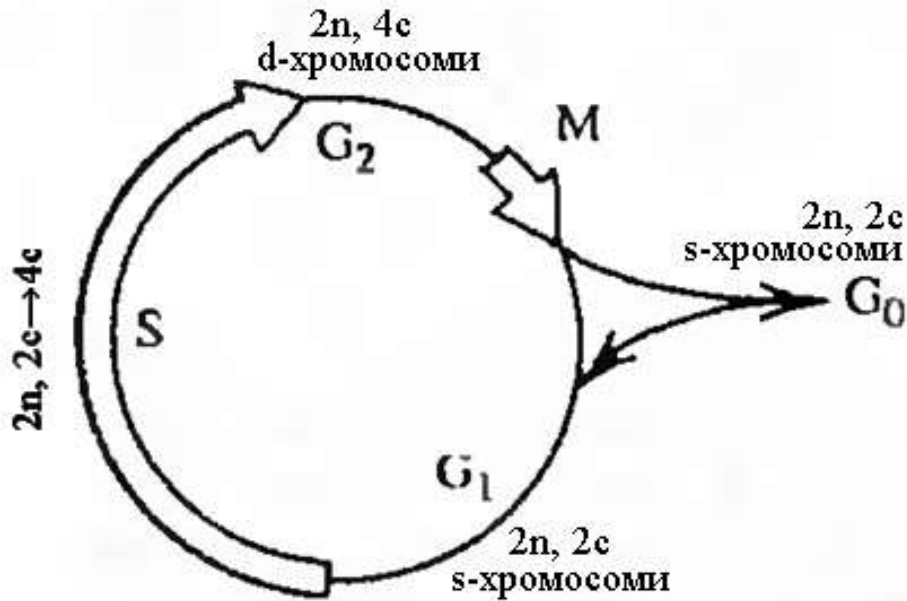
Клітинний цикл поділяється на два етапи – **інтерфаза** та власне етап **поділу клітини**, який завершується **цитокінезом** (рис. 23). У інтерфазі виділяють три періоди.

Лева доля часу клітинного циклу припадає на так званий **пресинтетичний період  $G_1$  (gap)** – період, який починається відразу ж після поділу. Клітина має диплоїдний вміст ДНК у ядрі ( $2n$ ,  $2C$ ), а її хромосоми належать до s-типу. У цьому періоді в дочірніх клітинах загальний вміст РНК і білків удвічі менший, ніж у вихідної батьківської клітини. У періоді  $G_1$  спостерігається зростання клітин головним чином за рахунок накопичення клітинних білків, що зумовлено збільшенням кількості РНК у клітині і підготовкою клітини до синтезу ДНК.

У наступному, **синтетичному або S-періоді**, відбувається подвоєння кількості ДНК в ядрі, і відповідно, подвоюється кількість хромосом. У ядрах різних клітин, що знаходяться у S-періоді, можна знайти різну кількість ДНК – від  $2C$  до  $4C$ , що відображає поступове накопичення ДНК по мірі проходження клітиною синтетичного періоду клітинного циклу. У S-періоді рівень синтезу РНК зростає відповідно збільшенню кількості ДНК, досягаючи свого максимуму в  $G_2$ -періоді. По закінченню S-періоду хромосоми вже становляться подвійними – d-типу. Показано, що без синтезу ДНК у S-періоді неможливий поділ клітини.

**Постсинтетичний ( $G_2$ ) період** також називають премітотичним. У даному періоді синтезується іРНК, що необхідна для забезпечення

процесів мітозу. Серед білків, що активно синтезує клітина, у цей час особливе місце займають тубуліни – білки мітотичного веретена.



**Рис. 23. Схема клітинного циклу**

Наприкінці G<sub>2</sub>-періоду та в мітозі за ступенем конденсації мітотичних хромосом синтез РНК різко знижується і повністю зупиняється під час мітозу. Синтез білка під час мітозу знижується до 25 % від вихідного рівня і потім у наступних періодах досягає свого максимуму в G<sub>2</sub>-періоді, в загальних рисах повторюючи характер синтезу РНК.

У тканинах рослин і тварин завжди є клітин, які знаходяться поміж циклом. Такі клітини прийнято називати клітинами G<sub>0</sub>-періоду. Ці клітини після мітозу не вступають у пресинтетичний період G<sub>1</sub>. Саме вони є так званими клітинами спокою, такими, що тимчасово або постійно втратили здатність до розмноження. Найчастіше втрата (хоч би і тимчасова) здатності до поділу супроводжується спеціалізацією та диференціюванням. Такі диференційовані клітини виходять із циклу, але у особливих умовах можуть знову входити у цикл і поділятися, відновлюючи, наприклад, ушкоджені ділянки органів. Проте, багато з таких клітин повністю втрачають здатність повертатися до мітотичного циклу. Так, наприклад, нейрони головного мозку і кардіоміоцити постійно знаходяться у G<sub>0</sub>-періоді клітинного циклу (аж до смерті організму).

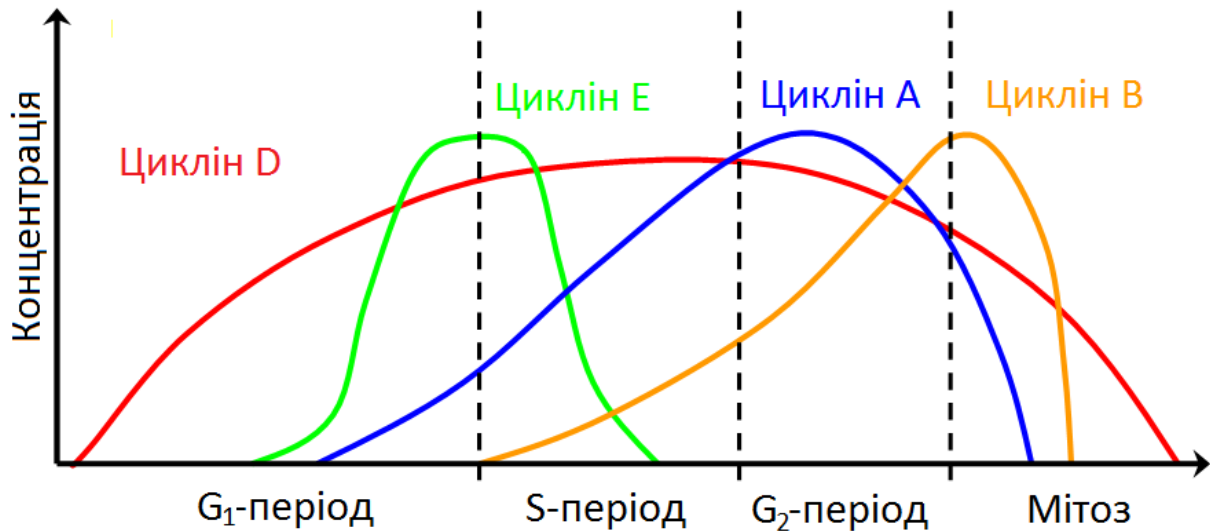
Регуляція входження й виходу клітин із клітинного циклу знаходиться під контролем особливої системи білкових факторів. Були знайдені численні **фактори росту** (ФР), що стимулюють клітини до розмноження і до проліферації. Так, наприклад, ФР із тромбоцитів стимулює розмноження клітин сполучної тканини, гормон еритропоетин викликає розмноження попередників еритроцитів, гормон прогестерон стимулює проліферацію клітин молочної залози і т. п.

Також дуже важливими регуляторами клітинного циклу є особливі білки-цикліни, які названі так тому, що їх вміст коливається в залежності від стадії клітинного циклу; свої функції вони виконують, з'єднуючись з циклін-залежними кіназами (CDK). Таким чином, регуляцію клітинного циклу здійснює комплекс, що складається з двох субодиниць: регуляторної (білок циклін) і каталітичної (фермент циклін-залежна протеїнкіназа). У ссавців у реалізації всього клітинного циклу приймають участь 9 різних циклінів і 7 циклін-залежних киназ (CDK). При цьому для переходу від одного періоду клітинного циклу до іншого використовуються різні цикліни (D, E, A, B та ін.) і різні циклін-залежні кінази (рис. 24). Так, наприклад, перехід від інтерфазного ядра до G<sub>2</sub>-періоду безпосередньо до мітозу визначається фактором, що складається із циклінів A/B і протеїн-залежної кінази I.

Клітинний цикл має свої «контрольні точки», які позначають завершення кожної фази. Зупинка клітинного циклу відбувається при пошкодженні ДНК у G<sub>1</sub>-періоді, при неповній реплікації ДНК у S-фазі, при пошкодженні ДНК у G<sub>2</sub>-періоді і при порушенні зв'язку веретена поділу з хромосомами.

Пошкодження ДНК призводять до накопичення ферментів (білки p53 і p21), які інгібують комплекси цикліни-циклінзалежні протеїнкінази, і зупиняють клітинний цикл в G<sub>1</sub>- або G<sub>2</sub>-періоді. У клітинах, які були зупинені на шляху до мітозу, запускаються програми клітинної загибелі (апоптозу).

Якщо ж білок p53 не накопичується, то клітини з пошкодженою ДНК можуть переходити до мітозу, але дочірні клітини нежиттєздатні або дають початок злоякісним пухлинам.



**Рис. 24. Регуляція клітинного циклу.** Участь різних циклінів і циклін-залежних кіназ у клітинному циклі ссавців. (Wikimedia Commons, <https://bit.ly/3MqVJkK>, з модифікаціями)

Клітини багатоклітинних організмів поділяються на дві великі групи – представники першої є мітотично компетентними, тобто здатними поділитися й розмножуватися, а інші (так звані постмітотичні клітини) на це не здатні, тому що досягли крайнього ступеню диференціювання. Для оновлення популяції таких клітин у тканинах багатоклітинного організму існує пул особливих клітин, які постійно поділяються. Такі клітини називають стовбуровими клітинами. Їх характерні риси – недиференційованість, здатність до самооновлення (збереження незмінного фенотипу після поділу шляхом мітозу), а також здатність диференціюватися у спеціалізовані клітини і перетворюватися в клітини різних органів і тканин (потентність). Традиційно виділяють три джерела отримання стовбурових клітин відповідно до джерела отримання: ембріональні, фетальні і постнатальні (стовбурові клітини дорослого організму). Ці типи клітин мають різну потентність.

Потентність, або диференціюючий потенціал є здатністю формувати певну кількість різних типів клітин. В залежності від своєї потентності стовбурові клітини поділяються на групи:

- 1) Тотипотентні (омніпотентні) стовбурові клітини – можуть дати початок новому організму. Прикладом омніпотентної клітини є запліднена зигота.
- 2) Плюрипотентні стовбурові клітини є нащадками тотипотентних і можуть давати початок майже усім тканинам і органам, з виключенням екстраембріональних тканин (наприклад, плаценти). З цих клітин у хребетних розвиваються три зародкових листки: ектодерма, ентодерма та мезодерма. Плюрипотентними є **ембріональні ствовові клітини**.
- 3) Мультипотентні стовбурові клітини дають початок клітинам різних тканин, але їх різноманітність обмежена належністю до певного зародкового листка, наприклад, ектодерма може дати початок клітинам шкірного епітелію, передньому та задньому відділам кишкової трубки, нервовій системі, органам чуттів, проте, не може дати початок м'язовим тканинам або клітинам печінки.
- 4) Олігопотентні ствовові клітини можуть бути диференційовані лише у деякі, близькі за властивостями типи клітини. До таких клітин відносяться клітини, що приймають участь у кровотворенні.
- 5) Уніпотентні клітини (бластні клітини, клітини-попередниці) – клітини, які здатні давати початок лише одному типу клітин, здатні до багатократного самовідтворення. Ці клітини вже не є власне стовбуровими.

**Фетальні стовбурові клітини** представляють собою суміш мультипотентних і уніпопентних стовбурових клітин. Їх отримують із плідного матеріалу після аборту (9-12 тижнів гестації); використання у медицині або наукові дослідження фетальних клітин є досить сумнівними з точки зору біоетики.

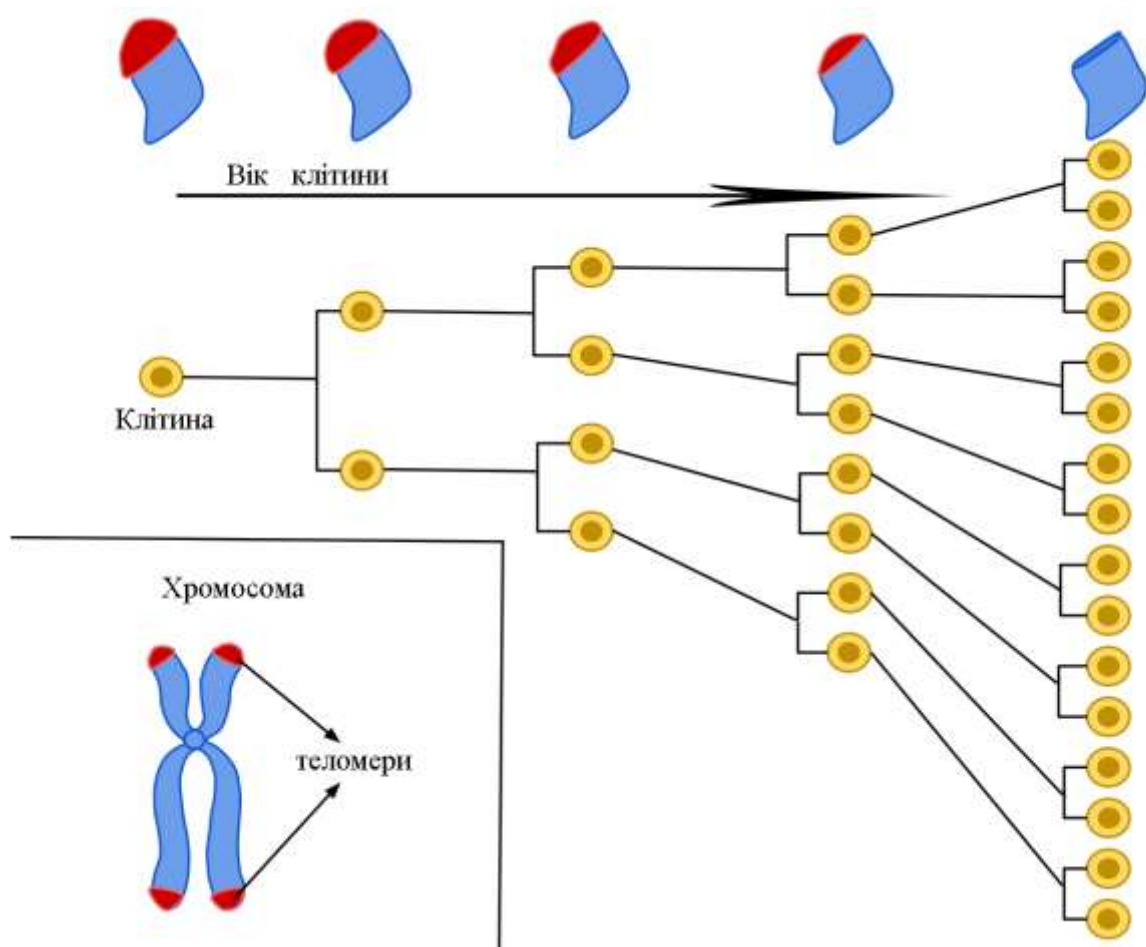
**Постнатальні стовбурові клітини** мають меншу потентність у порівнянні з ембріональними і фетальними стовбуровими клітинами. Їх можна поділити на три основні групи: гемопоетичні (кровотворні), мультипотентні мезенхімальні стромальні (можуть диференціюватися у остеобласти, хондроцити і адипоцити), а також тканиноспецифічні прогеніторні клітини (такі, що детерміновані на диференціювання у певний тип клітин, бластні клітини).

Перелічені нижче особливості стовбурових клітин повною мірою виражені у ембріональних стовбурових клітин і меншою – у фетальних та постнатальних стовбурових клітин.

1. Тотипотентність (здатність диференціюватися у цілісний організм) і плюрипотентність (здатність до утворення будь-якої із клітин дорослого організму).
2. Хоумінг – здатність стовбурових клітин при введенні їх у організм, знаходити зону пошкодження і залишатися там, відновлюючи втрачені цілісність і функції.
3. Надлишок мРНК специфічних генів, що відповідають за ранній розвиток зародку і знаходяться у цитоплазмі.
4. Теломеразна активність (наявність ферменту теломерази), що дозволяє відновлювати теломери (кінцеві ділянки хромосом), завдяки чому стовбурові клітини (також як статеві і пухлинні) здатні проходити потенційно безкінечну кількість клітинних поділів). Для цих клітин не є чинною межа Гейфліка, яка притаманна іншим соматичним клітинам багатоклітинних організмів.

Межа Гейфліка – відкрите у 1961 році Леонардом Гейфліком (Hayflick) явище обмеження загального числа поділів у соматичних клітинах. З дослідів Гейфліка стало зрозуміло, що кількість можливих поділів зменшується з віком клітини, а так званий «мітотичний годинник» знаходиться всередині кожної диференційованої клітини. Максимальна кількість поділів різниться в залежності від типу клітини та виду організму, до якого вона належить. Для більшості людських клітин межа Гейфліка складає 52 поділи. Одна з основних

гіпотез наявності межі Гейфліка пов'язана зі скороченням розмірів теломер – специфічних ділянок ДНК на кінцях хромосом, які захищають хромосоми від злипання однієї з одною. Відомо, що перед кожним поділом клітина подвоює свою ДНК у S-періоді інтерфази, в якому відбувається розплітання двох ланцюгів ДНК і створення нових повних копій цієї молекули. Але при кожному такому подвоєнні довжина теломер зменшується, і тоді вони вже не здатні захистити хромосомні кінці. У цьому випадку клітина більше не поділяється (рис. 25), стає **сенесцентною** (старою) і зрештою гине.



**Рис. 25. Зв'язок між старінням клітини, довжиною теломер та здатністю до поділу (Hayflick Limit (1).svg, автор – Azmistowski 17, *Wikimedia Commons*, <https://bit.ly/3l8VnTx>, з модифікаціями)**

Загибель окремих клітин або цілих груп клітин постійно відбувається у багатоклітинних організмів. Незважаючи на різні

причини загибелі та різні морфологічні і біохімічні процеси розвитку клітинної смерті, усі подібні випадки можна розділити на дві категорії: некроз і апоптоз, який часто називають запрограмованою клітинною загибеллю або клітинним самогубством.

**Некрози** виникають внаслідок зовнішніх чи внутрішніх пошкоджень – при ударах, опіках, при закупорці кровоносних судин тощо. Процес некрозу починається з порушення проникності клітинних мембран, яке призводить до зміни концентрації іонів у клітині, незворотних змін мітохондрій. Клітина набрякає за рахунок обводнення, у цитоплазмі збільшується кількість іонів  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , відбувається закиснення цитоплазми, набрякання вакуолярних компартментів і розриви мембран, зупинка синтезів білків у цитозолі, вивільнення лізосомних гідролаз і лізис клітини. Одночасно з цими змінами клітинні ядра спочатку стають компактизованими (**пikноз**), а потім набухають, розривається оболонка, відбувається **каріорексис** – розвалювання зовнішнього шара хроматину, і слідом **каріолізис** – розчинення ядра. Характерними для некрозу особливостями є одночасно загибель великої кількості клітин і розвинення в зоні некроза запальної реакції завдяки лейкоцитарній атаці.

На відміну від некрозу, **апоптоз** є запрограмованою клітинною загибеллю. Така загибель без фізичного або хімічного пошкодження відбувається з певними клітинами фактично на усіх стадіях онтогенезу. Детальні дослідження показали, що апоптоз регулюється міжклітинними взаємодіями, але різним чином. Більшість клітин багатоклітинних організмів потребують певних сигналів для того, щоб залишатися живими. За відсутності таких сигналів або трофічних факторів у клітинах розвивається програма «самогубства». У той же час клітини можуть отримувати сигнали, які запускають у клітинах-мішенях процеси за типом апоптозу. Також встановлені випадки, коли апоптотична загибель клітини була викликана зовнішніми факторами, наприклад, радіацією.

