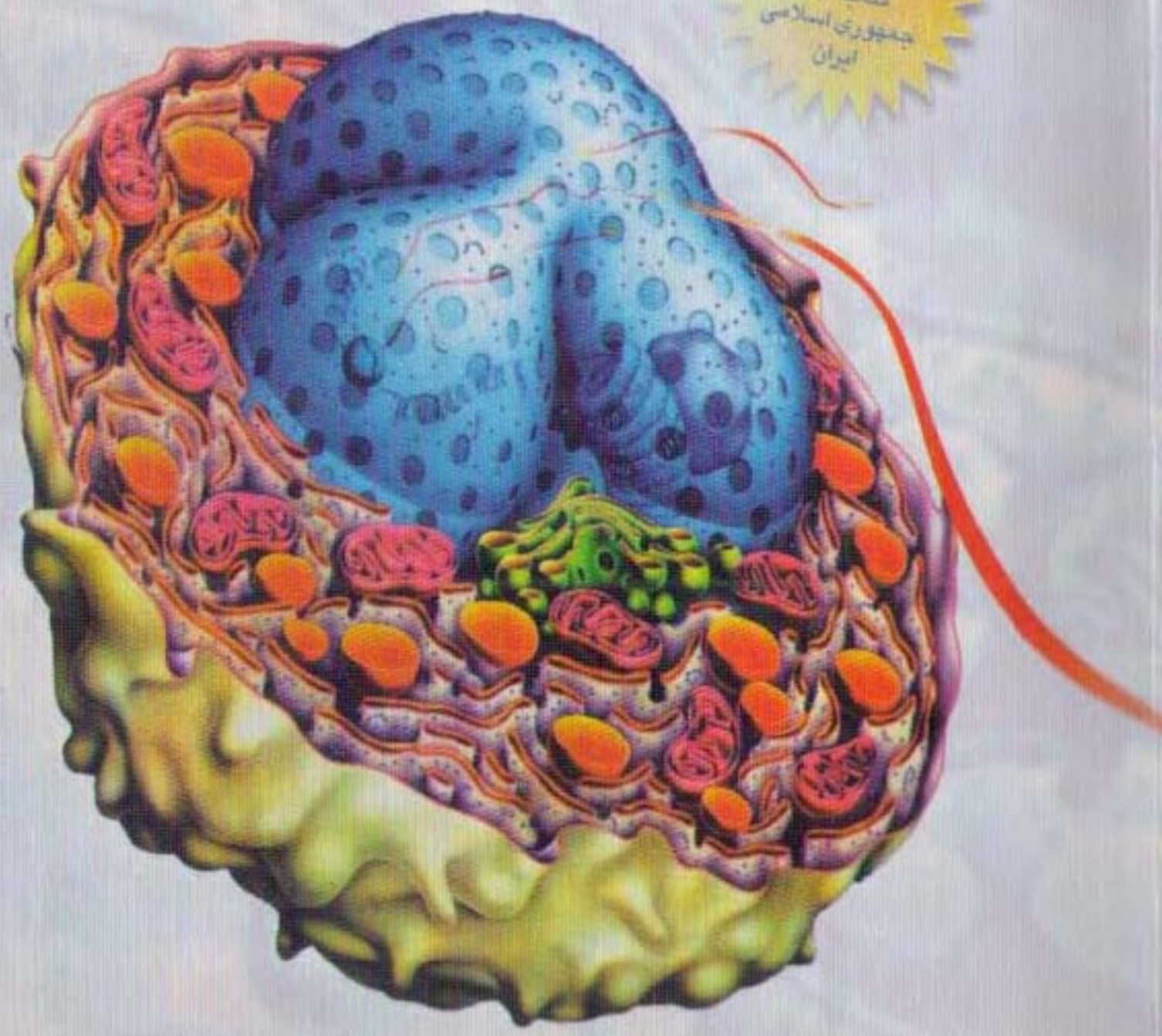
زیست شناسی سلولی و مولکولی

دکتر احمد مجد دکتر سید محمد علی شریعت زاده

چاپ سیزدهم

کتاب برگزیده زیست شناسی هفدهمین دوره کتاب سال جمهوری اسلامی ایران



مجد، احمد، ۱۳۲۲ -
زیست‌شناسی سلولی و مولکولی / تالیف احمد مجد، محمدعلی شریعت‌زاده.- تهران: آییژ، ۱۳۸۱ .
۷۳۲ ص.: مصور، جدول.
ISBN 964-7006-35-7
فهرستنویسی بر اساس اطلاعات فیپا.
این کتاب قبلاً توسط دانشگاه اراک در ۲ جلد در سالهای مختلف چاپ شده است.
واژه‌نامه.
کتابنامه : ص ۷۲۹ - ۷۳۱.
۱. یاخته‌شناسی. ۲. مولکولها -- زیست‌شناسی. الف. شریعت‌زاده، محمدعلی، ۱۳۳۲ - ، ب. عنوان.

QH ۵۸/۲/م۳ز۹ ۵۷۴/۸۷
۱۳۸۱
کتابخانه ملی ایران ۶۷۴۶۵-م۸۰
محل نگهداری:

آییژ

- کتاب: زیست‌شناسی سلولی و مولکولی
- تالیف: دکتر احمد مجد، دکتر سید محمدعلی شریعت‌زاده
- ناشر: آییژ
- قطع: وزیری
- نوبت: سیزدهم
- تاریخ: بهار ۱۳۸۹
- تیراژ: ۳۵۰۰
- صفحات: ۷۴۴
- شابک: ۹۶۴-۷۰۰۶-۳۵-۷
- قیمت: ۱۸۰۰۰ تومان

مراکز پخش

کتابیران: تهران، میدان انقلاب، ابتدای خیابان آزادی، خیابان دکتر قریب، بعد از فرصت شیرازی، پلاک ۷ ، تلفن: ۱۸ - ۶۶۵۶۶۵۰۹

نوپردازان: تهران، خیابان لبافی‌نژاد، بین اردیبهشت و فروردین ، پلاک ۲۳۸، تلفن: ۶۶۴۱۴۴۷۴ - ۶۶۴۱۴۵۱۵ - ۶۶۴۱۱۱۷۳ - ۶۶۴۹۴۴۰۹

پیشگفتار

کاشکی هستی زبانی داشتی — تا زهستان پرده‌ها برداشتی
هرچه گویی ای دم هستی از آن — پرده‌ای دیگر بر او بستی بدان
مولانا

سپاس خداوند یکتا و آفریدگار توانا را که همهٔ خوبی‌ها از اوست و بزرگی سزاوار او. پس از انتشار چاپهای اول تا چهارم کتاب زیست‌شناسی سلولی و مولکولی و استقبالی که از آن به عمل آمد و به دنبال اعلام نظرهایِ شایستهٔ تشکر جمعی از همکاران ارجمند، دبیران محترم زیست‌شناسی و دانشجویان گرامی، تصمیم گرفتیم که به منظور پاسخگویی به محبت‌های خوانندگان گرامی، کتاب را تا حدی گسترده‌تر و با تکیه بیشتری بر پایه‌های مولکولی پدیده‌های زیستی یاخته‌ها تألیف و تنظیم نماییم که بحمدالله هم‌اکنون با امید مفید و قابل قبول‌بودن تقدیم علاقه‌مندان دانش زیست‌شناسی سلولی و مولکولی می‌گردد.