Цитологічна картина при апоптозі досить своєрідна. Процес починається з втрати клітинних контактів з сусідніми клітинами і зморщування самих апоптотичних клітин. У ядрах по їх периферії

відбувається специфічна конденсація хроматину, а потім ядро фрагментується на окремі частини. Слідом за цим і сама клітина фрагментується на окремі тільця, оточені плазматичною мембраною – апоптотичні тільця. Макрофаги чи навіть нормальні сусідні клітини фагоцитують ці апоптотичні тільця, характерною рисою є те, що запальна реакція не розвивається. Ще одним важливим моментом є те, що в усіх випадках апоптозу – під час ембріонального розвитку, у дорослого організму, у нормі або при патологічних процесах – морфологія процесу загибелі клітини дуже подібна, що свідчить про загальність процесів апоптозу у різних організмів і у різних органах.

Процес апоптозу здійснюється в три етапи: фаза індукції (сигнальна), ефекторна фаза, фаза деградації. За **індукцію апоптозу** може бути відповідальним велика кількість факторів – від відсутності сигналів, направлених на виживання клітини – трофічних факторів або інших сигнальних молекул, до сигналів, які «вмикають» апоптотичну реакцію. У хребетних більшість форм апоптозу відбувається завдяки виходу апоптогенних білків із між мембранного простору мітохондрій у цитоплазму клітини (мітохондріальний шлях). Можливий також об'єднана сигнальна та мітохондріальна індукція апоптозу.

Різні шляхи індукції апоптозу конвертуються у загальний шлях апоптозу протягом **ефекторної фази**. Як правило, відбувається активація каскаду білків-ефекторів та регулюючих їх білків-модуляторів. Основними ефекторами апоптозу є каспази, які у процесі активації запускають так званий каспазний каскад – складні ланцюги взаємодії ініціаторних та ефекторних каспаз.

Ініціаторні каспази активують ефекторні каспази, які, у свою чергу, безпосередньо приймають участь у безпосередньому гідролізі клітинних структур – ядерної ламіни, цитоскелета, знищенні білків клітинної адгезії, а також інактивації білків, що блокують апоптоз.

Незважаючи на тип вихідного ініціюючого впливу, наслідком запрограмованої клітинної загибелі є **деградація** клітини на окремі апоптотичні тільця, що обмежені плазматичною мембраною. Як вже зазначалося, ці тільця досить швидко фагоцитуються

спеціалізованими або сусідніми клітинами, без розвитку запальної реакції.

Згідно з сучасними уявленнями, апоптоз в якості механізму противірусного захисту популяції виник у прокаріот і закріпився у одноклітинних прокаріот; у подальшому, з появою багатоклітинних організмів, механізми апоптозу удосконалювалися. Разом з захистом від патогенів, програмована клітинна загибель посіла важливе місце у реалізації таких життєвих функцій як диференціювання клітин і тканин протягом ембріогенезу і постембріонального розвитку, елімінації незатребуваних чи старих клітин, а також клітин, які зазнали впливу мутагенних факторів, клітин імунної системи тощо.

### **Питання для підготовки та контролю:**

1. Етапи клітинного циклу.
2. Регулятори клітинного циклу: фактори росту.
3. Регулятори клітинного циклу: цикліни і циклін-залежні кінази.
4. Що таке клітини G<sub>0</sub>-періоду?
5. Досліди Л. Гейфліка та межа Гейфліка.
6. Теломери і теломерази.
7. Назвіть типи і перелічіть властивості стовбурових клітин.
8. Програмована загибель клітини – апоптоз.
9. Стадії апоптозу.
10. Надайте порівняльну характеристику апоптозу і некрозу.

### **Рекомендована література**

1. Гістологія. Цитологія. Ембріологія : підручник / за ред.: О. Д. Луцика, Ю. Б. Чайковського. – Вінниця : Нова Книга, 2018. – 592 с.
2. Загальна цитологія і гістологія : підручник / М. Е. Держинський, Н. В. Скрипник, Г. В. Островська та ін. ; за ред. М. Е. Держинського ; упорядкування Н. В. Скрипник – К.: Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2010. – 575 с.
3. Plopper G., Sharp D., Sikorski E. (Eds.) Lewin's Cells. Jones and Bartlett Learning, 2015. – 1080 p.
4. Альбертс Б., Джонсон А., Левіс Д., Реф М., Робертс К., Уолтер П. Молекулярна біологія клітини. Переклад з англійської. - Львів: Видавничий дім «Наутікус», 2018. - 1536 с.

## Корисні ресурси

5. Cell Cycle and Cell Division. – Cell Biology. – Topic Room // Scitable by nature education: Library. – Електр. дан. – Режим доступу: <https://go.nature.com/3txjtuS> : (дата звернення 01.02.2022). – Загол. з екрана.

6. Chromosomes and Cytogenetics: Genetics. – Topic Room // Scitable by nature education: Library. – Електр. дан. – Режим доступу: <https://go.nature.com/3qdRdeA> : (дата звернення 01.02.2022). – Загол. з екрана.

## ДОДАТКИ

### Додаток 1

## ОКРЕМІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ КЛІТИНИ

Мікроскопія (візуальне спостереження об'єкта за допомогою спеціальних збільшувальних приладів-мікроскопів) є головним методичним прийомом у цитології і гістології. Для отримання збільшених зображень у мікроскопах використовують квантове випромінення різного виду (видимий діапазон, ультрафіолет або рентгенівське), а також потоки елементарних часток (електронів). Таким чином, існує декілька різновидів мікроскопічного методу: світлова, ультрафіолетова, рентгенівська та електронна.

Основним методом сучасної цитології залишається метод світлової мікроскопії, який має цілий ряд доповнень і модифікацій, що дозволяють значно розширити його аналітичні можливості.

Найбільш поширеними методами серед світлової мікроскопії є так звані **оптичні методи** мікроскопії, до яких відносять світлопольну, темнопольну, фазово-контрастну та інтерференційну мікроскопію. При дослідженнях клітин з успіхом використовують також цитофізичні, цитохімічні і гістохімічні методи дослідження ультраструктури клітини, електронну мікроскопію.

## ОПТИЧНІ МЕТОДИ

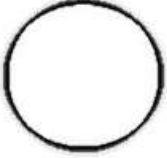
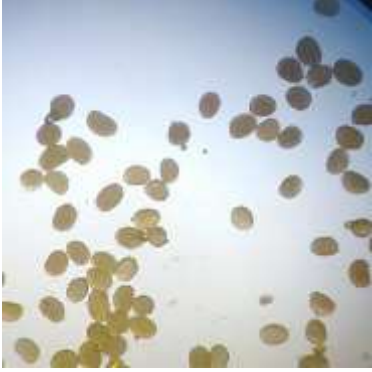
**Світлова мікроскопія.** У цьому випадку об'єктами дослідження є препарати, які потрібно вивчати у потоці світла, що проходить через препарати наскрізь; такі препарати повинні бути достатньо прозорі, тонкі й контрастні. Біологічні об'єкти не завжди володіють цими якостями. Для вивчення їх в біологічному мікроскопі необхідно попередньо приготувати відповідні препарати шляхом фіксації, зневоднення, виготовлення тонких зрізів, фарбування тощо. Потрібно також пам'ятати, що процес виготовлення такого препарату може призвести до появи артефактів – випадків зміни клітинних структур.

Гранична роздільна здатність світлопольного біологічного мікроскопу при масляній імерсії –  $1700 \text{ \AA}$  ( $0,17 \text{ мкм}$ ) в монохроматичному світлі і  $2500 \text{ \AA}$  ( $0,25 \text{ мкм}$ ) в білому світлі. Подальше збільшення роздільної здатності може йти лише за рахунок зменшення довжини хвилі світла.

Таблиця 1.1

### Порівняння методів налаштування освітлення

(за допомогою конденсору)

| Тип освітлення            | Вигляд зіниці об'єктива без окуляра                                                 | Спосіб створення освітлення                                                                                                                                                                          | Вигляд препарату                                                                      |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Світло-польна мікроскопія |   | Світло рівномірно проходить крізь поле зору                                                                                                                                                          |   |
| Косе освітлення           |  | Світло проходить крізь поле зору під кутом, тому що конденсор закриває частину отвору (цей ефект можна отримати, створюючи часткову перешкоду на шляху світлового потоку перед дзеркалом мікроскопа) |  |
| Темнопольна мікроскопія   |  | Використовують спеціальний темнопольний конденсор                                                                                                                                                    |  |

**Метод косого освітлення** – є різновидом світлопольної мікроскопії. Різниця між ними полягає в тому, що світло на об'єкт направляють під досить великим кутом до прямого спостереження. Таким чином підкреслюють рельєфність об'єкта за рахунок утворення тіней.

**Темнопольна мікроскопія.** Метод заснований на принципі розсіювання світла на границі між фазами з різними показниками заломлення. Досягається це в темнопольному або звичайному біологічному мікроскопі за допомогою спеціального темнопольного конденсора, який пропускає тільки дуже косі крайові промені джерела світла. Оскільки крайові промені мають сильний нахил, вони не потрапляють в об'єктив і поле зору мікроскопа виявляється темним, а об'єкт, освітлений розсіяним світлом, здається світлим. На препаратах клітин зазвичай містяться структури різної оптичної щільності. На загальному темному тлі ці структури чітко видно завдяки їх світінню. Біологічні об'єкти розсіюють промені світла, які падають на них і це створює світіння об'єктів (ефект Тиндала). Роздільна здатність такого мікроскопа велика (менше 0,2 мкм). Темнопольні мікроскопи використовують для дослідження живих і незабарвлених біологічних об'єктів.

**Фазово-контрастна мікроскопія.** Метод заснований на тому, що окремі ділянки прозорого препарату відрізняються від навколишнього середовища за показником заломлення. Світло, що проходить крізь різні ділянки, поширюється з різною швидкістю, тобто відбувається зміщення фаз, що виражається в зміні яскравості. Частинки з показником заломлення, що більший за показник заломлення середовища, дають темні зображення на світлому тлі, а частинки з показником, меншим за показник середовища, є світлішими за навколишній фон. Фазово-контрастна мікроскопія дозволяє виявити безліч деталей і особливостей живих клітин і зрізів тканин. Велике значення має цей метод для вивчення тканин, культивованих *in vitro*.

Прозорі об'єкти дуже часто виглядають зовсім по-різному, якщо їх мікроскопують при позитивному та негативному фазово-контрастному освітленні (рис. 1).



**Рис. 1. Кон'югація парамецій при позитивному і негативному фазовому контрастах** (з сайту MicroscopyU, [www.microscopyu.com/galleries/phase-contrast](http://www.microscopyu.com/galleries/phase-contrast))

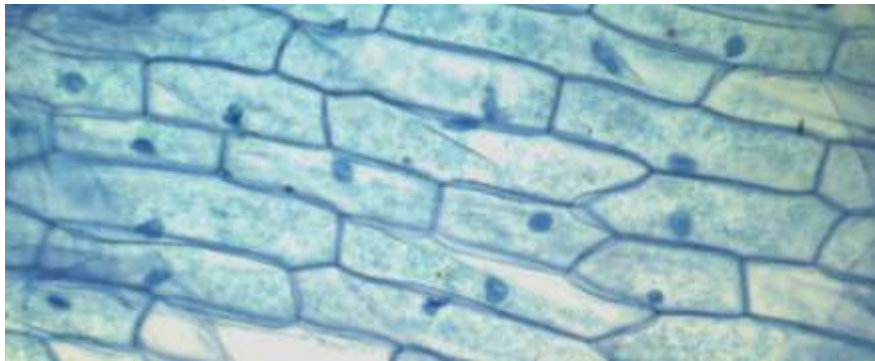
**Інтерференційна мікроскопія, диференціальний інтерференційний контраст (DIC-мікроскопія).** Цей метод близький до методу фазово-контрастної мікроскопії та дає можливість отримати контрастне зображення нефарбованих прозорих живих клітин, а також обчислити суху вагу клітин. Інтерференційний мікроскоп влаштований так, що пучок паралельних світлових променів від освітлювача розділяється на два потоки. Один з них проходить через об'єкт і набуває зміни в фазі коливання, інший йде, минаючи об'єкт. У призмах об'єктива обидва потоки знову з'єднуються і інтерферують між собою. В результаті інтерференції створюється зображення, на якому ділянки клітини, що мають різну товщину або різну щільність, будуть відрізнятися одна від одної за ступенем контрастності. У цьому приладі, вимірюючи зрушення фаз, можна визначити концентрацію і масу сухого речовини в об'єкті.



**Рис. 2. Зовнішній вигляд синьо-зеленої водорості (ціанобактерії) *Spirulina* при фазовому контрасті та DIC-мікроскопії (зображення з сайту MicroscopyU, <https://www.microscopyu.com/galleries/dic-phase-contrast>)**

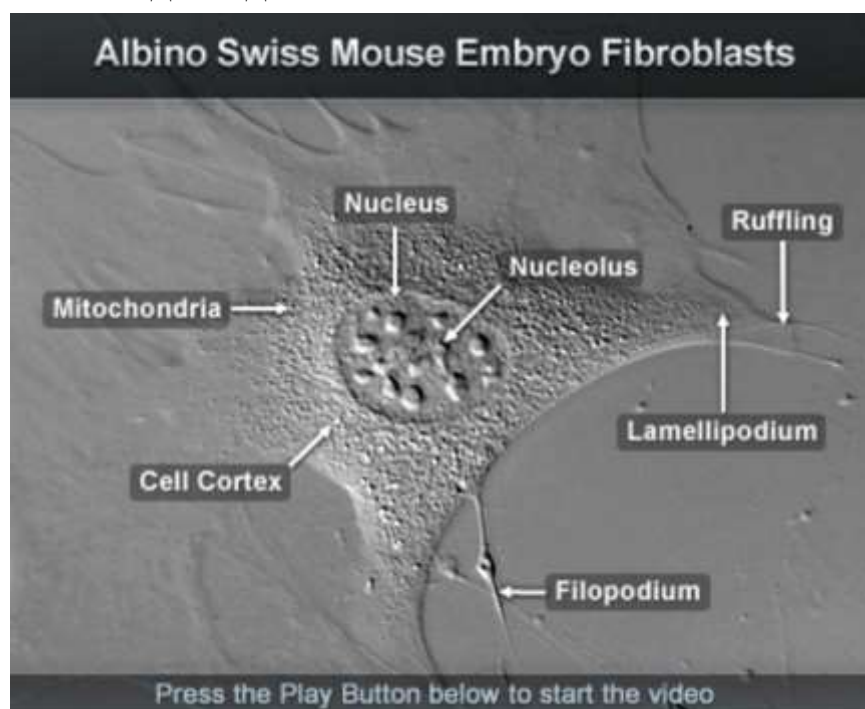
## **ПРИЖИТТЄВІ (ВІТАЛЬНІ) ДОСЛІДЖЕННЯ КЛІТИН**

**Спостереження живих клітин.** Спостерігати живі клітини можна за допомогою фазово-контрастної, інтерференційної, темнопольної мікроскопії та мікроскопії світлого поля. В останньому випадку клітини зазвичай потребують додаткового забарвлення вітальними барвниками. Це барвники кислої (трипановий синій, літєсвий кармін) або основної (нейтральний червоний, метиленовий синій) природи, які застосовують при дуже великому розведенні, мінімізуючи таким чином вплив барвника на життєдіяльність клітини. При забарвленні живих клітин барвник збирається в цитоплазмі у вигляді гранул, а в пошкоджених або мертвих клітинах відбувається дифузне фарбування цитоплазми і ядра. Час забарвлення препаратів сильно варіює, але для більшості вітальних барвників він складає від 15 до 60 хв. Для короткочасного спостереження клітини поміщають просто в рідке середовище на предметне скло. При тривалому спостереженні за клітинами використовують спеціальні камери. У будь-якому з цих випадків клітини вивчаються в спеціально підібраних середовищах (вода, фізіологічний розчин, розчин Рінгера та ін.).



**Рис. 3. Прижиттєве спостереження клітин. Клітини *Allium cepa* L., забарвлені за допомогою вітального барвника метиленовий синій, світлопольна мікроскопія (об. 20×, ок.15×)**

**Метод клітинних культур.** Культивування клітин і тканин поза організмом (*in vitro*) пов'язане з дотриманням певних умов: відповідне живильне середовище, певна температура, певна кількість клітин, стерильність, регулярні пересівання культури на свіже живильне середовище. В даний час метод культивування клітин поза організмом широко використовують не лише для цитологічних, а й для селекційних, генетичних, мікробіологічних, вірусологічних, біохімічних та інших досліджень.

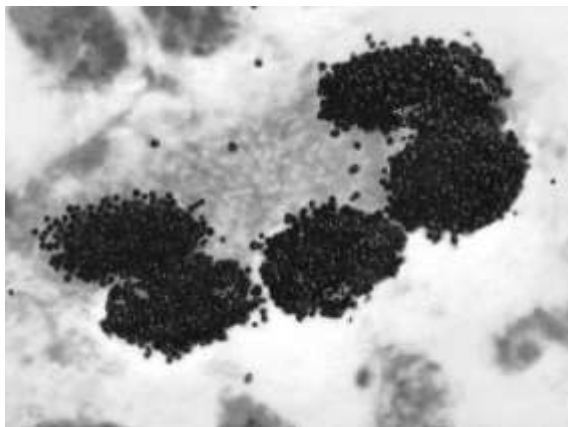


**Рис. 4. Скріншот відео культури фібробластів білої миші (діс-мікроскопія) (місцезнаходження відео – сайт MicroscopyU, <https://www.microscopyu.com/galleries/cell-motility>)**

**Методи мікрохірургії (мікрургія клітини).** Дані методи передбачають оперативне втручання в клітину. Мікрооперації на окремих клітинах дрібних розмірів стали проводити з початку ХХ століття, коли було сконструйовано прилад мікроманіпулятор. З його допомогою клітини можна розрізати, вилучити з них окремі частини, ввести певні речовини (мікроін'єкція) і т. ін. Мікроманіпулятор поєднується зі звичайним мікроскопом, в який спостерігають за ходом операції. Мікрохірургічними інструментами служать скляні гачки, голки, капіляри, які мають мікроскопічні розміри. Крім механічного впливу на клітини в мікрургії останнім часом широко застосовують мікропучки ультрафіолетового світла або лазерні мікропучки. Це дає можливість практично миттєво інактивувати окремі ділянки живої клітини.

## ЦИТОФІЗИЧНІ МЕТОДИ

**Метод радіографії.** Метод базований на тому, що радіоактивні ізотопи після введення до організму приймають участь у загальному клітинному метаболізмі і включаються до молекул відповідних речовин. Місця їх локалізації визначають за властивим ізотопам випроміненням, яке знаходять за засвіченням фотопластинки чи фотоплівки при накладенні її на препарат. Як правило, препарати виготовляють через певні проміжки часу після введення ізотопу з урахуванням часу проходження конкретних етапів метаболізму. Цей метод найбільш придатний для з'ясування локалізації місць синтезу біополімерів, для визначення шляхів переносу речовин у клітині, для спостереження за міграцією або властивостями окремих клітин.

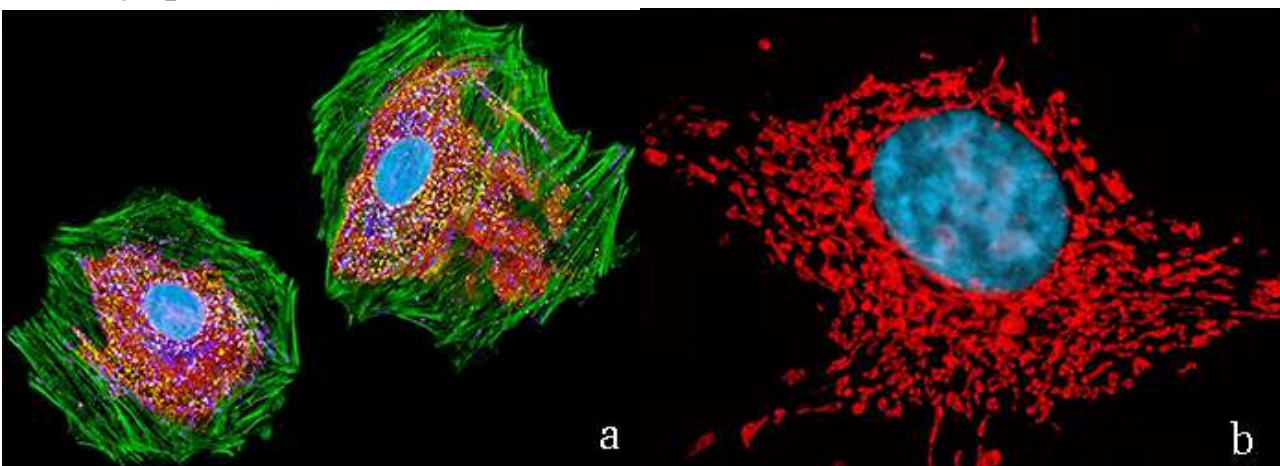


**Рис. 5. Метод радіоавтографії.**

Включення до ядер клітин сполучної тканини міченого тритієм тимідину, який приймає участь у синтезі нуклеїнових кислот (джерело зображення – БСЭ, Т.1 (А-АНГОБ), ст. «Авторадиография», 3-е изд., 1970, с. 166)

## Флуоресцентна мікроскопія

В основі методу лежить властивість деяких речовин флуоресціювати в ультрафіолетовому промінні. Для подібних досліджень використовують ультрафіолетовий мікроскоп, у конденсорі якого встановлено світлофільтр, що виокремлює із загального світлового пучку синє та ультрафіолетове проміння. Другий світлофільтр, що знаходиться перед очима спостерігача, поглинає це проміння, пропускаючи проміння флуоресценції, яке випромінює препарат. Джерелом освітлення слугують ртутні лампи та лампи розжарювання, які дають потужне ультрафіолетове випромінювання у загальному світловому потоці. Додатковою перевагою флуоресцентної мікроскопії є можливість вивчати живу клітину (рис. 6).

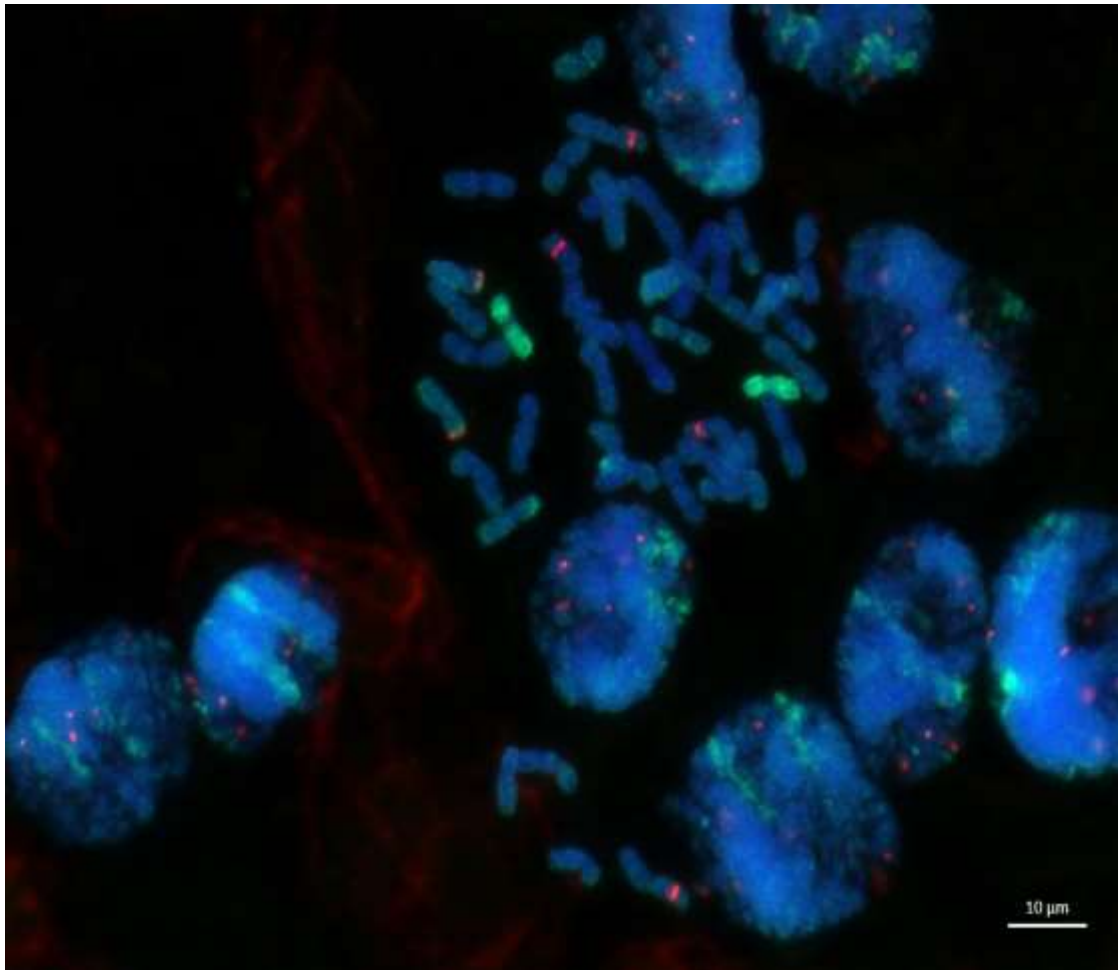


**Рис. 6. Флуоресцентна мікроскопія.** А – клітини міобласту аорти щура: зелена флуоресценція – філаменти актинової мережі, червона – мітохондрії, блакитна – ДНК у ядрах клітин; б – епітеліальні клітини нирок кролика, червона флуоресценція – внутрішньоклітинна мітохондріальна мережа, блакитна флуоресценція – ДНК у ядрі (зображення з сайту MicroscopyU, <https://www.microscopyu.com/galleries/fluorescence/cells>)

Цілий ряд структур та речовин, що містяться у клітинах, має власну (первинну) флуоресценцію (хлорофіл, вітаміни А, В<sub>1</sub> і В<sub>2</sub>, деякі гормони та ін.). Об'єкти, які не мають власної флуоресценції, можуть бути забарвленими спеціальними барвниками, що флуоресціюють – флуорохромами. У цьому випадку вони стають видимими в ультрафіолеті (так звана вторинна флуоресценція). З

використанням цього методу можна побачити форму об'єкта, вміст та розподіл флуоресціюючих речовин тощо. Так, для виявлення місця локалізації специфічних речовин (білків) застосовують метод імунофлуоресценції – проведення імунохімічних реакцій з використанням флуоресцентно мічених антитіл. Цей метод є надзвичайно чутливим і високо специфічним.

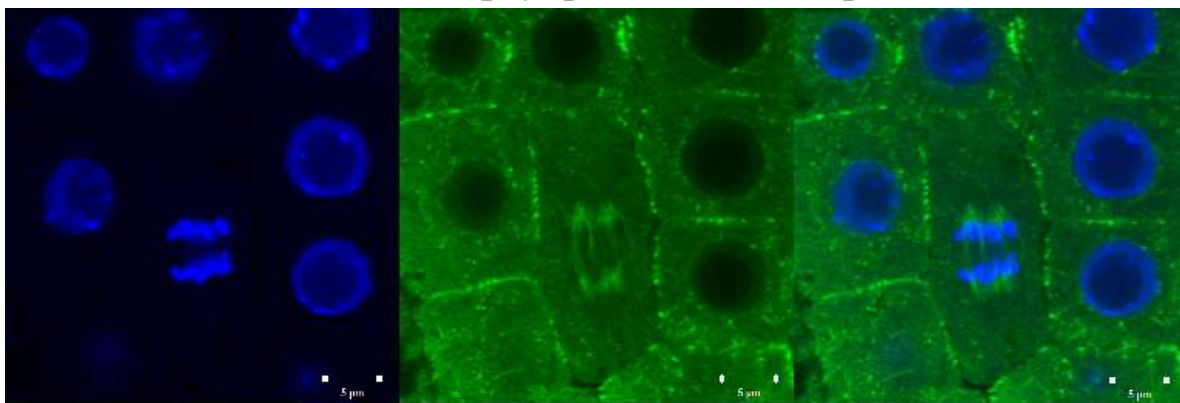
Флуоресцентну мікроскопію можна використовувати для виявлення не тільки білків, але й окремих послідовностей нуклеотидів у ДНК або для визначення місць локалізації РНК-ДНК-гібридних молекул (методи флуоресцентної гібридизації *in situ* FISH та геномної гібридизації *in situ* (GISH), рис. 7).



**Рис. 7. FISH ТА GISH методи.** Мікропрепарат метафазної пластинки та цілих ядер клітин пшениці, до геному яких додано дві чужорідні хромосоми елімуса. Чужорідні хромосоми (зелена флуоресценція) візуалізовані за допомогою гібридизації з тотальною ДНК елімуса. Червоні точки – локуси 25s рДНК; синя флуоресценція – хроматин у складі хромосом і ядер пшениці.

## Конфокальна мікроскопія

Конфокальна мікроскопія є одним із різновидів флуоресцентної мікроскопії. На відміну від звичайного (ширококутного) мікроскопа під час роботи конфокального мікроскопа у кожен момент часу реєструють зображення однієї точки об'єкту, а повноцінне зображення мікроскоп будує за допомогою сканування (руху зразка або перебудови оптичної системи). У пам'ять комп'ютера заносять дані про серію оптичних зрізів, і програмне забезпечення проводить об'ємну реконструкцію об'єкта, а також його тривимірне зображення. Важливою перевагою конфокальної мікроскопії є не стільки збільшення роздільної здатності, скільки значне підвищення контрастності, що дозволяє реєструвати об'єкти, що знаходяться поза зоною видимості звичайних флуоресцентних мікроскопів.



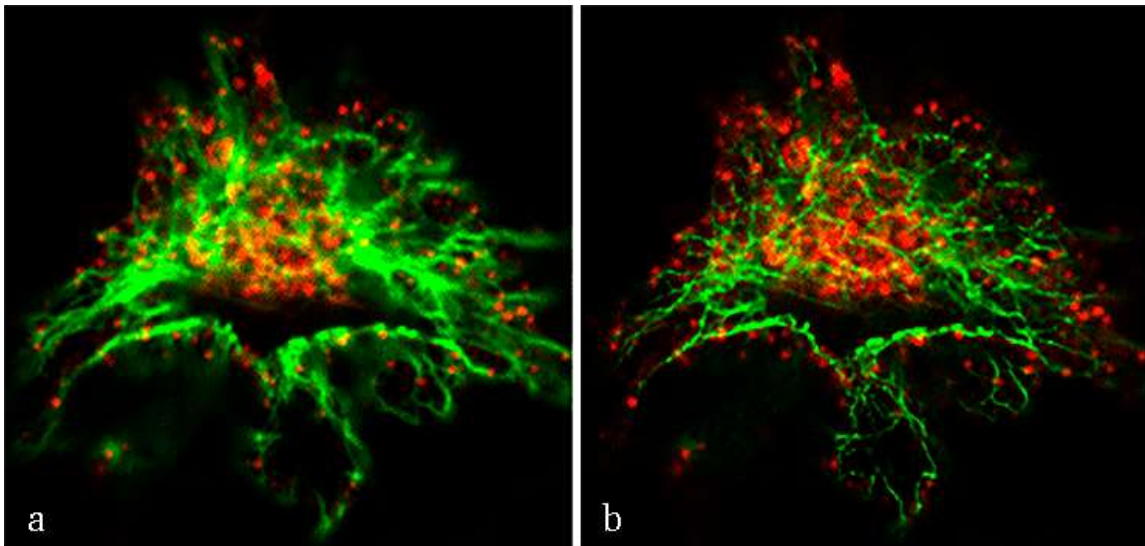
**Рис. 8. Конфокальна мікроскопія:** зелений сигнал від антитіл з барвником, асоційованих з тубуліном мікротрубочок, ДНК ядер і хромосом забарвлена у синій колір (фото – власна робота Yuliya Krasylenko, Wikimedia commons, <https://bit.ly/2Qr99lZ>).

Як і за інших видів флуоресцентної мікроскопії, об'єкти повинні бути марковані антитілами з різними флуорохромами. Конфокальна мікроскопія придатна для проведення спостереження за живими об'єктами.

## Мікроскопія надвисокої роздільної здатності

Протягом останніх декад років розроблені ультрасучасні оптичні методи надвисокої роздільної здатності, які дозволяють подолати дифракційний бар'єр ( $\sim 200$  нм). Принцип роботи у STED-

мікроскопії подібні до конфокальної флуоресцентної мікроскопії. Ключовою відмінністю є те, що окрім збуджуючого лазерного імпульсу, який запускає світіння молекул-флуорофорів, додатково використовують кільцевий імпульс, який гасить їх світіння і зменшує ефективний радіус зони збудження флуорофорів до  $\sim 50$  нм, дозволяючи таким чином деталізувати реконструкцію зображення.



**Рис. 9. Зображення білків віментину (білок проміжних філаментів, зв'язаний з антитілами зеленого кольору) і клатрину (компонент оболонки везикул вакуолярної системи клітини, мічений антитілами червоного кольору), отримані за допомогою: а – конфокального мікроскопу, б – STED-технології (зображення з сайту **STED microscopy products**, <https://bit.ly/36ovrqn>)**

Ще один варіант – так звана PALM, або одномолекулярна мікроскопія. Сутність методу полягає у тому, що використання слабкого збуджуючого імпульсу дозволяє активувати лише частину молекул-флуорофорів (важливо, щоб статистично ці молекули знаходилися на відстані, більшій за дифракційний бар'єр – таким чином, отримане зображення фіксує окремі молекули. Багаторазовий повтор імпульсів, які кожного разу активують новий набір молекул-флуорофорів, отримання великої кількості кадрів дозволяє провести 3-D реконструкцію зображення об'єкта у якості, що перевищує дифракційний бар'єр. Важливість розробки таких методів підтверджена врученням Нобелівської премії 2014 року, яку

отримали Ш. Хелль, Е. Бертциг та У. Мернер «за розробку мікроскопії надвисокої роздільної здатності».

## **ЦИТОХІМІЧНІ І ГІСТОХІМІЧНІ МЕТОДИ**

Цито- та гістохімічні методи дозволяють визначити вміст та локалізацію речовин у клітині завдяки використанню хімічних реактивів, які утворюють з виявленою речовиною комплекси певного кольору. Вказані методи аналогічні методам визначення речовин у аналітичній хімії, але реакція відбувається безпосередньо у виготовленому препараті тканини (клітини), і саме в тому місці, де локалізована речовина, яку досліджують. Кількість кінцевого продукту цитохімічної реакції можна визначити за допомогою методу цитофотометрії, який базовано на визначенні кількості хімічних речовин за інтенсивністю поглинання ними світла певної довжини хвилі. З огляду на те, що інтенсивність поглинання проміння пропорційна концентрації речовини при одній і тій же товщині об'єкта, це дозволяє за оцінкою ступеню поглинання світла дізнатися кількість речовини. Для подібних досліджень використовують мікроскопи-цитوفотометри, у яких за об'єктивом розташовано чутливий фотометр, який реєструє інтенсивність світлового потоку, що пройшов крізь об'єктив. Знаючи площу або об'єм структури, яку потрібно виміряти і значення поглинання, можна визначити як концентрацію даної речовини, так і її абсолютний вміст. Окрім мікроскопів-цитوفотометрів зараз з успіхом використовують комп'ютерну цитофотометрію, аналізуючи цифрові зображення-мікрофотографії відповідно оброблених клітинних об'єктів. Також розроблені прийоми кількісної флуориметрії, яка дозволяє за ступенем світіння визначити вміст речовин, з якими зв'язуються флуорохроми.

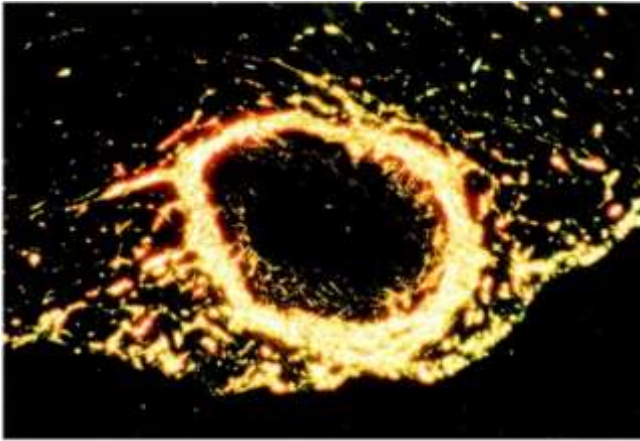
## **ФРАКЦІОНУВАННЯ КЛІТИН**

Принцип методу полягає в тому, що при центрифугуванні під дією відцентрової сили зважені частки осідають на дно центрифужної пробірки у вигляді окремих однородних фракцій клітинних компонентів, придатних для дослідження хімії, ультраструктури і властивостей. Перш ніж піддати клітини центрифугуванню, їх необхідно зруйнувати. Зазвичай клітинні оболонки руйнують за допомогою механічного розтирання тканин або ультразвукової вібрації. Обережне застосування методів руйнування клітин дозволяє зберегти деякі органели в неушкодженому стані.

Існують методики отримання у вигляді чистих фракцій фактично усіх клітинних органел та структур: ядер, ядерець, хроматину, ядерних оболонок, плазматичної мембрани, вакуолей, ендоплазматичного ретикулуму, апарату Гольджі, пластид, лізосом, рибосом, мікротрубочок та ін. Осадження часток у пробірці після центрифугування залежить від їх розмірів та щільності (чим більша або важча частка, тим вища швидкість її осідання).

## **ДОСЛІДЖЕННЯ УЛЬТРАСТРУКТУРИ КЛІТИН**

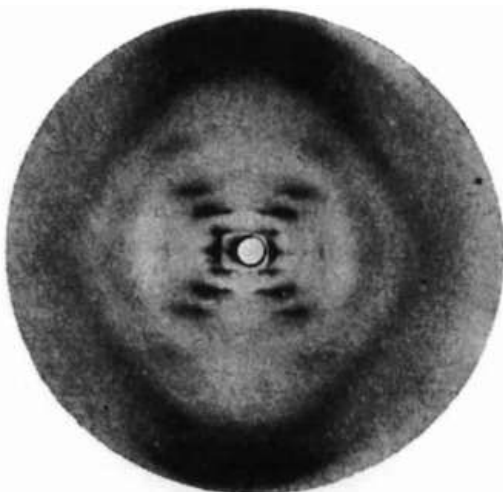
**Поляризаційна мікроскопія.** В основі методу лежить здатність різних компонентів клітин і тканин до заломлення поляризованого світла. Для деяких клітинних структур (нитки веретена поділу, міофібрили і ін.) властива певна орієнтація молекул, яка надає їм властивість подвійного променезаломлення (так звана анізотропність структури). Від звичайного біологічного мікроскопа поляризаційний відрізняється тим, що перед конденсором поміщається поляризатор, а за препаратом і об'єктивом розташовані компенсатор і аналізатор, які дозволяють детально досліджувати подвійне променезаломлення у досліджуваному об'єкті (рис. 10).



**Рис. 10. Подвійне промене- заломлення колагенових волокон у поляризованому світлі:** товсті колагенові волокна набувають яскраво-жовтого та помаранчевого кольорів, а тонкі колагенові і ретикулінові волокна – зеленого (зображення з сайту MIKROMIR) <https://bit.ly/3KSPfLl>

Поляризаційний мікроскоп дає можливість визначити орієнтування частинок в клітинах і інших структурах, чітко бачити структури з подвійним променезаломленням, а при відповідній обробці препаратів можна проводити спостереження молекулярної організації тієї чи іншої частини клітини.