دانش زیست‌شناسی سلولی و مولکولی از بنیادی‌ترین شاخه‌های علوم زیستی است. هم‌اکنون برای هرگونه آشنایی و آگاهی علمی و منطقی از «حیات» به این دانش نیاز می‌باشد. این امر به این علت است که یاخته به‌عنوان واحد ساخت و کار موجودات زندهٔ دارای ساختار سلولی، مجموعهٔ سازمان‌یافته و منظمی است. که هم به حالت منفرد، یعنی جانداران تک‌یاخته‌ای، و هم به صورت مجموعه‌های تشکل‌یافته و وابسته، یعنی جانداران پریاخته‌ای، جایگاه تجلّی همه نوع فعالیت‌های زیستی است. درک صحیح پدیده‌های زیستی در بنیادی‌ترین و اصلی‌ترین شکل آن، یعنی در حدّ یاخته‌ها و مولکول‌های سازندهٔ آن، مفهوم واقعی می‌یابد و جلوهٔ زیبای وحدت در «زیستن» را به نمایش می‌گذارد. به دلیل نقش زیربنایی زیست‌شناسی سلولی و مولکولی در علوم زیستی، بخش قابل توجهی از برنامه‌های آموزشی در دوره‌های پیش دانشگاهی و دانشگاهی در همهٔ کشورها و نظام‌های آموزشیِ پویای کنونی به آن اختصاص یافته است. تلاش می‌شود تا دانشجویان در مجموعهٔ دروس زیست‌شناسی سلولی و مولکولی آگاهی‌های جامعی از سازمان یافتگی یاخته و چگونگی اعمال آن به عنوان «واحد جانداران» را کسب نمایند و بتوانند به هدف‌های زیر دست یابند:

- وابستگی ساختارها و اعمال یاخته‌ای را بشناسند،
- به پیدایش یاخته‌ها، تغییرات، تحولات و تنوع آنها پی ببرند،
- با قوانین و نظام‌های حاکم بر جاندران آشنا شوند،
- و در پرتو این آگاهی‌ها، آمادگی‌های لازم برای توجیه و تفسیر پدیده‌های زیستی را با توجه به چگونگی انجام آنها در حد سلول‌ها و مولکول‌ها، کسب نمایند.

پیشرفت‌های شگرف زیست‌شناسی سلولی و مولکولی در پنجاه سال اخیر که بیشتر با بهره‌گیری از فنون و روش‌های تجزیهٔ دقیق ساختارهای یاخته‌ای حاصل شده است امکان بررسی و شناخت ساختار و رفتار ماکرومولکول‌های زیستی را به دست داده است. این ماکرومولکول‌ها زیربنای ساختارهای یاخته‌ای هستند و سازمان یافتگی سه‌بُعدی و تشکل آنها شرطی لازم برای امکان بروز پدیده‌های زیستی است. انسان هم‌اکنون چگونگی انجام پدیده‌های زیستی را در حد برهم‌کنش‌های مولکولی و ماکرو مولکولی جستجو می‌کند. آگاهی‌های جدید از زیست‌شناسی سلولی - مولکولی و ژنتیک مولکولی از عمده‌ترین پیشرفت‌های زیست‌شناسی در سی سال اخیر هستند که بینش انسان را در مورد ساخت و کار یاخته و به طور کلی «جهان جانداران» دگرگون ساخته‌اند.

تجربهٔ سالها تدریس و پژوهش در مسائل زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، پویایی، پیشرفت و گسترش روزافزون زیست‌شناسی سلولی و مولکولی و نیاز مبرم دانشجویان به منابعی متنوع و جدید در این زمینه، توجه به سرفصل‌های مصوّب درس زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، عوامل و انگیزه‌هایی بودند که کاری را که از چند سال قبل برای تألیف کتاب زیست‌شناسی سلولی و مولکولی آغاز کرده بودیم و به دلیل مشکلاتِ فراوان چاپ و انتشار رها شده بود، از سر بگیریم و با ارائه کتابی متناسب با سرفصل دروس زیست‌شناسی سلولی و مولکولی که آگاهی‌های جدیدی را همراه با اطلاعات پایه‌ای زیست‌شناسی سلولی و مولکولی داشته باشد به رفع نیاز دانشجویان عزیز، دبیران محترم

زیست‌شناسی کشور و دیگر علاقه‌مندان مطالب سلولی و مولکولی انشاءالله کمکی کرده باشیم. پیشرفت‌های سریع دانش زیست‌شناسی به ویژه در حد سلولی و مولکولی، کمبود و گاهی نبود امکانات برای دستیابی سریع و آسان به منابع علمی موردنیاز، مشکلات فراوان چاپ و انتشار کتاب و مراحل طولانی آن، متناسب ساختن محتوا و حجم مطالب کتاب با برنامه‌های درسی دوره‌های تحصیلی خاص، همه از عواملی هستند که محدودیت‌هایی را برای ارائه مطالب موردنظر ایجاد می‌کنند وگرنه دانش زیست‌شناسی سلولی و مولکولی هم‌اکنون در حدّی است که هر بخش از ساختار و عمل یاخته نیاز به کتاب‌هایی تخصصی دارد. در کتاب حاضر با توجه به همهٔ موارد و ضرورت‌هایی که به آنها اشاره شد، سعی شده است مطالب به صورتی منسجم، فراگیر، در حدّ مطالب روز و با استفاده از شکل‌ها و طرح‌های متنوع ارائه شود تا هم به عنوان منبعی برای مراجعهٔ علاقه‌مندان به زیست‌شناسی سلولی و مولکولی باشد و هم به صورت یکی از کتب درسی موجود بتواند برای درس‌های زیست‌شناسی سلولی و مولکولی مفید و مورد استفاده قرار گیرد.

در این کتاب پس از ارائه تاریخچه‌ای مختصر و اشاره به پیشرفت مفاهیم زیست‌شناسی سلولی و مولکولی به ویژگی‌های عمومی یاخته‌ها، ساختمان و ترکیب شیمیایی آنها، یاخته به عنوان اقتصادی‌ترین، پایگاه تولید و مصرف مواد و انرژی توجه شده و روش‌ها و ابزارهای متداول در زیست‌شناسی سلولی و مولکولی معرفی شده است. فصول دیگری از کتاب به بررسی ساخت و کار غشاء، اسکلت یاخته‌ای، تاژک‌ها، مژک‌ها و سانتریول‌ها که زیربنای ساختار ریزلوله‌ای دارند پرداخته است. این کتاب همچنین به بررسی ساختار، فراساختار، نقش زیستی و خاستگاه اندامک‌های تک غشایی یاخته‌ها شامل شبکه آندوپلاسمی، دستگاه گلژی، لیزوزوم‌ها، پراکسیزوم‌ها، ریزجسمک‌ها (میکروبادی‌ها)، واکوئل‌ها، و اندامک‌هایی در غشایی مثل میتوکندری‌ها و پلاست‌ها و نیز بررسی اجزای یاخته‌ای فاقد غشاء مثل ریبوزوم‌ها اختصاص بخش‌های دیگری از مطالب مورد بحث می‌پردازد. ساختار و فراساختار اجزای سازمان‌دهندهٔ هسته یاخته‌ها به ویژه ساختار و نقش زیستی کروماتین به عنوان «مرکز اصلی اطلاعات سلول» و وسیلهٔ انتقال اطلاعات سلولی از نسلی به نسل دیگر»، چگونگی پیام رسانی و بروز اثر ژن‌ها در هدایت و کنترل ساخت و کار یاخته‌ها یعنی «بروز ژن‌ها» و پدیده‌های لازم برای آن مثل رونویسی، پردازش، پیرایش، ترجمه و نیز چگونگی انتقال آگاهی‌های یاخته ضمن همانندسازی و تقسیم یاخته‌ای، از نسلی به نسل دیگر نیز مورد توجه بوده است. تمایز یاخته‌ای و علل آن و مثال‌هایی از یاخته‌های تمایزیافته از مباحث فصول پایانی کتاب است.

با توجه به محدودیت‌هایی که برای ارائه مطالب کتاب در حجم و کیفیت قابل قبول دوره‌های کارشناسی و تا حدّی کارشناسی ارشد وجود داشته است، تنوع مطالب و نیز مشکلات چاپ و نشر، کتاب حاضر بی‌تردید خالی از نقص و اشکال نیست. نظریات اصلاحی و پیشنهادهای همکاران ارجمند، دانشجویان گرامی، دبیران محترم زیست‌شناسی و دیگر خوانندگان ارجمند کتاب، منّتی بر مؤلفان و موجب نهایت خرسندی، سپاسگزاری و تشکّر است. آرزو داریم پروردگار توفیق رفع کاستی‌ها و اشکالات در چاپ‌های بعدی را به ما عنایت فرماید. در نظر است چاپ بعدی کتاب با تجدیدنظر کامل منتشر شود و بنابراین اعلام نظر خوانندگان گرامی برایمان راهنما و ارزشمند خواهد بود.

از تمامی افرادی که با کلام و نوشتار خود و یا به هر نحو و امکان دیگری ما را در تألیف، تدوین، چاپ و انتشار این کتاب یاری نموده‌اند، به ویژه همکار محترم سرکار خانم دکتر مه‌لقا قربانلی که ویراستاری ویرایش قبلی این اثر را عهده‌دار بودند و نیز سایر همکاران سرکار خانم دکتر صدیقه اربابیان، سرکار خانم سایه جعفری، سرکار خانم فرخنده رضانژاد و دانشجویان گرامی خانمها المیرا جعفریه یزدی، مریم میرزائیان، فاطمه هنروران که در بازخوانی و رفع اشکال بخش‌هایی از این کتاب ما را یاری نموده‌اند سپاسگزاریم.

از جناب آقای دکتر شاپور گهوارهٔ مدیریت محترم انتشارات آییژ که با تمام تلاش در بهینه‌سازی و آماده‌کردن کتاب زحمات فراوانی را تقبّل نموده‌اند و نیز از سرکار خانم لیلا خاکزادیان، آقایان عبدالله یوسفی، محمدباقر اکبری، مجید منصورخاکی و همایون مقدس در مؤسسه انتشاراتی آییژ که با تلاش شبانه‌روزی و جدّیت شایان سپاس در پردازش فنی کتاب زحمت کشیده‌اند صمیمانه سپاسگزاریم و از خداوند بزرگ و توانا، سلامتی، سعادت و توفیق روز افزون همهٔ این عزیزان را خواستاریم.

از خانواده‌های گرامی خود که در طول مدت تألیف این کتاب با صبر و شکیبایی فراوان و با فراهم آوردن محیطی آرام و مناسب، ادامه کار را برایمان امکان‌پذیر ساختند، صمیمانه سپاسگزاری و قدردانی می‌نماییم.

با امید آن که به خواست پروردگار توانا، این «برگ سبز» مقبول نظر افتد، آن را به همهٔ کسانی که مدیونشان هستیم، به همهٔ دانش‌پژوهان آگاه و متقّی، پویندگان راه حقیقت و تلاشگران برای سربلندی ایران اسلامی تقدیم می‌داریم.

دکتر احمد مجد - دکتر سیدمحمدعلی شریعت‌زاده

تهران - زمستان ۱۳۸۰

فهرست مطالب

فصل ۱ - تکامل سلولی و سطوح سازمان یافتگی از مولکول تا پروکاریوت و یوکاریوت ۱

برخی منابع مطالعه در زیست‌شناسی سلولی..... ۴

زیست‌شناسی سلولی و شاخه‌های آن..... ۴

پیشرفت‌های کنونی و چشم‌اندازهای آیندهٔ زیست‌شناسی سلولی..... ۵

سطوح تشکّل در زیست‌شناسی..... ۸

واحدهای اندازه‌گیری و اندازه‌ها در زیست‌شناسی سلولی ۹

نظریهٔ سلولی..... ۱۱

سلول‌های پروکاریوت و یوکاریوت ۱۲

پروکاریوت‌ها با خصوصیات زیر مشخص می‌شوند ۱۲

پیوستگی سلول‌ها ۱۹

ویژگی‌های عمومی سلول ۲۳

مقایسه کلی اندازه سلول گیاهی و جانوری..... ۲۵

ساختمان..... ۲۵

فصل ۲ - ترکیب شیمیایی سلول ۲۹

نمک‌های کانی ۳۲

اسیدهای امینه و پروتئین‌ها..... ۳۳

بار الکتریکی پروتئین‌ها..... ۴۲

گلوسیدها، قندها یا هیدرات‌های کربن ۴۳

چربی‌ها یا لیپیدها..... ۴۷

اعمال مهم لیپیدها از نظر کارهای زیستی..... ۴۷

تقسیم‌بندی لیپیدها..... ۴۸

سریدها یا موم‌ها ۴۹

گانگلیوزیدها..... ۵۰

اسیدهای نوکلئیک..... ۵۰

مواد سازنده اسیدهای نوکلئیک..... ۵۱

نوکلئوزیدها ۵۲

نوکلئوتیدها ۵۳

ساختمان *DNA*..... ۵۵

مدل‌های مختلف *B - DNA*، *Z - DNA* و *A - DNA*..... ۵۶

*DNA*ی تک رشته‌ای:..... ۵۸

ساختمان *RNA*ها:..... ۵۸

ساختمان اول تا چهارم در اسیدهای نوکلئیک..... ۵۹

تشخیص سیتوشیمیایی اسیدهای نوکلئیک..... ۶۰

پراکنش اسیدهای نوکلئیک در یاخته ۶۱

نقش اسیدهای نوکلئیک یاخته‌ای..... ۶۱

فصل ۳ - آنزیم‌ها، متابولیسم سلولی و بیوانرژتیک ۶۳

آنزیم‌ها ۶۳

پروآنزیم‌ها یا زیموژن‌ها ۶۴

ساختمان آنزیم‌ها ۶۴
کوآنزیم‌ها و گروه‌های پروستتیک ۶۵
جایگاه فعال آنزیم‌ها ۶۵
ایزوآنزیم‌ها ۶۶
عمل اختصاصی آنزیم‌ها ۶۷
مجاورت و تعیین جهت سوبسترا، چرخش اوربیتالی ۶۷
آنزیم‌های آلوستریک یا تنظیم‌کننده ۶۸
راه‌های سنجش فعالیت آنزیم‌ها ۷۰
طبقه‌بندی و نامگذاری آنزیم‌ها ۷۰
خواص عمومی آنزیم‌ها ۷۲
تأثیر غلظت آنزیم و سوبسترا در فعالیت آنزیمی ۷۳
سینتیک آنزیمی ۷۵
راه‌های جلوگیری از فعالیت آنزیم‌ها ۷۶
چرخه انرژی ۷۹
تغییر وتبدیل انرژی ۷۹
پیوندهای پرانرژی ۸۱
بیوانرژتیک ۸۲
نظر آنتروپی ۸۳
اکسایش و کاهش ۸۴
دئیدروژنازها ۸۴
سیتوکروم‌ها ۸۵
تنفس سلولی ۸۵
تنفس بی‌هوازی ۸۶
چرخه کربس و فسفوریلاسیون اکسیداتیو ۸۷
انواع تنفس سلولی ۸۹

فصل ۴ - ابزارها و روش‌های مطالعه سلول ۹۱
میکروسکوپ ۹۱
اساس ساختمانی میکروسکوپ ۹۱
دیافراگم ۹۵
جنس عدسی‌های ابژکتیف ۹۷
درشت‌نمایی ابژکتیف ۹۸
اکولر ۹۹
درشت‌نمایی میکروسکوپ ۹۹
تشکیل تصویر در میکروسکوپ ۱۰۰
توان تفکیک یا قدرت تمیز میکروسکوپ ۱۰۰
چگونه می‌توان توان تفکیک میکروسکوپ را افزایش داد ۱۰۱
شماره مدخل، زاویه گشودگی یا میزان کارآیی ابژکتیف ۱۰۱
روش‌های مشاهده همراه با افزایش تضاد ۱۰۲
میکروسکوپ تداخلی ۱۰۴
میکروسکوپ زمینه تاریک ۱۰۵
میکروسکوپ پلاریزان ۱۰۶
میکروسکوپ با پرتوهای فرابنفش ۱۰۷
میکروسکوپ الکترونی ۱۰۸

تهیه نمونه برای مطالعه و بررسی با میکروسکوپ الکترونی گذاره (T.E.M.) ۱۱۲
کاربردهای ویژهٔ T.E.M. ۱۱۳
میکروسکوپ الکترونی نگاره (S.E.M.) ۱۱۵
اساس کار S.E.M. ۱۱۷
مشاهده نمونهٔ زنده؛ میکرومانیپولاسیون؛ میکروایرادیاسیون ۱۱۸
مشاهدهٔ یاخته‌های کشته شده (تثبیت و رنگ‌آمیزی) ۱۲۰
ایمنوسیتوشیمی ۱۲۸
خواص زیستی لیزر و کاربردهای آن ۱۳۱
تأثیر تابش لیزر CO_2 ..... ۱۳۳
اندرکنش لیزر بافت ۱۳۴
طیف سنجی (اسپکتروفتومتری) ۱۴۰
الکتروفورز ۱۴۰
پراش پرتوهای X (پراش Xray) ۱۴۱
نحوه استفاده از پراش پرتوهای X ۱۴۳
روش کروماتوگرافی ۱۴۳
کروماتوگرافی روی کاغذ (کروماتوگرافی کاغذی) ۱۴۳
کروماتوگرافی لایه نازک ۱۴۵
کروماتوگرافی تبادل یونی ۱۴۶
کروماتوگرافی میل ترکیبی ۱۴۸
صاف‌کردن به وسیله ژل ۱۴۹
کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا ۱۵۰
گاز کروماتوگرافی ۱۵۱
فنون جدید پیرامون پیشرفت‌های مهم در زیست‌شناسی مولکولی ۱۵۲