**Метод рентгеноструктурного аналізу.** В основі методу полягає властивість рентгенівських променів відчувати дифракцію при проходженні через кристали. На екрані або фотопластинці з'являється ряд кілець, концентрично розташованих плям і смуг. Кут дифракції визначається відстанню між групами атомів і молекулами в об'єкті. Чим більше відстань між структурними одиницями, тим менше кут дифракції, і навпаки. На екрані це відповідає відстані між темними зонами і центром. Орієнтовані частки дають на діаграмі кола, серпи, точки; неорієнтовані частки в аморфних речовинах – зображення концентричних кілець.



**Рис. 11. Рентгенограма волокна натрієвої солі ДНК** (зображення взято зі статті R. E. Franklin, R. G. Gosling, 1953)

Метод рентгеноструктурного аналізу застосовують для вивчення будови молекул білків, нуклеїнових кислот та інших речовин, що входять до складу цитоплазми і ядра клітин. Він дає можливість визначити просторове розташування молекул, точно виміряти відстань між ними і дослідити внутрішньо-молекулярну структуру.

## ЕЛЕКТРОННА МІКРОСКОПІЯ

**Електронний мікроскоп** відрізняється від світлового тим, що в ньому замість світла використовується швидкий потік електронів, а скляні лінзи замінено електромагнітними полями. Зображення дають електрони, що пройшли через об'єкт і не відхилені ним. У сучасних електронних мікроскопах досягнуто роздільної здатності у 0,1 нм. Під електронним мікроскопом спостерігають неживі об'єкти – препарати. Живі об'єкти вивчати поки не вдається, так як об'єкти поміщаються в вакуум, згубний для живих організмів (у вакуумі електрони не розсіюються, а потрапляють на об'єкт у вигляді потоку). Об'єкти, придатні для дослідження під **трансмісійним електронним мікроскопом**, повинні мати дуже малу товщину, не більше 400-500 Å (0,04-0,05 мкм), інакше вони виявляються непроникними для електронів. Для отримання подібних тонких зрізів застосовують ультрамікромі. Для біологічних об'єктів, особливо вірусів, фагів, нуклеїнових кислот, тонких мембран властива слабка здатність розсіювати електрони, тобто низька контрастність. З огляду на це контрастність таких об'єктів збільшують шляхом напилення на об'єкт важких металів (золото, платина, хром), вуглецевого напилення, або за допомогою обробки препаратів осмієвою або вольфрамовою кислотами і деякими солями важких металів (рис. 12).



**Рис. 12. Брунькування дріжжових клітин у трансмісійному електронному мікроскопі ( $\times 10000$ )**  
(цит. за: Taylor D., Green N., Stout W., Biological Science, 1997)

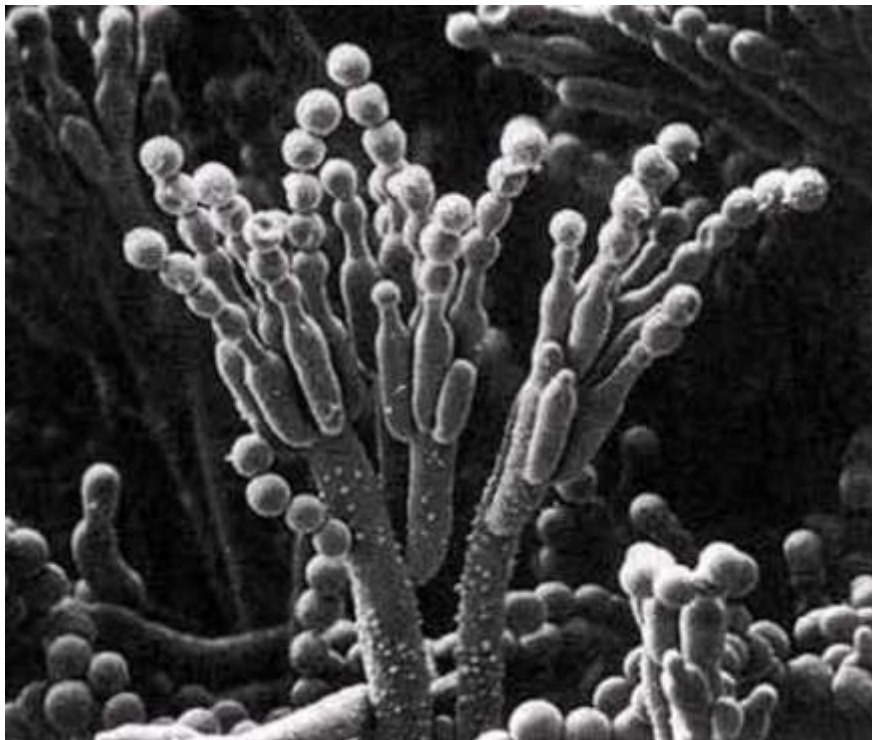
**Метод заморожування – сколювання і заморожування – травлення** полягає в тому, що об'єкт спочатку швидко заморожують рідким азотом, а потім при тій же температурі переносять в спеціальну вакуумну установку, де він механічним способом сколюється охолодженим ножом. При цьому оголюються внутрішні зони заморожених клітин (тканина тріскається вздовж слабо з'єднаних площин, якими зазвичай є мембрани) (рис. 13).

У вакуумі частина води, яка перейшла в склоподібну форму, перегонюється (травлення), а поверхню сколу послідовно покривають тонким шаром випаруваного вуглецю, а потім металу. Таким чином виходить плівка-репліка, що повторює прижиттєву структуру матеріалу, яку вивчають під електронним мікроскопом.

**Метод скануючої (растрової) електронної мікроскопії** дозволяє вивчити тривимірну картину поверхні клітини. При застосуванні цього методу фіксований і спеціальним чином висушений об'єкт покривають тонким шаром випаруваного металу (найчастіше золота), тонкий пучок електронів пробігає по поверхні об'єкта, відбивається від нього і потрапляє в приймальний пристрій, який передає сигнал на електронно-променеву трубку. Завдяки величезній глибині фокуса скануючого мікроскопа, яка значно більше, ніж у трансмісійного електронного мікроскопа, виходить майже тривимірне зображення досліджуваної поверхні.



**Рис. 13.** Електронна мікрофотографія ядра, на якій видно ядерні пори ( $\times 30000$ ) (цит. за: Taylor D., Green N., Stout W., Biological Science. 1997, з модифікаціями)



**Рис. 14.** Електронна мікрофотографія конідієносця і конідій гриба *Penicillium*, отримана за допомогою скануючого електронного мікроскопа (цит. за Taylor D., Green N., Stout W., Biological Science, 1997)

**Метод високовольтної мікроскопії.** Такі електронні мікроскопи мають прискорюючу напругу в 1-3 млн. вольт. При

високій енергії електронів, які менше поглинаються об'єктом, можна розглядати зразки більшої товщини (1-10 мкм). Цей метод є перспективним ще тому, що теоретично при надвисокій енергії електронів зменшується їх взаємодія з об'єктом, що відкриває принципову можливість дослідження ультраструктури живих об'єктів. В даний час ведуться роботи в даному напрямку. Взагалі, методи електронної мікроскопії постійно розвиваються і удосконалюються.

### **Рекомендована література та корисні ресурси**

1. Taylor D., Green N., Stout W. Biological Science 1 & 2. - 3<sup>ed</sup> edition. - Cambridge: Cambridge University Press, 1997. - 984 p.
2. Franklin R. E., Gosling R. G. The Structure of Sodium Thymonucleate Fibres. I. The Influence of Water Content // Acta Cryst. – 1953. – Vol. 6. – P. 673 – 677.
3. Wong E. V. Cells: Molecules and Mechanisms. Axolotl Academic Publishing Company, Louisville, KY, 2009. – 283 p.
4. Microscopy U: The source for microscopy education. – Електр. дан. – Режим доступу: <https://bit.ly/33YWLWxY> : (дата звернення 01.02.2022). – Загол. з екрана.

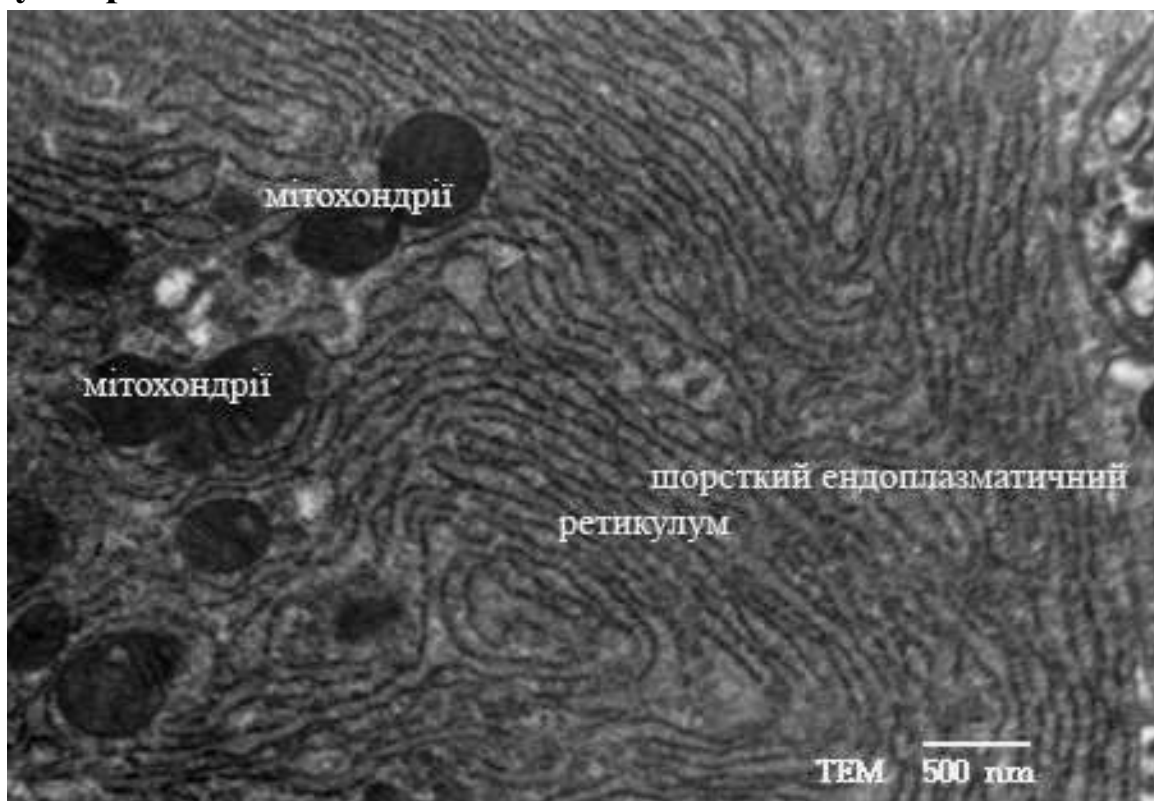
## Ультраструктура деяких клітинних компонентів у електронних мікрофотографіях

### Біологічна мембрана

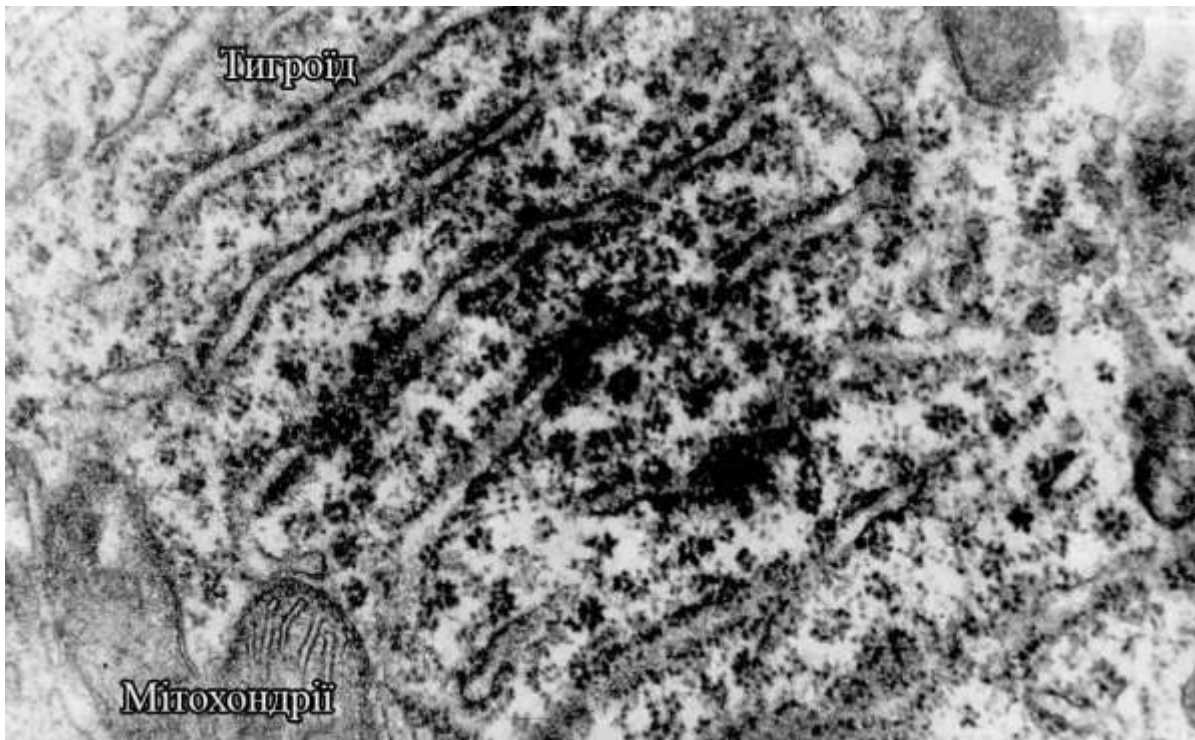


**Рис. 1.** Електронна мікрофотографія ділянок цитоплазматичної мембрани (cell membrane) суміжних клітин (цит. за Bloom and Fawcett, A Textbook of Histology, Chapman and Hall, N.Y., 12th edition, 1994, Figure 1-2, з модифікаціями)

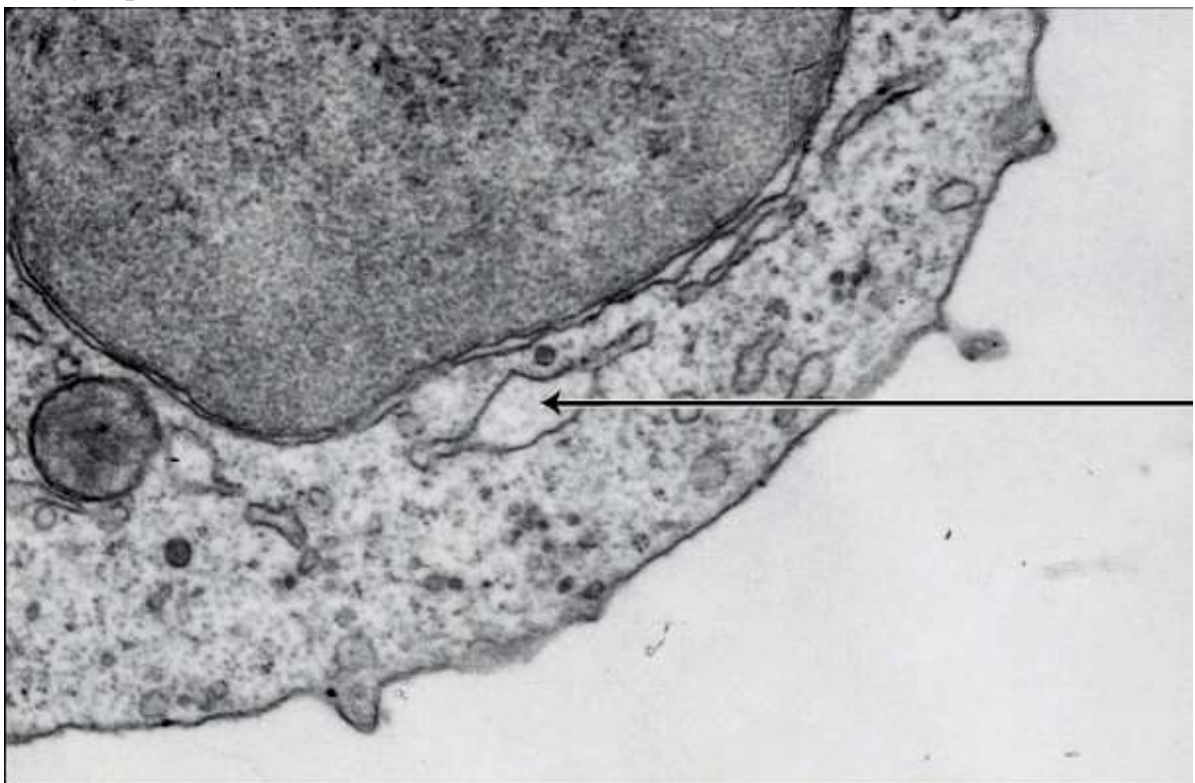
### Вакуолярна система клітини



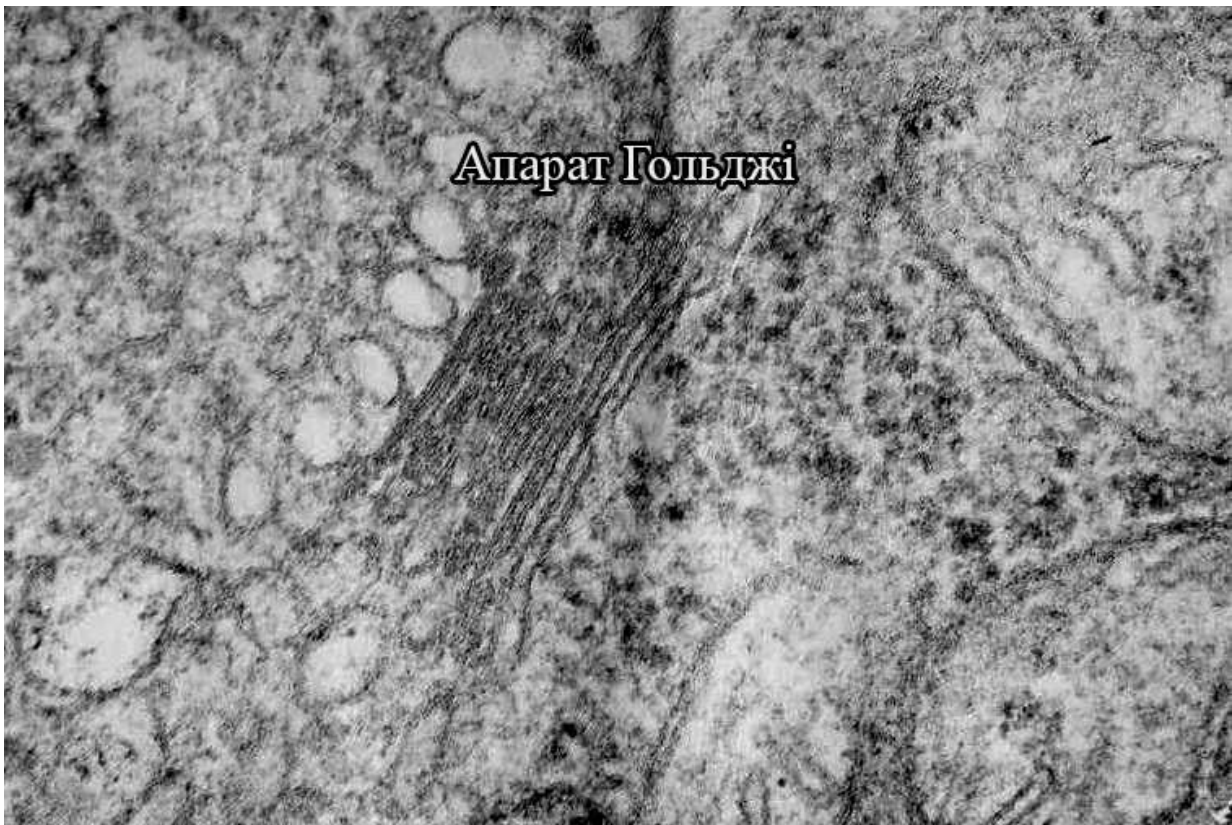
**Рис. 2.** Шорсткий ендоплазматичний ретикулум (rough endoplasmic reticulum network) у клітинах Клара легень ссавця (автор - Louisa Howard; джерело - *Wikimedia Commons*, з модифікаціями, <https://bit.ly/3ezv0Vn>)