فصل ۵ - سازمان فرامولکولی ساختمان‌های غشایی ابتدایی و لیپوزوم‌ها ۱۵۹
غشایی ابتدایی و لیپوزوم‌ها ۱۵۹
شکل مولکول‌های پروتئینی ۱۵۹
تجمع ماکرومولکول‌ها ۱۶۰
تجمع (فرآهم‌آیی) ویروسی ۱۶۱
کُلّاژن - تجمع‌های فرامولکولی تروپوکلّاژن ۱۶۲
انعقاد خون ۱۶۵
نیروهای فیزیکوشیمیایی ۱۶۵
ساختمان‌های غشایی اولیه ۱۶۵
مجموعه (سیستم) لیپید - آب ۱۶۸
اشکال میلینی ۱۶۸
لیپوزوم‌ها و حفره‌های فسفولیپیدی - کاربردها در زیست‌شناسی وپزشکی ۱۷۰

فصل ۶ - غشاء سیتوپلاسمی و دیوارهٔ اسکلتی ۱۷۳
غشاء سلولی و تراوایی؛ میان‌کنش‌های بین سلولی ۱۷۳
برخی روش‌های مشخص کردن پلاسمالم ۱۷۳
سازمان مولکولی غشاءسلولی ۱۷۴
غشاء سلولی از پروتئین‌ها، لیپیدها و گلوسیدها تشکیل شده است ۱۷۶
لیپیدها به حالت نامتقارن در دو لایه غشاء پراکنده‌اند ۱۷۶
ویژگی‌های فسفولیپیدهای غشایی ۱۷۸

کلسترول در غشاء ۱۸۰
گلوسیدها در غشاء (گلیکولیپیدها و گلیکوپروتئین‌ها)..... ۱۸۰
گلیکواسفنگولیپیدها ۱۸۲
عملکرد گلیکواسفنگولیپیدها ۱۸۳
گیکوپروتئین‌ها ۱۸۳
پروتئین‌های غشاء..... ۱۸۴
پلی‌پپتیدهای غشاء گویچه سرخ..... ۱۸۶
پراکندگی نامتقارن آنزیم‌ها در غشاء سیتوپلاسمی..... ۱۸۹
گردهمایی پروتئین‌های غشاء و تشکیل لکّه..... ۱۹۰
طرح‌های مولکولی غشاء سلولی..... ۱۹۱
اعمال زیستی غشاء سیتوپلاسمی..... ۱۹۶
تبادل مواد مختلف بین محیط داخل و خارج سلول..... ۱۹۶
نقش غشاء در پدیدهٔ انتشار و اسمز..... ۲۰۸
انتقال باواسطه ۲۱۰
پروتئین‌های ناقل ۲۱۱
پروتئین‌های کانالی ۲۱۴
اتصال‌های سلولی ۲۲۲
سیناپس ۲۳۰
میکروویلی‌ها..... ۲۳۳
شناسایی سلول ۲۳۳
دیوارهٔ سلول‌های گیاهی..... ۲۳۴
ترکیب شیمیایی دیواره اسکلتی ۲۳۵
تولید و تجزیه زیستی سلولز ۲۳۹
همی سلولزها..... ۲۴۱
پکتین‌ها..... ۲۴۲
پروتئین‌ها..... ۲۴۴
کالّوزها ۲۴۶
منشاء (خاستگاه) دیوارهٔ اسکلتی..... ۲۴۶
چگونگی رشد دیوارهٔ اولیه..... ۲۵۰
دیوارهٔ پسین (دوّم - ثانویه)..... ۲۵۳

فصل ۷ - سیتوزول - اسکلت سلولی ۲۵۹
اسکلت سلولی..... ۲۶۰
ریزلوله‌ها..... ۲۶۳
ترکیب شیمیایی ریزلوله‌ها ۲۶۳
چگونگی سازمان یافتن و ویژگی‌های ساختمانی ریزلوله‌ها..... ۲۶۵
پروتئین‌های وابسته (ضمیمه) به ریزلوله‌ها: *(MAPs)*..... ۲۶۸
مراکز سازماندهی ریزلوله‌ها ۲۶۹
اعمال ریزلوله‌های سیتوپلاسمی..... ۲۷۰
اندامک‌های ریزلوله‌ای..... ۲۷۳
سانتریول‌ها..... ۲۷۴
فراساختمان سانتریول..... ۲۷۴
منشأ سانتریول ۲۷۴
نقش زیستی سانتریول..... ۲۷۶

دستگاه مژکی - مژک - تاژک - اجسام قاعده‌ای و ریشه‌های مژکی ۲۷۷
ریز رشته‌ها ۲۸۲
فراساختمار ریزرشته‌های اُکتین ۲۸۳
اُکتین با پروتئین‌های مختلف وابستگی دارد ۲۸۴
برهم‌کنش اُکتین - میوزین در سلول‌های ماهیچه‌ای ۲۸۵
مکانیسم انقباض ریزرشته‌های ماهیچه‌ای ۲۸۷
نقش اُکتین در سلول‌های غیرعضلانی ۲۸۸
اثر سیتوکالازین B بر ریزرشته‌ها ۲۸۹
ریزرشته‌های بینابینی ۲۹۰

فصل ۸ - شبکه آندوپلاسمی و ارگاستوپلاسم ۲۹۳
مقدمه و تاریخچه ۲۹۳
شکل‌شناسی عمومی شبکه آندوپلاسمی ۲۹۳
عوامل مؤثر در اتصال ریبوزوم‌ها به شبکه آندوپلاسمی ۲۹۵
پپتید نشانه به وسیله یک پپتیداز نشانه (ویژه) برداشته می‌شود ۲۹۷
پروتئین‌های غشایی در ساختمان‌های مختلفی ساخته و مجتمع می‌شوند ۲۹۹
خلاصه: (سنتز پروتئین‌های صادراتی - فرضیه نشانه) ۳۰۰
میکروزوم‌ها ۳۰۱
جداکردن ریبوزوم‌ها از غشاء شبکه زبر، *REL* شبکه آندوپلاسمی صاف ۳۰۱
غشاهای میکروزومی ترکیبات لیپیدی ۳۰۲
و پروتئین‌های پیچیده ۳۰۲
آنزیم‌های میکروزومی - گلیکوزیلاسیون و هیدروکسیلاسیون اسیدهای امینه ۳۰۴
آنزیم‌های میکروزومی - عدم تقارن در غشاء ۳۰۴
خلاصه - میکروزوم‌ها ۳۰۵
اعمال زیستی شبکه آندوپلاسمی ۳۰۵
خاستگاه (منشأ) شبکه آندوپلاسمی ۳۱۰

فصل ۹ - دستگاه گلژی ۳۱۳
مقدمه و تاریخچه ۳۱۳
فراساختار ۳۱۴
ترکیب شیمیایی ۳۱۸
اعمال زیستی دستگاه گلژی ۳۲۰
خاستگاه (منشأ) دستگاه گلژی ۳۳۹

فصل ۱۰ - لیزوزوم‌ها میکروبادی و دستگاه واکوئلی ۳۴۳
تاریخچه ۳۴۳
ویژگی‌ها و فراساختار لیزوزوم‌ها ۳۴۴
لیزوزوم‌ها تنوع شکل زیادی دارند ۳۴۵
ویژگی‌های عمدهٔ آنزیم‌های لیزوزومی ۳۴۵
غشاء لیزوزومی، اهمیت و برخی ویژگی‌های آن ۳۴۷
نقش زیستی لیزوزوم‌ها ۳۵۲
چگونگی تشکیل لیزوزوم‌ها ۳۶۰
ناحیه *GERL* و تشکیل لیزوزوم‌ها ۳۶۱
خلاصه ۳۶۲

میکروبادی‌ها ۳۶۳
پراکسیزوم‌ها ۳۶۴
فراساختار و ویژگی‌های پراکسیزوم‌ها ۳۶۴
نقش زیستی پراکسیزوم‌ها ۳۶۶
گلی اکسیزوم‌ها ۳۶۹
واکوئل‌ها ۳۷۱
ساختار و فراساختار واکوئل‌ها ۳۷۲
محتوای واکوئلی ۳۷۲
هیدرولازها و فعالیت تجزیه‌ای ۳۷۶
اهمیت غشاء واکوئلی در انتقال و به دام انداختن مواد ۳۷۶
پینوسیتوز درون واکوئلی ۳۷۸
منشأ دستگاه واکوئلی ۳۷۸

فصل ۱۱ - میتوکندری ۳۸۳
خلاصه ۳۸۶
فراساختار میتوکندری ۳۸۷
ناقل‌های اختصاصی ۳۹۵
آشنایی بیشتر با ترکیبات اصلی زنجیر تنفسی ۳۹۸
آرایش عوامل زنجیر تنفسی و عوامل فسفوریلاسیون در غشاء داخلی میتوکندری ۴۰۱
میتوکندری و تنفس سلولی ۴۰۳
چگونگی سنتز ATP در زنجیر تنفسی (مکانیسم فسفوریلاسیون اکسایشی) ۴۰۸
نقش زیستی میتوکندری ۴۱۲
شباهت میتوکندری‌ها با باکتری‌ها ۴۱۸
میتوکندری‌ها در حکم اندامک‌های نیمه مستقل ۴۱۸
منشأ میتوکندری ۴۲۰
خاستگاه پروکاریوتی میتوکندری‌ها ۴۲۱

فصل ۱۲ - پلاست‌ها ۴۲۳
کلروپلاست‌ها ۴۲۴
ساختمان درونی و فراساختار کلروپلاست ۴۲۶
پوش کلروپلاست و تبادل مواد از آن ۴۲۸
ویژگی‌های سیستم غشایی درونی کلروپلاست ۴۲۹
ترکیب شیمیایی غشاءهای تیلاکوئیدی ۴۳۱
ویژگی‌های فراساختاری غشاءهای تیلاکوئیدی ۴۳۲
واحدهای کلروفیل - پروتئین موجود در غشای تیلاکوئید ۴۳۴
ساختار مولکولی فتوسیستم‌ها (PSI و $PSII$) ۴۳۵
نحوهٔ ارتباط در زیرواحدهای هر فتوسیستم (انتقال درون سیستمی) ۴۳۵
کمپلکس پروتئینی جمع‌کننده نور $LHCP$ ۴۳۶
ارتباط دو فتوسیستم از راه انتشار یا پخشیدگی انرژی ۴۴۰
مطالعات اولیه و اصول واکنش‌های فتوسنتزی ۴۴۱
نقش CO_2 و H_2O در فتوسنتز ۴۴۲
چرخهٔ چهار کربنی فتوسنتز ۴۵۵
متابولیسم گیاهان کراسولاسه‌ای ۴۵۶

فصل ۱۳ - ریبوزوم‌ها ۴۶۵
جداسازی و شناسایی پروتئین‌های ریبوزومی ۴۷۱

فصل ۱۴ - هسته ۴۸۵
ساختمار عمومی هسته ۴۸۶
شیرهٔ هسته (کاریولنف = نوکلئوپلاسم) ۴۹۰
اسکلت هسته‌ای ۴۹۰
هستک ۴۹۳
نقش زیستی هستک ۴۹۵
کروماتین ۴۹۶
هیستون‌ها را به دو گروه به شرح زیر تقسیم‌بندی می‌کنند ۴۹۸
کروموزوم‌ها ۵۰۷
اجزای ساختمانی کروموزوم ۵۰۷
تشکیلات فراساختمانی کروموزوم ۵۱۲
ساختمار کروموزوم پروکاریوتی ۵۱۴
پلاسمید و اپی‌زوم ۵۱۵
کروموزوم لمپ‌براش (بطری شوی) ۵۱۷

فصل ۱۵ - چرخهٔ یاخته‌ای، همانندسازی *DNA* و تقسیم یاخته‌ای ۵۱۹
چرخه یاخته‌ای ۵۱۹
تنظیم چرخه یاخته‌ای ۵۲۱
همانندسازی ماده ژنتیکی ۵۲۵
پروتئین‌های *SSB(SSBP)* ۵۳۱
پریموزوم و پریماز ۵۳۱
پروتئین *rep* ۵۳۲
هلیکازها ۵۳۵
مراحل و چگونگی همانندسازی *DNA* ۵۴۱
همانندسازی *DNA* حلقوی به روش تتا *(q)* ۵۵۰
همانندسازی به ورش حلقه چرخان ۵۵۰
اصلاح عوامل ضمن همانندسازی ۵۵۱
تقسیم یاخته ۵۵۴
میتوز ۵۵۵
میوز ۵۶۷
جفت‌شدن کروموزوم‌ها در میوز - «مجموعه سیناپتونمال» ۵۷۳
کیاسما، تبادل ماده ژنتیکی (کراسینگ‌اور) و نوترکیبی ژنتیکی ۵۷۶
اهمیت میوز: ایجاد اشتراک‌های جدید ژنتیکی ۵۷۹

فصل ۱۶ - ساختار ژن - رونویسی - پردازش و پیرایش - سنتز پروتئین ۵۸۱
ساختار کلی ژن در پروکاریوت‌ها ۵۸۱
ساختار ژن در یوکاریوت‌ها ۵۸۴
اهمیت و نقش‌های متفاوت اینترون‌ها ۵۸۸
ژن‌های کاذب ۵۹۱
ترتیب‌های تکراری ۵۹۱
ویژگی‌های عمومی رمزهای ژنتیکی ۵۹۴

رمزها و ژن‌های هم‌پوشان ۵۹۸
رونویسی - الگوبرداری یا کپی‌سازی ۶۰۰
ساختار و ویژگی‌های *RNA* پلیمراز پروکاریوتی ۶۰۱
ساختار و عمل *RNA* پلیمرازهای هسته‌ای یوکاریوتی ۶۰۳
مراحل و چگونگی رونویسی ۶۰۵
مجموعه‌های (شکل‌های) «بسته» و «باز» ۶۰۷
آغاز سنتز *RNA* ۶۰۷
۳- مرحله پایان رونویسی ۶۱۲
انواع *RNA*ها، ویژگی‌ها و نقش آنها ۶۱۴
*RNA*های رویبوزومی (*rRNA*ها) ۶۱۵
*RNA*های ناقل (*tRNA*ها) ۶۱۸
ساختار دوم *tRNA*ها ۶۲۲
ساختار سوم *tRNA*ها ۶۲۳
*RNA*های پیامبر (*mRNA*ها) ۶۲۴
پروتئین‌سازی (سنتز پروتئین) ۶۳۴
انتقال متیونین آغازی به مجموعه آغازگر ۶۳۹
تشکیل مجموعه زیرواحد ۴۰*s* ریبوزوم و *tRNA* شروع ۶۴۴
ویژگی‌های عمده مرحله طویل شدن زنجیره پلی‌پپتیدی در یوکاریوت‌ها ۶۵۰
پلی‌ریبوزوم‌ها (پلی‌زوم‌ها) ۶۵۲
آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر در پروتئین‌سازی ۶۵۳
پروتئین‌سازی در میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها ۶۵۴
انرژی موردنیاز پروتئین‌سازی ۶۵۶

فصل ۱۷ - تنظیم بروز ژن‌ها و تمایز یاخته‌ای تنظیم بروز ژن‌ها ۶۵۷
۲- تنظیم در یوکاریوت‌ها ۶۷۱
۳- درهم ریختن تنظیم یاخته‌ای، ویروس‌ها و انکوژن‌ها ۶۸۶
تمایز یاخته‌ای ۶۹۲
مراحل اصلی تمایز یاخته‌ای ۶۹۴
نقش هسته و سیتوپلاسم در تمایز یاخته‌ای ۶۹۶
فعّال‌کردن گویچه‌های سرخ با پیوستگی (الحاق) یاخته‌ای ۶۹۸
عوامل اصلی هسته‌ای مؤثر در تمایز یاخته‌ای ۷۰۰
عوامل اصلی سیتوپلاسمی مؤثر در تمایز یاخته‌ای ۷۰۲
تمایزهای سطح یاخته‌ای - برهم‌کنش‌های یاخته‌ای ۷۰۵
وابستگی تمایز یاخته‌ای و تقسیم یاخته ۷۰۸
نقش عوامل محیطی در تمایز یاخته‌ای ۷۰۹
برخی ویژگی‌های اساسی در تمایز یاخته‌ای ۷۱۰
خلاصه: چگونگی تمایز یاخته‌ای ۷۲۱