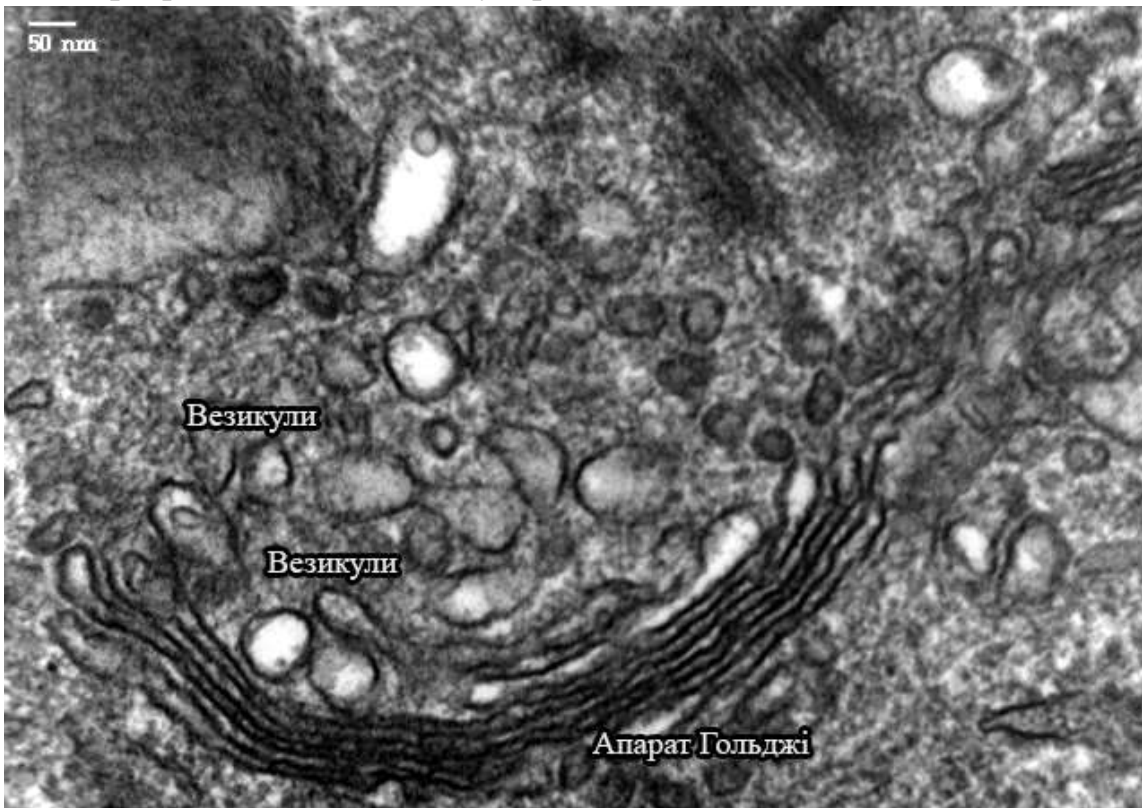
**Рис. 3. Тигроїд або тільця Ніссля, або хроматофільна субстанція** – специфічний компонент нервових клітин, який являє собою цистерни гранулярного ендоплазматичного ретикулуму (фото із архівів кафедри генетики і молекулярної біології ОНУ імені І. І. Мечникова)



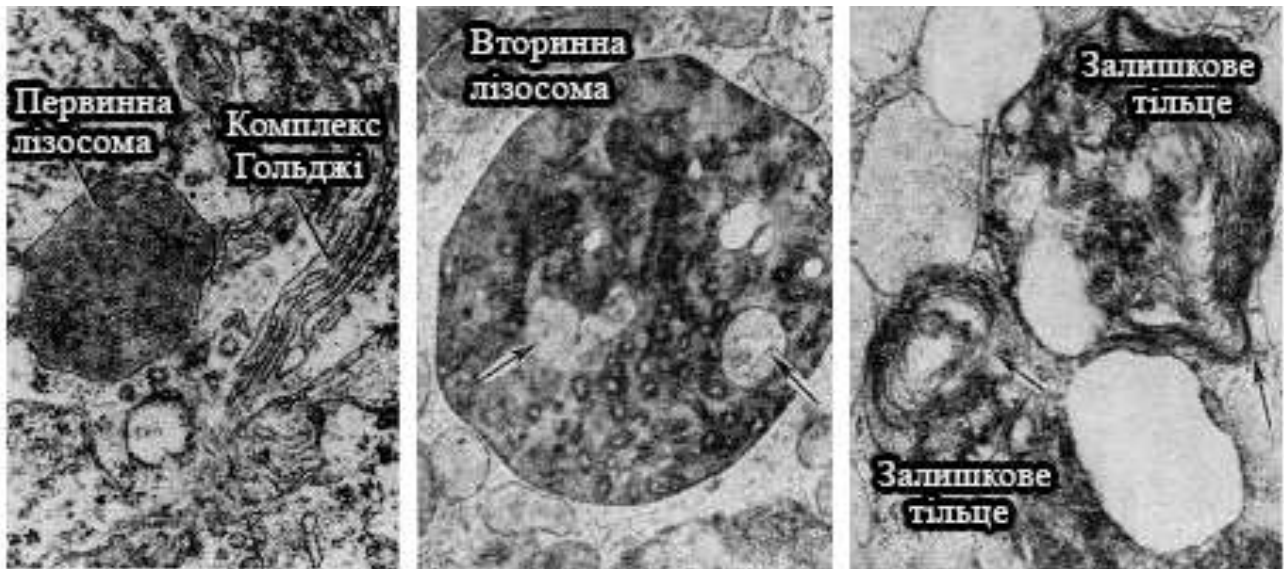
**Рис. 4. Цистерна гладенького ендоплазматичного ретикулуму (smooth endoplasmic reticulum) у клітинах миші** вказана стрілкою (автор - OpenStax; джерело – Wikimedia Commons, <https://bit.ly/3ezv0Vn> OpenStax - <https://bit.ly/3cq21Rr>)



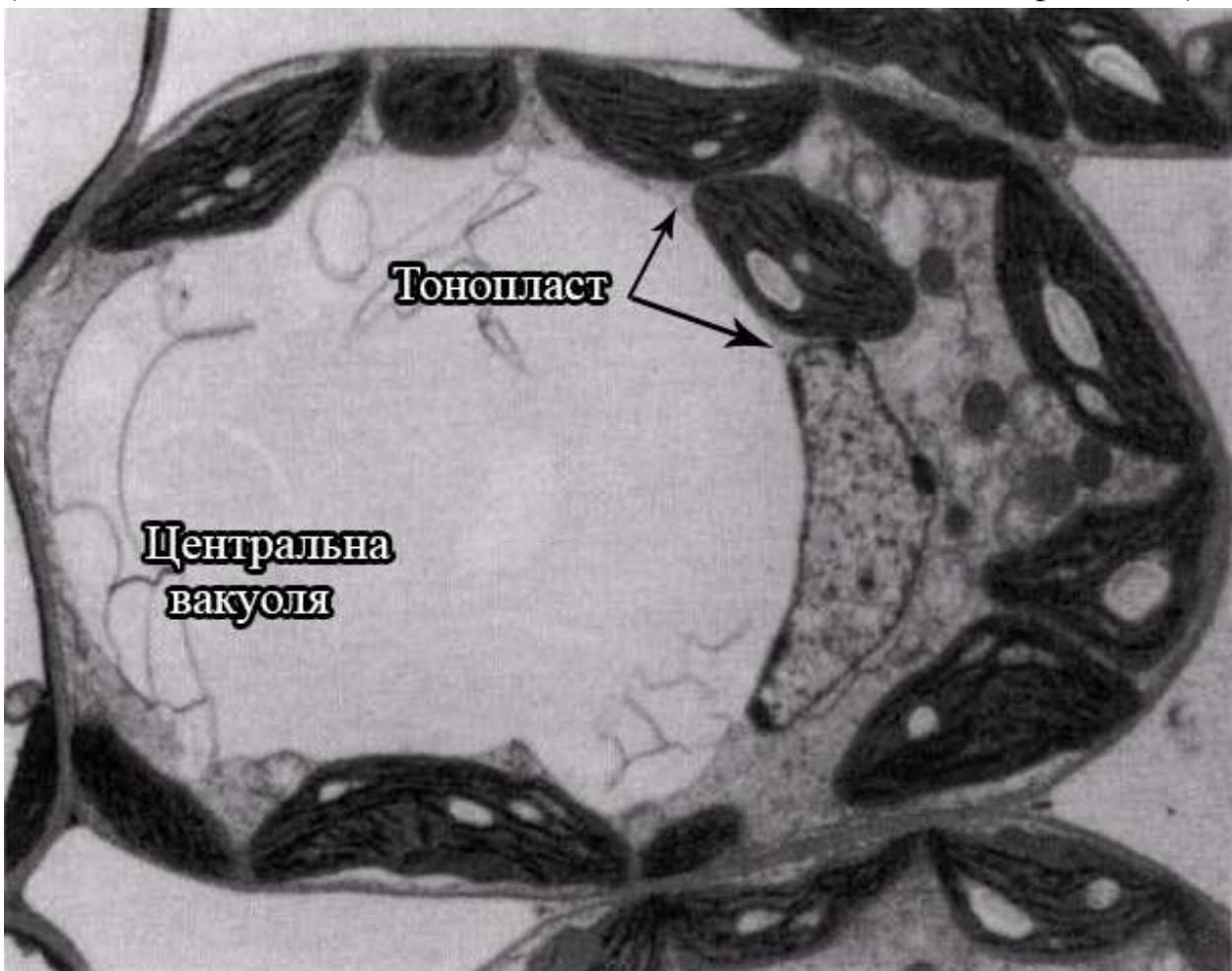
**Рис. 5. Апарат Гольджі (Golgi apparatus) у клітинах тапетуму пиляків злаку (м'якої пшениці) (фото д. біол. наук В. К. Симоненко (СГП), люб'язно надане для кафедри генетики і молекулярної біології ОНУ імені І. І. Мечникова)**



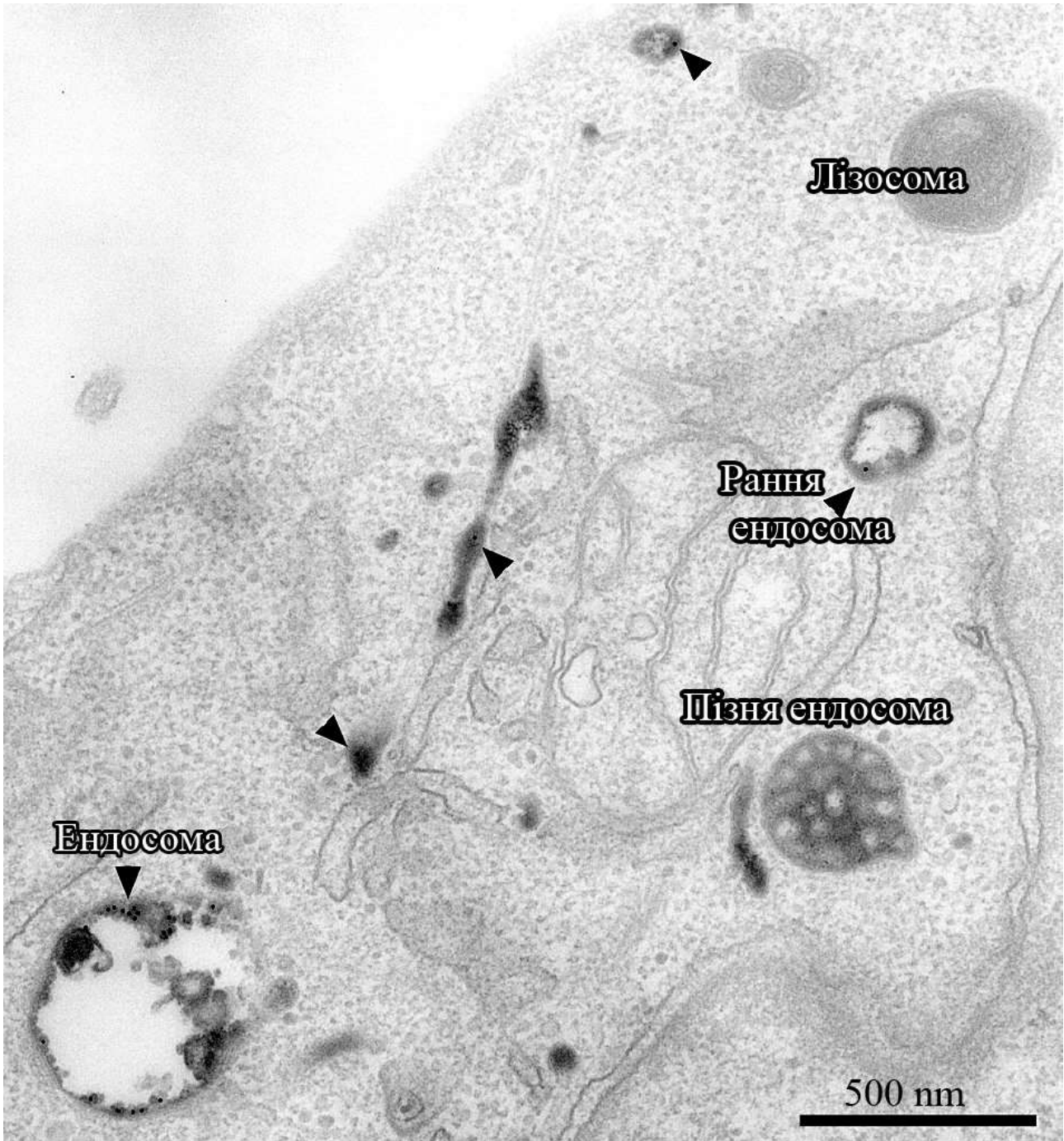
**Рис. 6. Апарат Гольджі у лейкоциті людини (фото – Louisa Howard; Wikimedia Commons, <https://bit.ly/38tBtgI>, з модифікаціями)**



**Рис. 7. Лізосоми (lysosomes):** 1 – первинна лізосома у клітині кори головного мозку кроля, 2 – вторинна лізосома аутофагічного типу в обкладочній клітині шлунка людини (стрілками позначені мітохондрії, що потерпають перетравлення), 3 – постлізосоми (залишкові тільця), вказані стрілками (наведено за БМЭ, стаття «Лизосомы», Т. 13, с. 103, 1980, з модифікаціями)

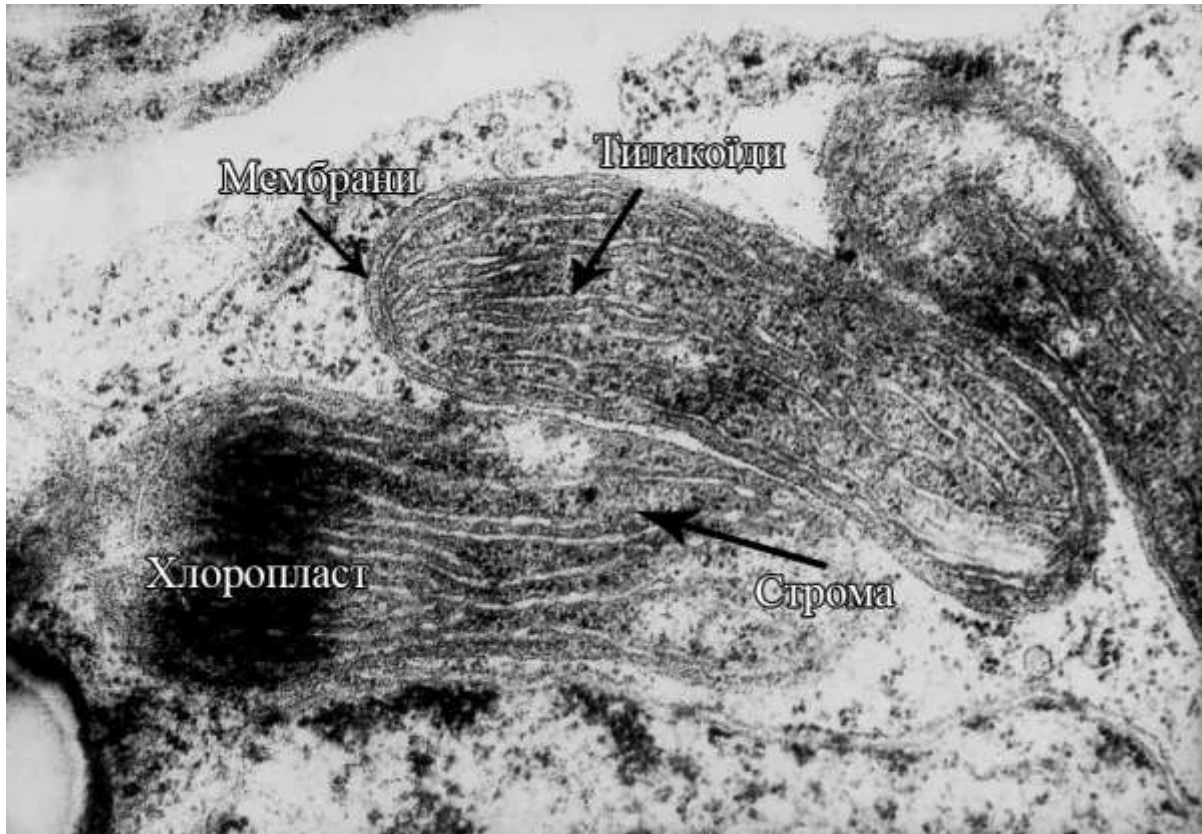


**Рис. 8. Центральна вакуоля (central vacuole)** у рослинних клітинах (цит. за: Taylor D., Green N., Stout W., Biological Science, 1997, з модифікаціями)