واژه‌نامه فارسی به انگلیسی ۷۲۳
منابع و مآخذ ۷۲۹

۱ تکامل سلولی وسطوح سازمان یافتگی از مولکول تا پروکاریوت و یوکاریوت

تاریخچه

فلاسفه و طبیعی دانان قدیم به ویژه ارسطو[1] در عهد باستان و پاراسلسوس[2] در دورهٔ رنسانس به این نتیجه رسیدند که **جانوران وگیاهان، با همهٔ پیچیدگی که در سازمانشان وجود دارد، تنها از تعداد کمی از اجزائی که در هر یک از آنها تکرار شده، ساخته شده‌اند.** منظور این پژوهشگران از اجزاء، ساختمان‌های ماکروسکوپی یک جاندار مثل ریشه‌ها، برگ‌ها و گل‌ها بوده است که در گیاهان مختلف مشترک‌اند و یا بخش‌ها و اندام‌هایی بوده است که در سلسلهٔ جانوری تکرار می‌شوند. قرن‌ها بعد، با اختراع عدسی‌های بزرگ‌کننده جهان اندازه‌های میکروسکوپی کشف شد. روبرت هوک[3] فیزیکدان انگلیسی از سال ۱۶۶۵، با بررسی میکروسکوپی برش‌های چوب پنبه ساختمان سلولی را کشف کرد. هوک مشاهده کرد که این بافت از حفره‌های متعدد مجاور هم که آنها را سلول[4] به معنی اتاق کوچک نامید، ساخته شده است. چند سال بعد طبیعی‌دانان گرو[5] و مالپیگی[6] مشاهدات هوک را بدون برداشت بیشتری تأیید کردند و تا مدت زیادی تصور بر این بود که سلول‌ها حجره‌های خالی، حفر شده در یک مادهٔ زمینه‌ای هستند. در حدود همان زمانی که روبرت هوک در لندن مطالعات خود را ادامه می‌داد یک نفر هلندی به نام آنتونی ون لیوون هوک[7] با میکروسکوپ سادهٔ خود موجودات تک سلولی را به صورت زنده در آب راکد، قطرات باران، آب دریا و خون مشاهده کرد و آنها را به نام جانوران کوچک نامید و به این ترتیب وی اولین کسی بود که سلول زنده را مشاهده کرد. لیوون هوک سلول‌های مختلفی از جمله اسپرم انسان را مشاهده کرد و در رسوبات روی دندان، باکتری‌ها و در گویچه‌های سرخ ماهی آزاد هستهٔ سلولی را نیز مورد توجه قرار داد و با ارائه نظریهٔ جدیدی با این عنوان که میکروارگانیسم‌ها نیز همانند سایر موجودات زنده از موجودات شبیه خود به وجود می‌آیند به نظریهٔ تولیدمثل خلق الساعه[8] یا به وجود آمدن موجود جاندار از موجود بی‌جان تردید پیدا کرد.

برای این که مطلب به پیشرفت‌های مهمی برسد بایستی نزدیک به ۱۶۰ سال یعنی تا حدود ۱۸۳۰ منتظر شد. بالاخره، دو تروشه[9] گیاه‌شناس فرانسوی برای اولین بار تصریح کرد که سلول‌ها واحدهای حقیقی سازندهٔ موجودات زنده‌اند. وی از مشاهدات خود نتیجه‌گیری کرد که سلول‌ها در اثر فرآیند چسبندگی[10] در کنار یکدیگر باقی مانده و به یکدیگر متکی می‌شوند. نظریات دو تروشه بعدها به وسیلهٔ شلایدن[11] (در سال ۱۸۳۸) و شوان[12] (در سال ۱۸۳۹) گسترش یافت و به صورت «نظریهٔ سلولی»[13] ارائه شد که براساس آن کلیهٔ موجودات زنده از واحدهای ساختمانی به اسم سلول ساخته شده‌اند. مشاهدات میکروسکوپی همچنین نشان دادند که یک جاندار کامل می‌تواند مثل تک‌سلولی‌ها از یک سلول ساخته شده باشد، یا مثل پرسلولی‌ها از تعداد زیادی سلول‌های تمایز یافته که به صورت بافت‌ها و اندام‌ها گرد آمده‌اند تشکیل شود.

1- Aristotle 2- Paracelsuse 3- Robert Hooke 4- Cellula 5- Grew
6- Malpighi 7- Antony Van Leeuwenhoek 8- Spontaneous generation
9- Dutrochet 10- Cohesion 11- Schleiden 12- Schwan 13- Cell theory

شناختی که امروز از ساختمان و طرز کار سلول و اجزای مختلف آن داریم محصول مطالعات پژوهشگران زیادی است. از جمله دوژاردن[1] (در سال ۱۸۳۵) پی برد که مادهٔ «لزج و شفاف، نامحلول در آبی» که درون سلول‌ها را پر کرده بخش اصلی آنهاست و این ماده را سارکود[2] نامید. فون مول[3] (در سال ۱۸۴۰) کلمهٔ مذکور را با پروتوپلاسم[4] که برای مشخص کردن مادهٔ زنده مناسب‌تر است جایگزین ساخت. تا این تاریخ، در ۱۸۳۱ روبرت براون[5] گیاه‌شناس انگلیسی وجود دایمی توده‌ای پرتراکم را در سلول مشاهده کرد و آن را هسته[6] نامید.

در نیمهٔ دوم قرن نوزدهم تقسیم هسته به وسیلهٔ هوفمیستر[7]، استراسبورگر[8] و دیگران کشف و به وسیلهٔ شلیشر[9] کاریوکینز[10] و به وسیلهٔ فلمینگ[11] میتوز[12] نامیده شد. کشف این پدیده بتدریج این تصور را به وجود آورد که «هر سلول از سلول دیگری به وجود می‌آید» این مفهوم به ضرب‌المثل مشهور ویرشو[13] (در سال ۱۸۸۵) «هر سلول، سلولی را می‌سازد» خلاصه شد و به وسیلهٔ استراسبورگر به صورت «هر هسته، هسته‌ای را می‌سازد» کامل گردید.

واکوئل‌ها که به وسیلهٔ نژلی[14] در سلول‌های گیاهی کشف شده بودند به وسیلهٔ ساکس[15] (در سال ۱۸۷۴)، دووری[16] (در سال ۱۸۸۵) و پفر[17] به خوبی مطالعه شدند.

پلاست‌ها در سلول‌های گیاهی به وسیلهٔ شیمپر[18] و می‌یر[19] (در سال ۱۸۸۳) شناخته شدند. میتوکندری‌ها برای اولین بار توسط کولیکر[20] (در سال ۱۸۵۰) از سلول‌های عضلانی مخطط حشرات جدا و مشاهده شدند. بندا[21] (در سال ۱۸۹۷) در سلول‌های جانوری که به‌طور مناسبی تثبیت شده بودند ذرات یا میله‌های کوتاهی را تشخیص داد و آنها را کوندریوزم[22] نامید.

مایکلیس[23] (در سال ۱۸۹۸) واکنش‌های اکسیداسیون و احیا را در میتوکندری‌ها تشخیص داد. میتوکندری‌ها در سال‌های بعد توسط فوره - فرمیه[24] و پارات[25] در سلول‌های جانوری و به وسیلهٔ گی‌یرمون[26] و دانژار[27] در سلول‌های گیاهی بهتر بررسی شدند.

گلژی[28] (در سال ۱۸۹۸) در سلول‌های عصبی جغداندامک دخیل در ترشحات سلولی را کشف کرد که بعدها به نام او نامیده شد.

ابداع میکروسکوپ فاز متضاد در ۱۹۳۴ و میکروسکوپ الکترونی در ۱۹۳۸، تحرک جدیدی به مطالعات ریخت‌شناسی[29] داده است. گرچه به دلیل وجود دیوارهٔ اسکلتی در سلول‌های گیاهی مشاهداتی که با میکروسکوپ فاز متضاد بر روی آنها صورت گرفته است کمتر ثمربخش بوده است، اما انتخاب نمونه‌ای مناسب گاهی موجب نتایج درخشانی شده است که از آن جمله می‌توان مطالعهٔ میتوز در آلبومن‌های جوان را که به وسیلهٔ باجر[30] بعد از ۱۹۳۵ صورت گرفته است نام برد.