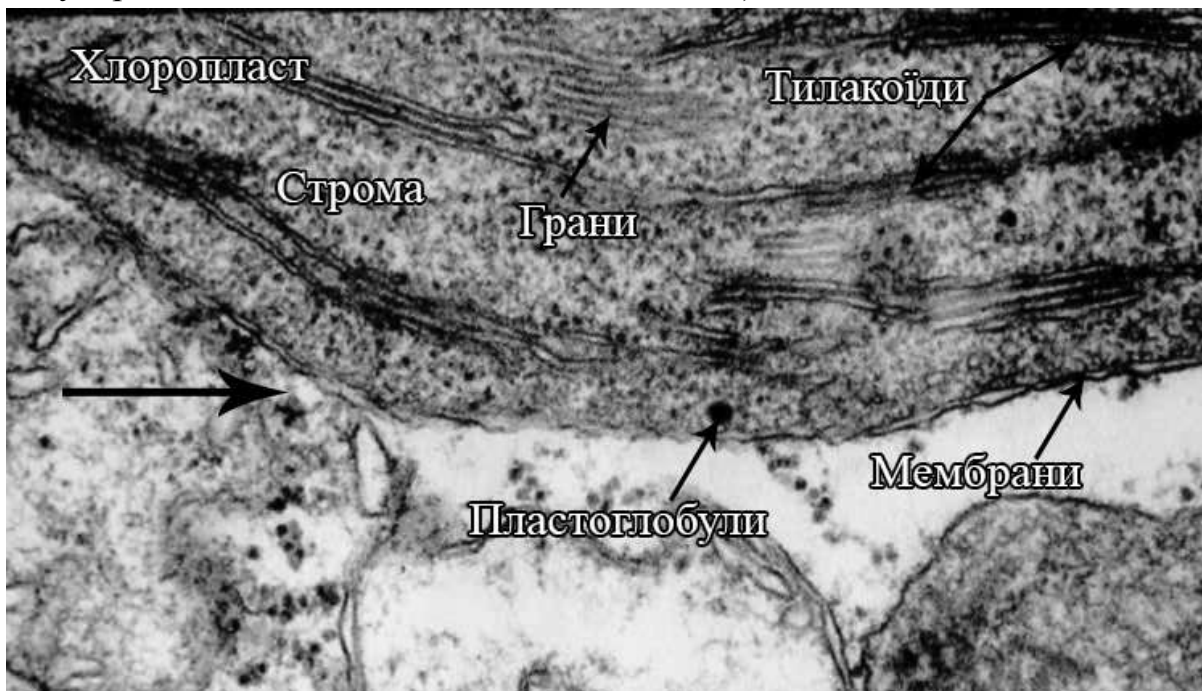
**Везикули**

**Рис. 9. Компартменти ендоцитарного шляху у клітинах HeLa** (Compartments of the endocytic pathway in HeLa cells.) (джерело: HeLa cell endocytic pathway labeled for EGFR and transferring, власна робота Matthew R. G. Russell, CC BY 3.0; <https://bit.ly/3vfpa1z>, з модифікаціями)

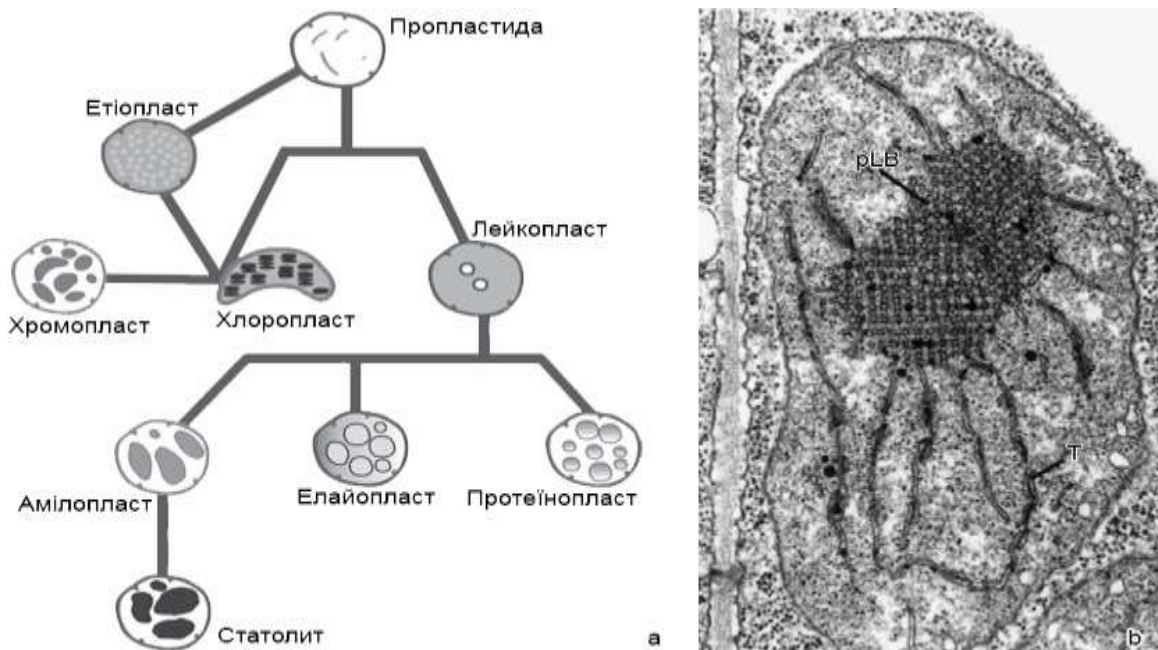
## Енергетична система клітини



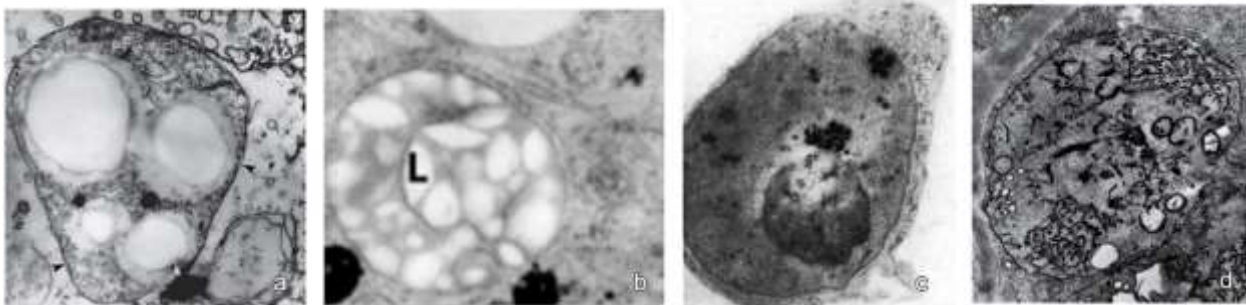
**Рис. 10. Хлоропласти (chloroplasts) у клітинах тапетуму кукурудзи** (фото д. біол. наук В. К. Симоненко (СГП), люб'язно надане для кафедри генетики і молекулярної біології ОНУ імені І. І. Мечникова)



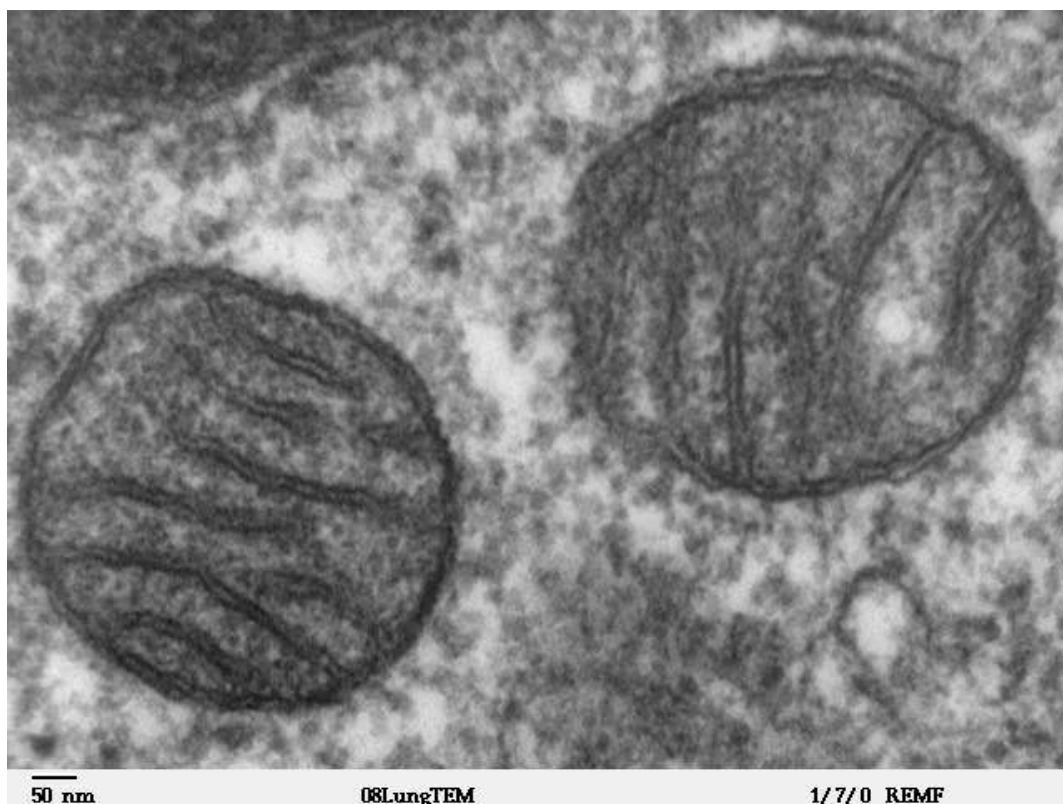
**Рис. 11. Ультраструктура хлоропласта клітин кукурудзи** (фото д. біол. наук В. К. Симоненко (СГП), люб'язно надане для кафедри генетики і молекулярної біології ОНУ імені І. І. Мечникова)



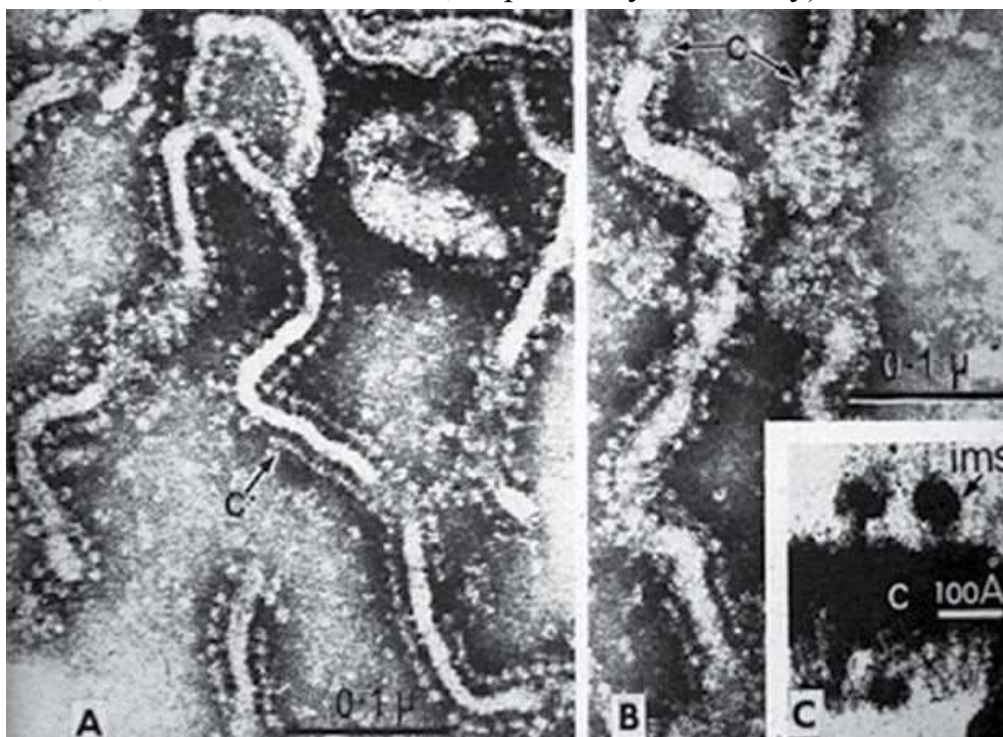
**Рис. 12. Пластиди.** а - Деякі форми пластид та їх перетворення (цит. за Dashek W.V., Miglani G. S. «Plant cells and their organelles» (2017), рис. 10.1) та б – електронна мікрофотографія перерізу етіопласту гороху на початку стимульованого світлом перетворення у хлоропласт, де pLB – проламелярне тільце, а Т – тилакоїди (цит. за Dashek W.V., Miglani G. S. «Plant cells and their organelles» (2017), рис. 10.2), з модифікаціями



**Рис. 13. Пластиди.** а – амилопласт *Psilotum nudum* з великими скупченнями крахмалу та мембраною, вказаною стрілкою (цит. за Dashek W.V., Miglani G. S. «Plant cells and their organelles» (2017), рис. 10.6); б – елайопласти – спеціалізовані на зберіганні ліпідних краплин (позначено літерою L) у клітині тапетуму *Brassica napus* (цит. за Dashek W.V., Miglani G. S. «Plant cells and their organelles» (2017), рис. 10.7, з модифікаціями); с – протеїнопласт (алеїронопласт, алеїропласт), спеціалізована на зберіганні та модифікації білків пластида *Helleborus corsicus* (цит. за Dashek W.V., Miglani G. S. «Plant cells and their organelles» (2017), рис. 10.8); d – ультраструктура хромопласту: окрім двох сітчасто-тубулярних мембранних комплексів, розташованих на периферії органели, у ній присутня невелика кількість внутрішніх мембранних компонентів (цит. за Dashek W.V., Miglani G. S. «Plant cells and their organelles» (2017), рис. 10.3b)

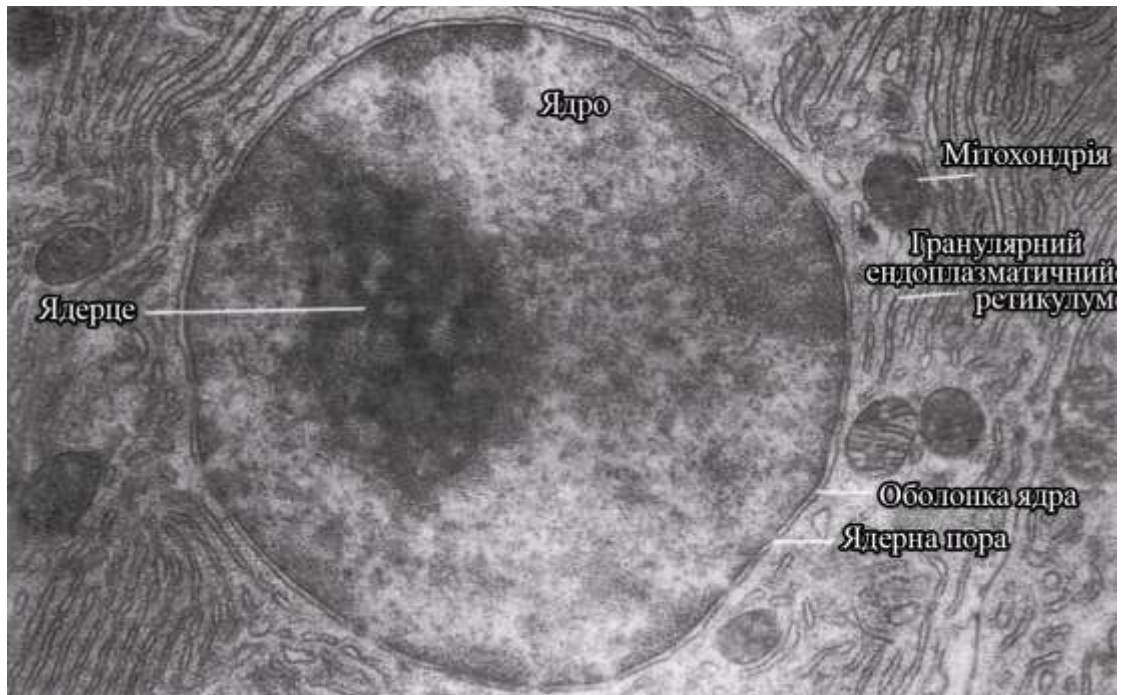


**Рис. 14. Мітохондрії (mitochondria) у клітинах легень ссавців:** (автор – Louisa Howard; Wikimedia Commons, <https://bit.ly/38AO5Ty>)

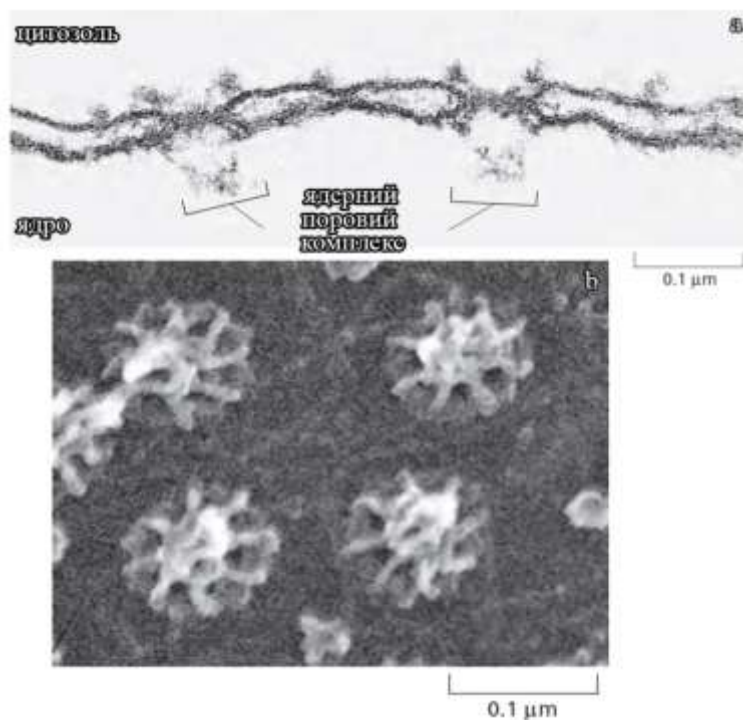


**Рис. 15. Ультраструктура мембран крист мітохондрій.** а, b – негативно забарвлені кристи мітохондрій з комплексами АТФ-синтази, вказаними стрілками; с – збільшені комплекси АТФ-синтази, ims – внутрішній мітохондріальний простір (матрикс) (цит. за Dashek W.V., Miglani G. S. «Plant cells and their organelles» (2017), fig. 7.3).

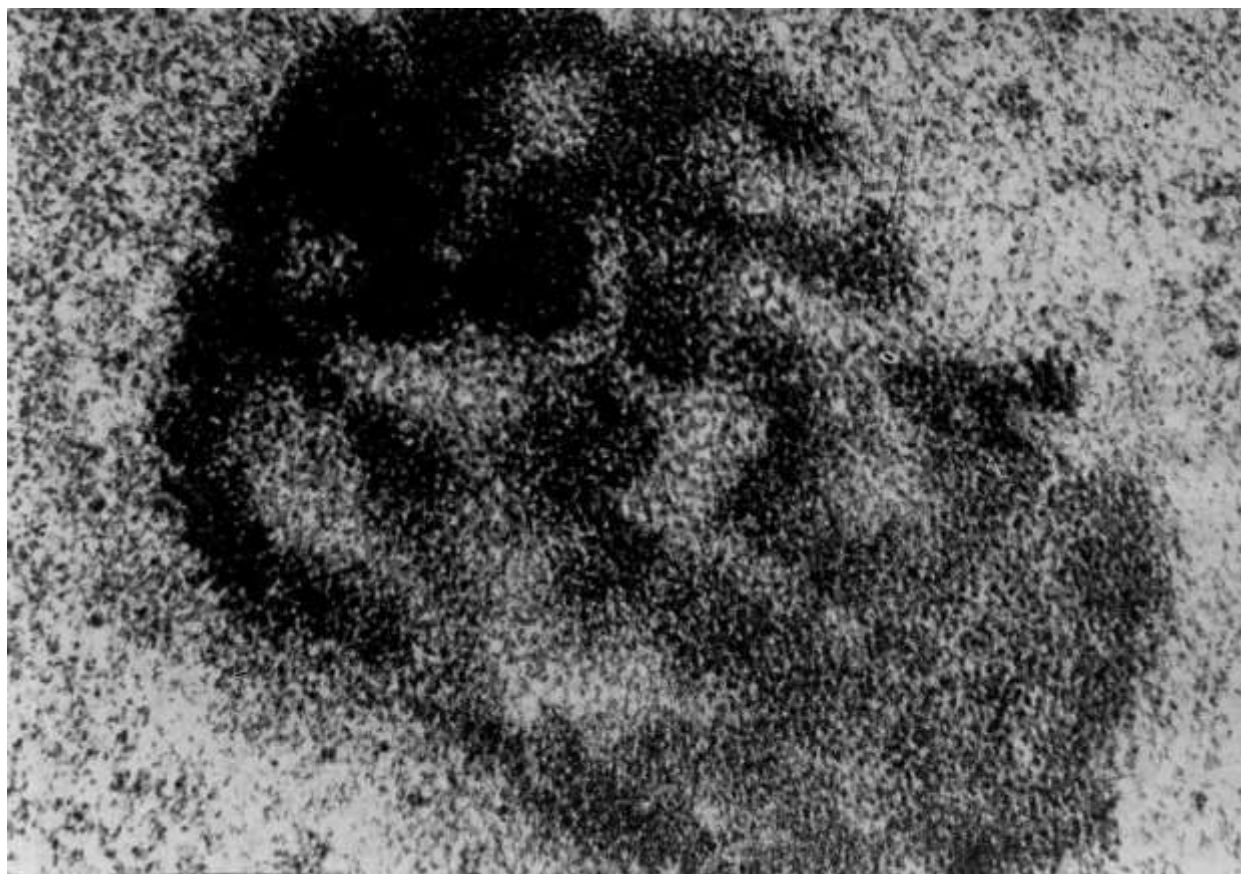
## Інформаційна система клітини



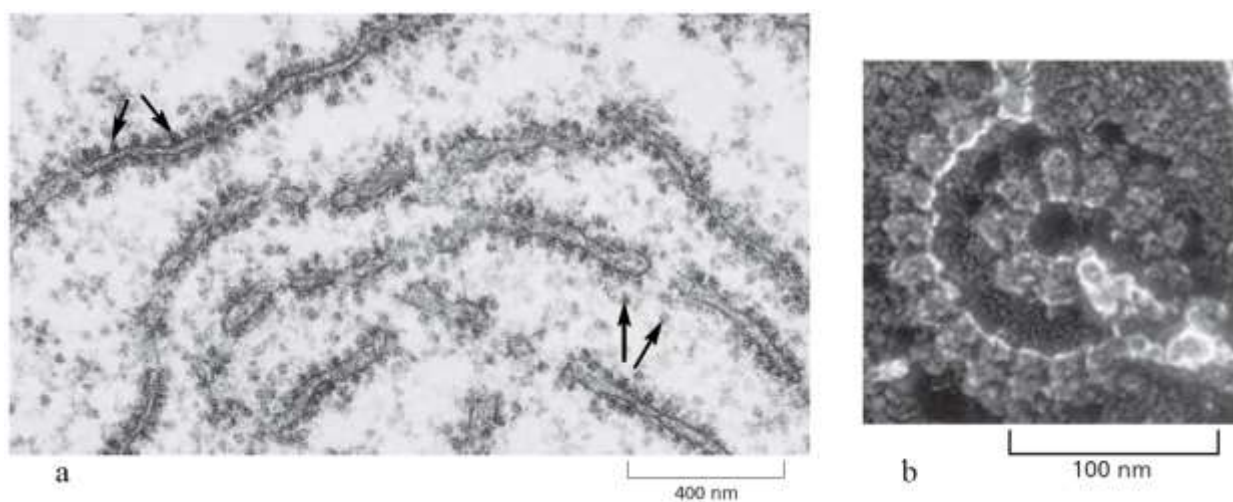
**Рис. 16.** Електронна мікрофотографія клітинного ядра (nucleus), отримана за допомогою TEM (цит. за: Taylor D., Green N., Stout W., Biological Science, 1997, з модифікаціями)



**Рис. 17.** Ядерні порові комплекси (nuclear pore complexes). а – переріз ядерної мембрани з двома ядерними порами (цит. за: Molecular biology of the cell / B. Alberts et al. (2014), fig 12-8(c), з модифікаціями); b – електронна мікрофотографія ядерних порових комплексів ооциту з боку ядра (цит. за: Molecular biology of the cell / B. Alberts et al. (2014), fig 12-8(b), з модифікаціями)

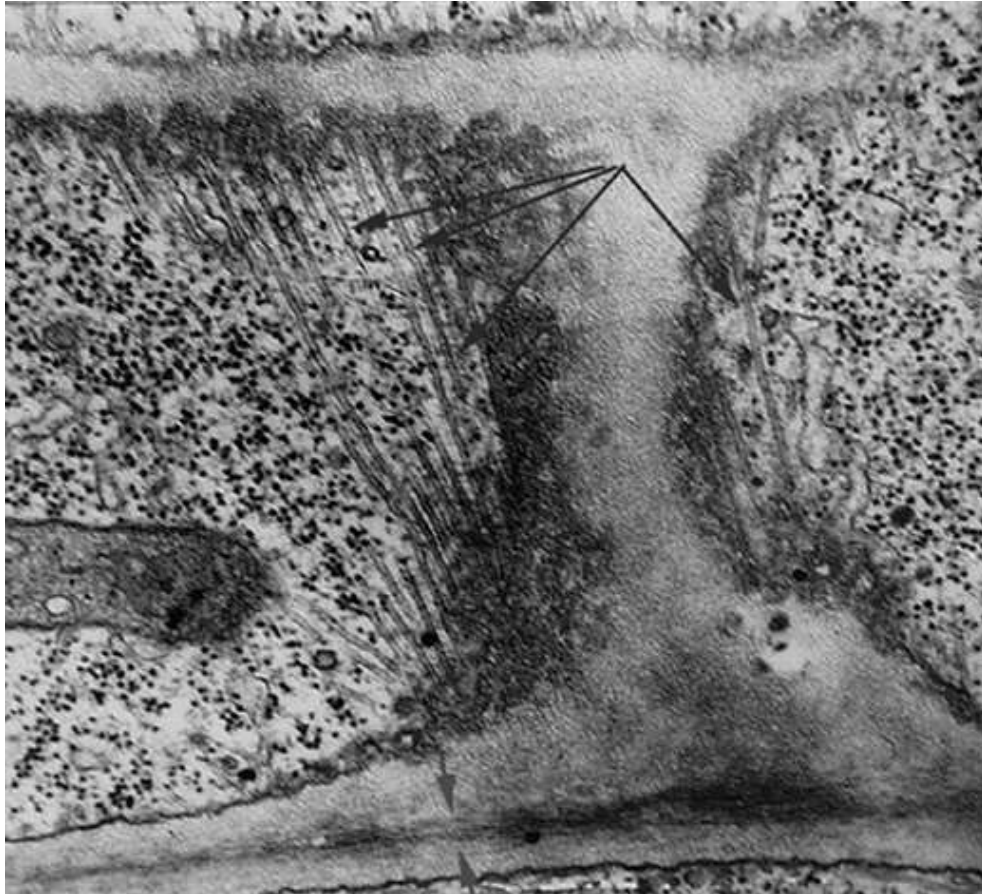


**Рис. 18. Ядерце (nucleolus) клітини підшлункової залози ссавця** (фото із архівів кафедри генетики і молекулярної біології ОНУ імені І. І. Мечникова)

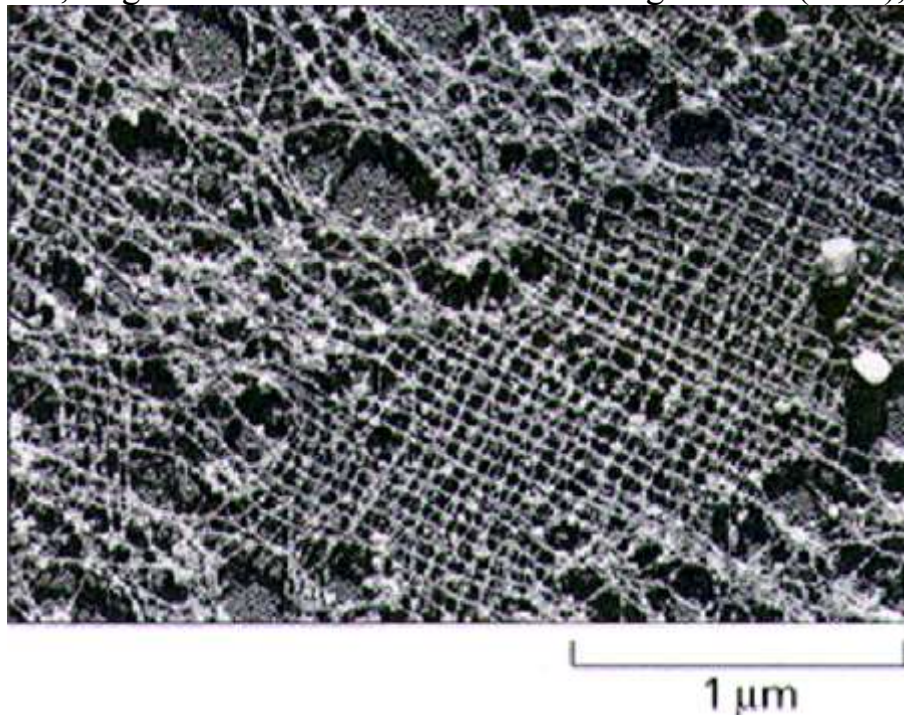


**Рис. 19. Еукаріотичні рибосоми (ribosomes)** а – електронна мікрофотографія ділянки цитоплазми з цистернами ендоплазматичного ретикулуму. Позначені стрілками рибосоми знаходяться на мембранах ЕР та вільно у цитозолі (цит. за: Molecular biology of the cell / B. Alberts et al. (2014), fig 6-60, з модифікаціями); b – електронна мікрофотографія полірибосоми еукаріотичної клітини (цит. за: Molecular biology of the cell / B. Alberts et al. (2014), fig 6-73(b))

## Цитоскелет



**Рис. 20.** Поперечні та повздовжні перерізи мікротрубочок (вказані стрілками) серединної пластинки клітини рястк *Ornithogalum umbellatum* (цит. за Dashek W.V., Miglani G. S. «Plant cells and their organelles» (2017), fig. 6.1)



**Рис. 21.** Проміжні мікрофіламенти (у складі ядерної ламіни) (Джерело - <https://bit.ly/3tDTvWI>)

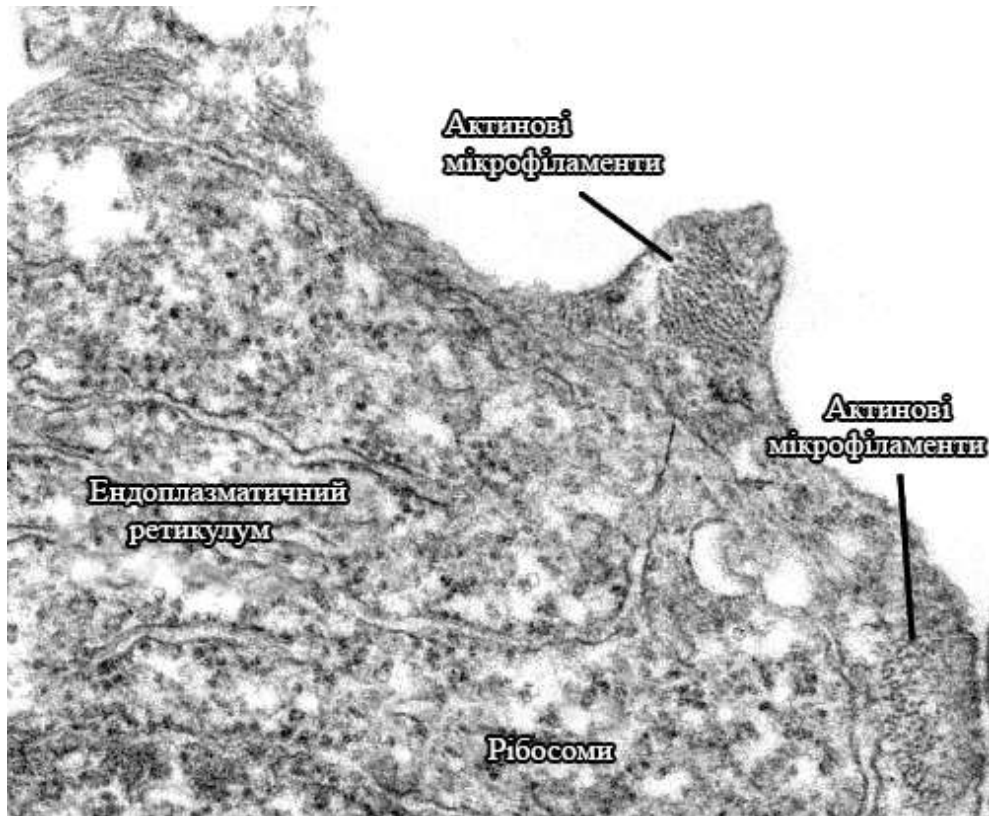
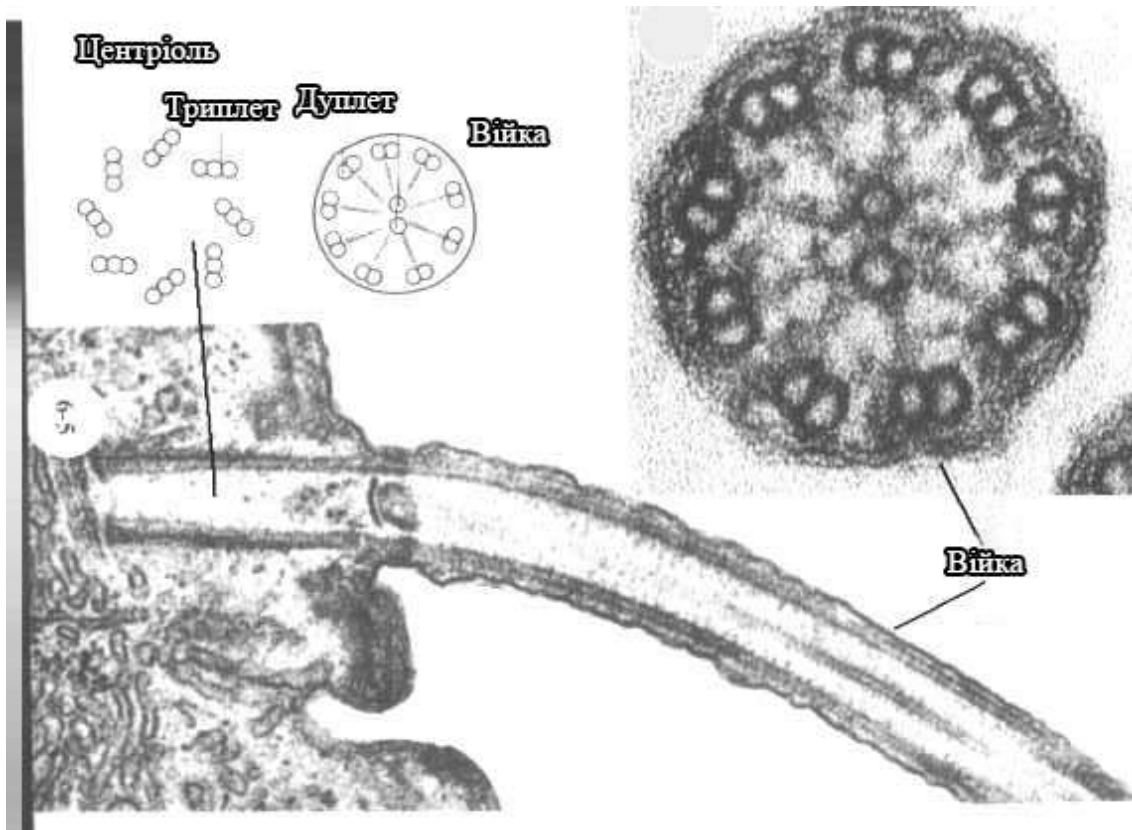


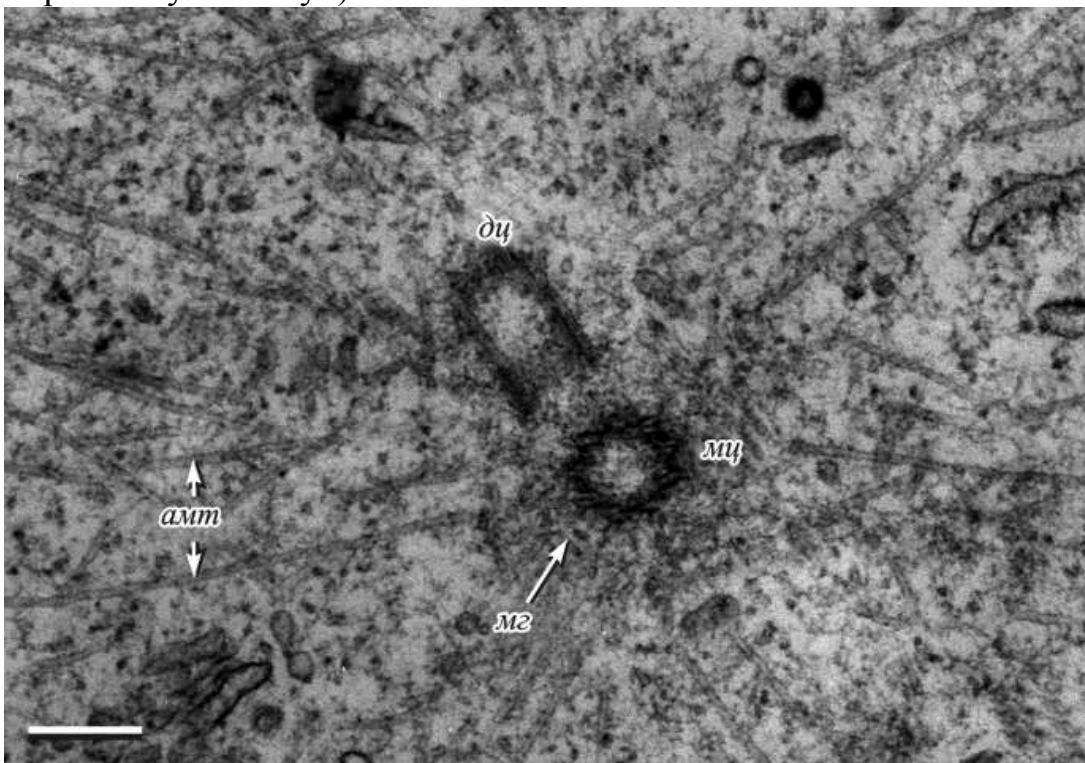
Рис. 22. Мікрофіламенти (актинові філаменти, actin filaments) (Джерело - <https://bit.ly/3cTgoQ8>, з модифікаціями)



Рис. 23. Електронна мікрофотографія целюлозних волокон клітинної стінки зеленої морської водорості *Chaetomorpha melagonium* (цит. за: Taylor D., Green N., Stout W., Biological Science, 1997).



**Рис. 24.** Ультраструктура війки еукаріотичної клітини (Джерело - <https://bit.ly/36SbGy2>)



**Рис. 25.** Дуплікована пара центросом (**centrosome**) у S-періоді клітини ссавця. Кожна центросома складається з пари центріолей під прямим кутом одна до одної.

## Рекомендована література

1. Molecular biology of the cell / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, P. Walter; J. Wilson, T. Hunt. – Sixth edition. – New York : Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2014. – 1464 p.
2. Taylor D., Green N., Stout W. Biological Science 1 & 2. - 3<sup>ed</sup> edition. - Cambridge: Cambridge University Press, 1997. - 984 p.
3. Dashek W. V., Miglani G. S. Plant cells and their organelles. – Hoboken, N.J. : Wiley, 2017. – 413 p.
4. Wong E. V. Cells: Molecules and Mechanisms. Axolotl Academic Publishing Company, Louisville, KY, 2009. – 283 p.
- 5.

## Ресурси

6. Atlas of plant and animal histology. – Електр. дан. – Режим доступу: <https://bit.ly/2MDFp7e> (дата звернення 01.02.2022). – Загол. з екрана.
7. Cell Biology and Cytochemistry : Cell Biology. – Електр. дан. – Режим доступу: <https://bit.ly/3aR5Yhk> (дата звернення 01.02.2022). – Загол. з екрана.
8. Навчальний канал HarvardX : Cell Biology. – Електр. дан. – Режим доступу: <https://bit.ly/3p2d5bu> (дата звернення 01.02.2022). – Загол. з екрана.
9. Навчальний канал WENImovies. – Електр. дан. – Режим доступу: <https://bit.ly/3aJMbQF> (дата звернення 01.02.2022). – Загол. з екрана.
10. Astonishing molecular machines: Drew Berry at TEDxSydney. – Електр. дан. – Режим доступу <https://bit.ly/36Tuvkl> : (дата звернення 01.02.2022). – Загол. з екрана.
11. Digizyme : Cell Signaling Technologies : Molecular Landscapes. . – Електр. дан. – Режим доступу: <https://bit.ly/3rwpA0K> (дата звернення 01.02.2022). – Загол. з екрана.