تا دههٔ ۱۹۴۰ تصورات در مورد ساختمان سلول تنها اصلاحات جزئی پیدا کرده و در طول این دوره مخصوصاً به مطالعهٔ محتویات سلول‌ها توجه شده است. از این دوره به بعد توجه پژوهشگران بیشتر به مطالعه نمونه‌های زنده معطوف گردید که از آن جمله می‌توان مشاهدات صبورانهٔ گی‌یرمون را نام برد. کشت بافت‌ها ابتدا در سلسلهٔ

1- Dujardin 2- Sarcode 3- Von Mohl 4- Protoplasm 5- Robert Brown
6- Nucleus 7- Hofmeister 8- Strasburger 9- Schleicher 10- Karyokinesis
11- Flemming 12- Mitosis 13- Virchow 14- M. Nejli 15- Sax
16- Deveri 17- Peffer 18- Shimper 19- Myre 20- Kolliker
21- Benda 22- Chondriosome 23- Michelis 24- Faure-fremiet 25- Parat
26- Giermoon 27- Danjar 28- Golgi 29- Morphology 30- Bajer

جانوران به وسیلهٔ هاریسون[1]، کارل[2] و بعد در سلسلهٔ گیاهان به وسیلهٔ وایت[3] و گوتره[4] با موفقیت انجام شد. سپس روش‌های دستکاری میکروسکوپی[5] توسط شامبر[6] به کار گرفته شد. بتدریج روش‌های فنی عکسبرداری از سلول‌ها به روش عکسبرداری لحظه‌ای میکروسکوپی[7] و مشخص کردن اختصاصات سیتوشیمیایی سلول‌ها مورد استفاده قرار گرفت و به مرور زمان دقت بیشتری در مطالعات سلولی صورت گرفت.

از حدود ۱۹۵۰ روش‌های مشاهده سلول‌ها با میکروسکوپ الکترونی دقیق‌تر شد و بتدریج فراساختمار[8] اجزاء سلولی مشخص گردید و نتایج به دست آمده تصورات پژوهشگران را در مورد طرز کار سلول متحول ساخت. به عنوان مثال پورتر[9] و همکارانش (۱۹۴۵) شبکهٔ آندوپلاسمی را در سلول‌ها شناختند. دودوو[10] و همکارانش (۱۹۴۹) در سلول‌های همگن شده لیزوزوم‌ها را تشخیص دادند. ریبوزوم‌ها توسط کلود[11] با استفاده از روش جداسازی ساختمان‌های سلولی به وسیلهٔ اولتراسانتریفوگاسیون افتراقی[12] شناخته شدند و بتدریج مرزهای ریخت‌شناسی سلولی و بیوشیمی به هم رسیدند.

توجه زیست‌شناسان از اوایل قرن حاضر و بخصوص از ۱۹۴۰ به بعد با ابداع و به کارگرفتن فنون بیوشیمیایی به شناخت اعمال پیچیدهٔ سلولی معطوف گردید. مطالعات وسیع دانشمندان مختلف از جمله شارگاف[13] (در سال ۱۹۴۷)، ویلکینز[14] و همکارانش (۱۹۵۰)، پولینگ و کوری (در سال ۱۹۵۱)[15]، بر روی اساس ساختمانی مولکول DNA[16] سرانجام منجر به کشف ساختمان مولکولی مزبور توسط واتسون و کریک[17] (در سال ۱۹۵۳) گردید و از آن هنگام کارهای بیشماری بر روی همانندسازی مولکول DNA، بیوسنتز RNA[18] و مکانیسم‌های سنتز پروتئین صورت گرفت. از جمله کارهای درخشان دهه‌های ۱۹۵۰ تا ۱۹۷۰ در زمینهٔ بیوسنتز اسیدهای هسته‌ای و پروتئین‌ها، می‌توان از کارهای تحقیقاتی مسلسون و استال[19] بر روی همانند سازی DNA، کریک و دیگران (در سال ۱۹۶۱) بر روی رمز وراثتی[20]، باتز و هال[21] (در سال ۱۹۶۲) بر روی ساختمان RNA و کورنبرگ[22] و همکارانش (۱۹۶۹ - ۱۹۵۶) بر روی آنزیم‌های بیوسنتز DNA نام برد.

به عبارتی ساده می‌توان گفت که به طور کلی تا ۱۹۴۰ مطالعهٔ سلول جنبهٔ توصیفی داشته است (سلول شناسی[23]) و تنها پس از این زمان است که سلول‌شناسی جای خود را به زیست‌شناسی سلولی[24] داده است، کاربرد روش‌های جدید (جدا کردن ساختمان‌های سلولی با اولتراسانتریفوگاسیون افتراقی، اتوهیستورادیوگرافی[25] مشاهدهٔ سلول‌های کشت شدهٔ زنده، میکروسکوپی الکترونی و مانند آن) مشاهده و تجربهٔ مسائلی را میسر ساخته است که تا آن زمان جز به صورت مسائل نظری به هیچ وجه روشن نبودند.

سلول واحد ساختمان و کار اساسی موجودات زنده است، درست همان گونه که اتم واحد ساختمانی و کار اساسی ساختمان‌های مولکولی است. همچنین سلول را می‌توان به عنوان جانداری در نظر گرفت که اغلب بسیار تخصص یافته است و از اجزای زیادی ساخته شده که همهٔ آنها نه تنها سلول واحدی را می‌سازند بلکه به جاندار به عنوان یک مجموعه، مفهوم ویژه‌ای می‌دهند. اگر سازمان سلولی خراب شود، فعالیت سلول نیز دستخوش خرابی شده، و گرچه ممکن است برخی کارهای حیاتی (مثل فعالیت آنزیمی) باقی بمانند، سلول بی‌سازمان شده و می‌میرد.

1- Harrison 2- Carrel 3- White 4- Cautret 5- Micromanipulation
6- Chambers 7- time lapsecinematography 8- Ultrastructure 9- Porter
10- DeDuve 11- Claude 12- Differential Ultracentrifugation 13- Chargaff
14- Wilkins 15- Pauling & Corey 16- Dexyribonucleic acid
17- Watson & Crick 18- Ribonucleic acid 19- Meselson & Stahl
20- Genetic Code 21- Bautz & Hall 22- Kornberg 23- Cytology 24- Cell biology
25- Auto - historadiography

به‌طور کلی امروزه پذیرفته شده که سلول واحد زندگی، واحد ریخت‌شناسی و کار است و اساساً با امکان تولیدمثل خود (خودزایشی) مشخص می‌گردد. در عین حال، به طوری که بعداً خواهیم دید، ساختمان متداول سلولی، خاص همهٔ موجودات زنده نیست، باکتری‌ها، سیانوباکترها و آکتینومیست‌ها نوع دومی از ساختمان سلولی را نشان می‌دهند و ما در مورد شناخت ویروس‌ها نیز بحث خواهیم کرد.

برخی منابع مطالعه در زیست‌شناسی سلولی

به دلیل گسترش وسیع مسائل و تحقیقات وابسته به زیست‌شناسی سلولی، کتاب‌ها، مجلات و منابع مطالعه در این علم بسیار زیاد و متنوع‌اند. از لیست طولانی نشریاتی که در مورد زیست‌شناسی سلولی وجود دارد تنها به ذکر برخی از آنها که بهتر شناخته شده‌اند اکتفا می‌شود:

- Journal of Cell Biology ● Experimental Cell Research ● Journal of Molecular Biology
- Journal of Ultrastructure Research ● Journal de Microscopie ● Journal of Cell Science
- Journal of cellular and Comparative physiology, Chromosoma, Cytogenetics, Heredity & Hereditas, Cell Differentiation. Plant Cell, ...

و همچنین تحقیقات راجع به زیست‌شناسی سلولی اغلب در مجلات عمومی دوره‌ای مانند:

Nature, Science, Proceedings of the Royal Society, Proceedings of the National Academy of Sciences (Wash), Comptes Rendus de l'Academie des Sciences, Natur Wissenschaften et Exprientia

یا در مجلات خیلی اختصاصی‌تر نظیر:

Biochimica et Biophysica Acta, Biochemical Journal, Journal of Biological Chemistry.

به چاپ می‌رسند.