## Додаток 3

## Морфологія клітини, відозміни і патології клітинних органел

Таблиця 3.1

## Морфологія клітини

| Органела або структура                  |                | Еукаріотична клітина                        |                                               |                                             | Прокаріотична клітина                                                                    |
|-----------------------------------------|----------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                         |                | Рослини                                     | Тварини                                       | Гриби                                       |                                                                                          |
| Клітинна стінка (основний полімер)      |                | +                                           | Немає                                         | +                                           | +                                                                                        |
|                                         |                | (целюлоза)                                  |                                               | (хітин)                                     | (муреїн)                                                                                 |
| Ядро                                    |                | +                                           | +                                             | +                                           | Немає (нуклеоїд)                                                                         |
| Рибосоми                                |                | 80S                                         | 80S                                           | 80S                                         | 70S                                                                                      |
| Центріолі (клітинний центр, центросома) |                | Немає (зустрічається у деяких нижчих)       | +                                             | +                                           | Окремі ферментні комплекси, іноді можуть бути вбудовані у незамкнені мембранні структури |
| Вакуолі                                 |                | Є, у зрілих клітинах зазвичай досить великі | Іноді невеликі (скоротливі, видільні, травні) | Можуть зустрітися у старих частинах міцелію |                                                                                          |
| Апарат Гольжі                           |                | +                                           | +                                             | +                                           |                                                                                          |
| Ендоплазматичний ретикулум              |                | +                                           | +                                             | +                                           |                                                                                          |
| Мітохондрії                             |                | +                                           | +                                             | +                                           |                                                                                          |
| Пластиди                                |                | Немає                                       | +                                             | Немає                                       |                                                                                          |
| Мікрофіламенти                          |                | +                                           | +                                             | +                                           |                                                                                          |
| Мікротрубочки                           |                | +                                           | +                                             | +                                           |                                                                                          |
| Лізосоми                                |                | +                                           | +                                             | +                                           |                                                                                          |
| Мікротільця                             | Пероксисоми    | +                                           | +                                             | +                                           |                                                                                          |
|                                         | Гліоксісоми    | +                                           | +                                             | +                                           |                                                                                          |
|                                         | Білкові тільця | Запасаюча функція                           | Переважаю як тільця включення                 | Переважаю як тільця включення               |                                                                                          |

## **Деякі специфічні патології тваринних клітин**

### **Інформаційна система клітини**

Порушення у ядрі клітини призводять до патології зберігання генетичної інформації ДНК та передачі її під час поділу клітин, а також до порушення генетичного контролю клітинних процесів. Зміни геному чи механізмів його реалізації супроводжуються патологією будови ядер (поліморфізм, деформація, формування інвагінацій цитоплазми навіть до включень цитоплазми у ядро чи вип'ячування каріоплазми до цитоплазми).

При порушеннях ядро набрякає або зморщується. Набряклі ядра стають більш світлими, змінюється ядерно-цитоплазматичне відношення. Це часто передуює ушкодженню ядерної оболонки та злиттю каріоплазми та цитоплазми (каріолізис). Каріолізис є попередником паранекрозу або некрозу, з наступним само перетравленням клітини (автолізом).

При зморщуванні (каріопікнозі) ядро зменшується в розмірах, у ньому накопичується гетерохроматин, що призводить до посилення забарвлення каріоплазми (гіперхроматоз). Ядерця ущільнюються, зменшуються в розмірах та розпадаються. Синтез РНК та субодиниць рибосом у такому ядрі значно знижується. Прогресуючи, ці зміни призводять до сегментації ядра з наступним його розпадом на глибки (каріорексис), які потім розпадаються. Такі зміни є летальними для клітини.

Патологія синтезу субодиниць рибосом в ядерці та тРНК супроводжується порушенням синтетичних процесів у клітині.

Зменшення кількості генетичного матеріалу спостерігають у злоякісних пухлинних клітинах.

### **Патології вакуолярної системи**

**Хвороби, пов'язані з патологіями ендоплазматичного ретикулуму.**

Адрено-генітальний синдром (дефіцит синтезу стероїдних гормонів у наднирниках)

Уроджені міопатії – структурні аномалії ендоплазматичного ретикулуму у клітинах поперечно-смугастих м'язів і м'язах серця.

Хвороба накопичення глікогену I типу (GSD I, хвороба фон Гірке) – генетичний дефект ферменту глюкоза-6-фосфатази, локалізованої у мембранах ендоплазматичного ретикулуму. Цей дефект призводить до надлишкового накопичення глікогену у клітинах печінки та нирок та виникненню гіпоглікемії.

**Хвороби, пов'язані з патологією апарата Гольджі та його похідних (хвороби накопичення)** – рідкісні орфанні захворювання, що зумовлені генетичними порушеннями, внаслідок яких певні лізосомні гідролази стають дефектними. Субстрат таких гідролаз залишається нерозщепленим і накопичується у лізосомах, що і спричиняє відповідну патологію. На теперішній час відомо більш ніж 50 лізосомних хвороб накопичення. Переважна більшість таких хвороб успадковуються аутосомно рецесивно (окрім трьох, що зчеплені зі статтю). За типом субстрату розрізняють мукополісахаридози, муколіпідози, глікогенози, хвороби накопичення глікопротеїнів, ліпідів та інших молекул.

Найбільш відомі хвороби накопичення:

**Хвороба Помпе** (генералізований глікогеноз, глікогеноз II типу) – зумовлена накопиченням глікогену в лізосомах, причиною якого є недостатність лізосомного фермента – кислої  $\alpha$ -1,4-глюкозидази. Хвороба Помпе пов'язана з ушкодженням м'язових і нервових клітин у всьому організмі.

**Хвороба Тея-Сакса**, викликана мутацією в гені фермента гексозамінідази А – хімічного каталізатора-посередника, що знаходиться в лізосомах і приймає участь в утилізації гангліозидів у клітинах ЦНС. При відсутності цього ферменту гангліозиди накопичуються в нейронах мозку, порушують їх роботу і врешті-решт знищують їх.

**Хвороба Гоше** (сфінголіпідоз) – розвивається внаслідок недостатності фермента глюкоцереброзидази, яка призводить до

накопичення глюкоцерброзида у багатьох тканинах (мозку, кістковому мозку, печінці, нирках, легенях, селезінці тощо)

**I-клітинна хвороба** (муколіпідоз II) – рецесивне спадкове захворювання, яке відноситься до хвороб накопичення, проте викликано порушеннями процесу сортування молекул в апараті Гольджі (дефект фосфотрансферази, яка неспроможна додати специфічну мітку до катоболічних ферментів). Внаслідок цього порушення гідролази, замість того, щоб надійти до лізосом, секретуються у міжклітинний простір. У таких хворих у лізосомах фіброblastів відсутні майже усі гідролітичні ферменти, а відповідні нерозщеплені субстрати накопичуються у клітинах у вигляді великих включень.

### **Патології пероксисом**

Синдром Цельвегера – відсутність пероксисом у клітинах. Для цього синдрому властиві важкі церебральні та гепато-ренальні порушення, що спричиняють загибель дитини у віці до 1 року.

Акаталеземія – аутосомно-рецесивна спадкова хвороба, що спричинена відсутністю каталази у тканинах і крові, проявом її є атрофія альвеолярних перегородок, випадіння зубів, тонзиліти та ін.

Адренолейкодистрофії – викликані зниженням функцій пероксисом у процесах окислення жирних кислот, що призводить до ушкодження білої речовини мозку і коркового шару наднирників.

### **Енергетична система (патології мітохондрій)**

Мітохондрії мають власну ДНК та білок-синтезуючий апарат. Геном мітохондрій людини містить 16569 пар азотистих основ, що складають 37 генів; успадковування мітохондріального геному відбувається завдяки наявності мітохондрій у цитоплазмі яйцеклітини і тому може здійснюватися лише за материнським типом. До дефектів мітохондріального геному належать нейропатії та міопатії. На теперішній час відомо більше 50 синдромів, пов'язаних з мітохондріальним геномом.

Синдром Лея – підгостра некротизуюча енцефаломіопатія – спадковий нейрометаболічний синдром, виражений у незапальному ушкодженні центральної нервової системи та м'язів.

Мітохондріальні міопатії – група захворювань, що зумовлені генетичними дефектами мітохондрій, що супроводжуються порушенням тканинного дихання.

Атрофія зорового нерву Лебера (спадкова оптична нейропатія LHON Лебера) – мітохондріальна дегенерація гангліонарних клітин сітківки та їх аксонів, що призводить до втрати центрального зору.

Для синдрому MERRF властиве поєднання міопатії, міоклонії, епілептичних нападів, атаксії, деменції та атрофії зорових нервів й туговухості.

Синдром Кірнса-Сейра – нервово-м'язова патологія, що викликана дефектом ферментів дихального ланцюгу мітохондрій.

### **Хвороби, пов'язані з патологіями цитоскелету**

Родинна кардіопатія як наслідок аномалії міжклітинних дисків міокарду

Мегалобластична анемія – зміна конформації спектрина (білка цитоскелету, що вистилає внутрішній бік мембрани) у еритроцитах.

Серед патологій клітинного руху відомі такі:

- синдром «лінивих лейкоцитів» Міллера – сукупність спадкових дефектів, для якої властиве знижений хемотаксис та зниження інтенсивності фагоцитозу завдяки первинному дефекту полімеризації актину.

- дефект збірки тубуліна у мікротрубочки, завдяки чому порушується рух нейтрофілів.

- синдром Картагенера (первинна війкова дискінезія) – молекулярний і функціональний дефект руху війок, аутосомно-рецесивне генетичне захворювання, що викликає порушення функціонування війкового апарату дихальних шляхів, фаллопієвих труб та джгутиків сперматозоїдів

- синдром Чедіака-Хігаші, для якого характерні частковий альбінізм, важкі гнійні інфекції та зниження кількості червоних і білих кров'яних тілець, а також тромбоцитів.

Синдром Альтстрома (дефект білка ALMS1, який входить до складу центросоми) – призводить до дитячого ожиріння, діабету II типу, нейросенсорних дефектів, кардіоміопатії, дисфункції печінки гіпотирозидизму та ін.)

Oral-Facial-Digital синдром I типу, викликаний дефектом центросомального білка OFD1, призводить до вроджених пороків розвитку пальців та лиця, а також ротової порожнини «вовча паща» та нервової системи внаслідок порушення функції центросоми під час ембріонального розвитку.

### **Видозміни та особливі форми клітинних органел**

**Саркоплазматичний ретикулум** є мембранною органелою м'язових клітин, яка подібна до ендоплазматичного ретикулуму інших клітин і яка, скоріше за все, є похідною ендоплазматичного ретикулуму. Базовою функцією саркоплазматичного ретикулуму є накопичення і запасання іонів кальцію ( $\text{Ca}^{2+}$ ). СР має вигляд мережі трубочок, яка тягнеться по усім м'язовим клітинам, що звиваються навколо міофібрил, проте безпосередньо з ними не контактують. З допомогою особливих трубочок, що мають назву Т-система, СР зв'язаний з оболонкою м'язової клітини – сарколемою. В особливих елементах СР – цистернах – накопичуються іони  $\text{Ca}^{2+}$  у концентрації, яка приблизно в тисячу разів більша, ніж їх концентрація в цитозолі. Мембрана саркоплазматичного ретикулуму (СР) містить іонні канали (помпи), які закачують всередину кальцій за рахунок витрати АТФ.

Іони кальцію відіграють важливу роль у регуляції м'язового скорочення. Проте, надвисокий рівень кальцію може призвести до кальцифікації деяких внутріклітинних елементів, наприклад, мітохондрій і викликати загибель клітини. Саме тому рівень кальцію у живій клітині підлягає суворому контролю.

**Гідрогеносоми** – двомембранна органела деяких одноклітинних анаеробних організмів, таких як гриби, трихомонади та деякі інфузорії. Функцією гідрогеносом, як і мітохондрій, є забезпечення клітин енергією, проте гідрогеносоми функціонують у анаеробних умовах, тобто за відсутності кисню, який здатен викликати загибель гідрогеносом. Висунуто припущення про походження деяких гідрогеносом від мітохондрій шляхом втрати більшої частини геному та ще деяких властивостей. З іншого боку, є свідчення про наявність геному у цих органелах; таким чином, питання залишається відкритим.

**Мітосоми** – двомембранні органели, які були знайдені лише у анаеробних чи мікроаерофільних організмів, які не мають власне мітохондрій і нездатні отримувати енергію шляхом окиснювального фосфорилування. Більшість дослідників сходяться на тому, що мітосоми походять від мітохондрій: вони мають подвійну мембрану і той же шлях доставки білків з цитоплазми, як і мітохондрії. Функцією мітосом може бути створення зв'язків між залізо-сірними кластерами Fe-S, оскільки в них були знайдені відповідні ферменти (а ферментів, відповідальних за аеробне дихання, як у мітохондріях, знайдено не було). На відміну від мітохондрій та гідрогеносом, мітосоми не мають власного геному.

### **Рекомендована література та корисні ресурси**

1. Taylor D., Green N., Stout W. Biological Science 1 & 2. - 3<sup>ed</sup> edition. - Cambridge: Cambridge University Press, 1997. - 984 p.
2. Wong E. V. Cells: Molecules and Mechanisms. Axolotl Academic Publishing Company, Louisville, KY, 2009. – 283 p.
3. Benchimol M. Hydrogenosomes under microscopy // Tissue & cell. — 2009. — Vol. 41, № 3. – С. 151-168.
4. Beard N. A., Laver D. R., Dulhunty A. F. Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle // Progress in Biophysics and Molecular Biology. – 2004. – Vol. 85(1). – P. 33–69.
5. León-Avila G., Tovar J. Mitosomes of *Entamoeba histolytica* are abundant mitochondrion-related remnant organelles that lack a

- detectable organellar genome // Microbiology. – 2004. – Vol. 150, Pt 5. – P. 1245–1250.
6. Tovar J., Fischer A., Clark C.G. The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica* // Molecular Microbiology. – 1999. Vol. 32(5). – P. 1013–1021.
  7. HarvardX : Cell Biology : How mitochondrial diseases are inherited. – Електр. дан. – Режим доступу: <https://bit.ly/3a08l23> (дата звернення 01.02.2022). – Загол. з екрана.

## Прописи найуживаніших реактивів

### Фіксатори

#### **Фіксатор Кларка**

3 частини етилового спирту  
1 частина крижаної  
оцтової кислоти

#### **Фіксатор Карнуа**

6 частин етилового спирту  
3 частини хлороформу  
1 частина крижаної оцтової  
кислоти

Фіксатори готують безпосередньо перед використанням у потрібному об'ємі.

### Барвники

#### **Розчин метиленового синього**

Аптечний препарат 3 % метиленового синього у водному розчині

#### **Розчин йоду спиртовий**

Аптечний препарат 5 % у спиртовому розчині

#### **Приготування розчину ацетокарміну**

1 грам карміну розчиняють у 55 мл дистильованої води з додаванням 45 мл крижаної оцтової кислоти, приготування проводять у колбі на водяній бані зі зворотним холодильником протягом 60 хвилин (при відсутності зворотнього холодильника у колбу ставлять лійку, процедуру проводять у добре провітрюваному приміщенні. Після охолодження отриманий розчин фільтрують і зберігають у посуді темного скла.

#### **Приготування розчину оцтової кислоти (просвітлювач для ацетокармінових мікропрепаратів)**

Для приготування 100 мл 45 % оцтової кислоти змішують 45 мл крижаної оцтової кислоти та 65 мл дистильованої води

#### **Література:**

Сатарова Т.М. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни „Генетика”. – Кам'янське, ДДТУ, 2020. – 53 с.

### Орієнтовні теми для доповідей студентів

Підготовка доповіді студентами є надзвичайно важливою формою самостійної роботи. У рамках курсу загальної цитології студентам пропонують обрати одну з запропонованих тем для підготовки п'ятихвилинної доповіді, у рамках якої необхідно ознайомити аудиторію з основними важливими моментами обраної теми. Увазі студентів пропонуються теми, які не висвітлюються безпосередньо у курсі загальної цитології, проте мають до неї відношення і сприяють розширенню кругозору, дозволяють подивитися на навчальний матеріал курсу з іншої точки зору та допомагають встановленню і розумінню студентами міжпредметних зв'язків між різними галузями біологічних наук.

1. Нобелівські премії, пов'язані з удосконаленням мікроскопічних технологій
2. Нобелівські премії, пов'язані з функціонуванням вакуолярної системи клітини
3. Українські вчені – цитологи
4. Еволюція мітотичного поділу
5. Еволюція мейотичного поділу
6. Глікокалікс клітини та його комунікативні функції
7. Центромера – сірий кардинал клітини
8. Теломери і теломерази
9. «Клітинний годинник»
10. Клонування організмів
11. Теорія симбіогенезу Лінн Маргуліс
12. LUCA – Last universal common ancestor
13. Дерево життя: археї, бактерії та еукаріоти
14. Старіння клітини
15. «Безсмертя» одноклітинних організмів: так чи ні?

Зазначений перелік не є вичерпним і студенти можуть пропонувати доповіді на теми, обрані самостійно, за умови належності предмету доповідей до наук, пов'язаних з клітинним рівнем організації живої матерії

### **Правила безпеки при проведенні практичних занять під час курсу «Загальна цитологія»**

Забезпечення безпечних і сприятливих умов під час навчання і праці людини є надзвичайно важливим моментом при плануванні і організації навчального процесу як у закладі вищої освіти, так і під час проведення шкільних занять. При виконанні практичних робіт з цитології необхідно суворо дотримуватись чинних санітарно-гігієнічних вимог та вимог з приводу пожежної безпеки. Під час виготовлення тимчасових мікропрепаратів потрібно працювати з реактивами обережно, з обов'язковим виконанням застережливих заходів. При використанні електроприладів важливо дотримуватись усіх інструкцій по їх використанню.

Під час проведення практичних занять студенти повинні знаходитися в аудиторії у спеціальному лабораторному одязі (бавовняних халатах бажано білого кольору). Заборонено захащувати робочі місця сторонніми предметами, що не мають відношення до практичної роботи, а проходи – особистими речами – сумками, одягом тощо.

До проведення практичних робіт курсу студенти приступають після проведення на першому занятті інструктажу з техніки безпеки та правил поведінки у біологічній лабораторії. Протягом заняття студенти зобов'язані беззаперечно виконувати вимоги викладача стосовно безпечного поводження з лабораторним обладнанням, мікроскопами, реактивами тощо. При будь-яких відхиленнях від нормального процесу (розлив реактиву, поріз склом та тому подібне) студенти зобов'язані відразу ж повідомити викладача та виконувати його розпорядження.

Детальні інструкції з охорони праці та техніки безпеки у кабінетах біології загальноосвітніх шкіл України можна знайти на сайті «Інструкції для навчальних закладів України» за посиланням: <https://bit.ly/3pehvfR>

*Навчальне видання*

**Алексєєва Тетяна Григорівна**

# **ЗАГАЛЬНА ЦИТОЛОГІЯ**

***НАВЧАЛЬНО-МЕТОДИЧНИЙ ПОСІБНИК***

В авторській редакції

Підп. до друку 09.03.2022. Формат 60х84/16.  
Ум.-друк. арк. 6,83. Тираж 20 пр.  
Зам. № 2456.

**Видавець і виготовлювач**  
**Одеський національний університет**  
**імені І. І. Мечникова**

Україна, 65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12  
Тел.: (048) 723 28 39. E-mail: [druk@onu.edu.ua](mailto:druk@onu.edu.ua)  
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4215 від 22.11.2011 р.