مطالب دقیق مربوط به پیشرفت‌های کنونی زیست‌شناسی سلولی در برخی نشریات مانند:

International Review of Cytology, Quarterly Review of Biology, Physiological Reviews, Biological Reviews, Advances in Genetics, Plant phsiology ....

دیده می‌شود.

نشریات دوره‌ای اختصاصی نظیر:

Biological Abstracts, Index Medicus, Excerpta Medica, Chemical Abstracts, Genetic Abstracts, Berichte Uber die Wissen chaftliche Biologie

که در آنها عناوین و خلاصه کارهای تحقیقانی منتشر می‌شود، از نظر تکمیل یک مرجع‌یابی مفیدترند. نشریات دوره‌ای دیگر مثل:

Current Contents in life Sciences, Bulletin Signaletique du Conseil des Recherches

نیز عناوین کارهایی را که در مجلات علمی مختلف دیده می‌شود منتشر می‌کنند.

همچنین تعداد زیادی از بررسی‌های اختصاصی، خلاصه شده یا بسط داده شده در موارد مختلف اختصاصی مربوط به زیست‌شناسی سلولی وجود دارد که در فصول آینده به آنها اشاره خواهد شد. از جمله آنهایی که بیشتر مبتنی بر مدارک علمی‌اند عبارت‌اند از: The Cell در ۶ جلد، تألیفات منتشر شده توسط Mirsky Cytology و Brachet و Handbook of Molecular که به وسیلهٔ Lima - de - Faria از سال ۱۹۶۹ منتشر شده است.

زیست‌شناسی سلولی و شاخه‌های آن

زیست‌شناسی سلولی علمی است که به بررسی و شناخت سلول از جنبه‌های مختلف مولکولی، ساختمانی و

فراساختمانی، فیزیولوژیکی، پیدایش و تکامل و رفتار سلول‌ها در جانداران تک سلولی و پرسلولی می‌پردازد. به دلیل گستردگی زیاد علم زیست‌شناسی سلولی، تنها به معرفی شاخه‌های عمدهٔ آن به شرح زیر می‌پردازیم:

۱- سلول‌شناسی شاخه‌ای از زیست‌شناسی سلولی است که از ساختمان، عمل، تکثیر، آسیب‌شناسی و پیدایش سلول‌ها بحث می‌نماید.

۲- فیزیولوژی سلولی[1] علم بررسی اعمال زیستی سلول‌ها و اجزاء مختلف آنهاست. عمده‌ترین مسائل مورد توجه در این علم مطالعهٔ ماهیت غشاء سلولی، انتقال فعال و غیرفعال از غشاها، اعمال متقابل سلول‌ها با محیط، پدیده‌های تحریک‌پذیری و انقباض سلول‌ها، تغذیهٔ سلول، رشد و نموّ، ترشح و سایر فعالیت‌های سلولی می‌باشد.

۳- ژنتیک سلولی[2] شاخه‌ای از زیست‌شناسی سلولی است که از توارث و تنوع سلول‌ها با استفاده از روش‌های سلول‌شناسی و ژنتیک بحث می‌کند. این علم به مطالعهٔ مادهٔ ژنتیکی سلول‌ها و بویژه کروموزوم‌ها از نظر تعداد، ریخت، ساختمان و طبقه‌بندی آنها و همچنین تغییرات این ویژگی‌ها در سلول‌های گونه‌های مختلف می‌پردازد.

۴- شیمی سلولی[3] شاخهٔ دیگری از زیست‌شناسی است که با استفاده از ابزارها و فنون شیمیایی ویژه، با حداقل تغییرات ممکن، ترکیبات شیمیایی سلول‌ها و جای آنها را بررسی می‌نماید. برای مثال این علم با استفاده از معرف‌ها به بررسی نوع پروتئین‌ها، قندها، چربی‌ها، اسیدهای نوکلئیک، آنزیم‌ها و ترکیبات دیگر سلولی و جایگاه آنها در سلول می‌پردازد. چنین مطالعاتی هم‌اکنون در آسیب‌شناسی[4] نیز مورد استفاده است.

۵- فیزیک سلولی[5] - شاخه‌ای از زیست‌شناسی سلولی است که با استفاده از ابزار، روش‌ها و قوانین فیزیکی به بررسی پدیده‌های زیستی سلول و اجزاء سازندهٔ آن می‌پردازد. به عنوان مثال مواردی چون پتانسیل غشایی، انتشار، جذب، اسمز در سلول، حالت کلوئیدی سیتوپلاسم و خواص ناشی از آن، دخالت نیروهای فیزیکی در تجمع مولکول‌ها و سازمان یافتن غشاها و ویژگی‌های شکست‌نور به وسیلهٔ سلول و اندامک‌های آن، اثر پرتوها بر سلول، قوانین فیزیکی حاکم بر تولید و مصرف انرژی در سلول‌ها و مانند آن قابل ذکر است.

۶- زیست‌شناسی مولکولی[6] شاخه‌ای از زیست‌شناسی سلولی است که به بررسی مولکول‌های سازندهٔ سلول بویژه ماکرومولکول‌ها از نظر نوع و ساختمان، ریخت، تکامل، گسترش و نقش آنها در پدیده‌های زیستی سلول می‌پردازد. نحوهٔ تشکیل و عمل مولکول‌های سازندهٔ سلول‌ها نیز از مسائل مورد بررسی در این علم است. سازمان مولکولی اجزاء سلولی و به عنوان مثال سازمان مولکولی غشاها (طرح موزائیک سیال)، بیوشیمی ماکرومولکول‌ها و ژنتیک مولکولی از مباحث مورد توجه در زیست‌شناسی مولکولی است.

پیشرفت‌های کنونی و چشم‌اندازهای آیندهٔ زیست‌شناسی سلولی

در سال‌های اخیر با ابداع روز افزون روش‌ها و فنون جدید مطالعهٔ سلول‌ها، زیست‌شناسی سلولی پیشرفت‌های شایان توجهی داشته است. با کار ابزارهای نوری و الکترونی دقیق در زمینه‌های مختلف تحقیقات سلولی و نیز با استفاده از مواد رادیواکتیو و ایزوتوپ‌های مختلف مجهولات متعددی از اعمال پیچیدهٔ حیاتی سلول‌ها برای بشر روشن شده است. با شناخت ساختمان و عمل مواد تشکیل‌دهندهٔ سلول و برهم کنش‌های این مواد با یکدیگر ماشین‌های دقیق و خودکاری بر مبنای کار سلول زنده ساخته شده که اساس علم سیبرنتیک[7] را پایه‌گذاری کرده

1- Cell Physiology 2- Cytogenetics 3- Cytochemistry 4- Pathology 5- Cytophysics
6- Molecular Biology 7- Cybernetics

است. به عنوان مثال توجه به شکل، ساختمان و رفتار پرندگان، ماهی‌ها و پستانداران ... راه‌گشای ابداع ماشین‌های پیچیده‌ای چون هواپیما، زیر دریایی، کامپیوتر و نظایر آن بوده است. تحقیقات در مورد مواد سازندهٔ سلول، بشر را یاری داده است که به شناخت بسیاری از بیماری‌ها و علل مولکولی آنها دست یابد و با رفع این عیوب بیماران را به وضعیت طبیعی سوق دهد. چشم‌انداز این نوع کنترل‌های مولکولی این امید را می‌دهد که در آینده بشر بتواند حتّی به پیشگیری و معالجهٔ انواع سرطان‌های بدون علاج امروزی نیز برسد.

اعمال مختلف مغزی نظیر یادگیری، خاطره، حافظه، فراموشی، فکر و رؤیا ... از مسائل مورد توجهی است که امید می‌رود با شناخت دقیق‌تری از آنها بشر در آینده قادر به ساختن داروهایی گردد که در پیشگیری و معالجهٔ بیماری‌ها و آسیب‌های مغز بسیار مؤثر باشد. در شناخت ساختمان و اعمال ژن‌ها تا کنون پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای حاصل شده است. نقشه‌های دقیق ژنتیکی بعضی از موجودات زنده تعیین گردیده است و بخصوص در مورد باکتریوفاژها و باکتری‌ها تحقیقات وسیعی جریان دارد، به طوری که در چند سال اخیر دانشمندان موفق شده‌اند ژن‌های موردنظر خود را تفکیک کرده و در بعضی از موجودات نامبرده کار گذارند و از این طریق بتوانند موجب تغییر در روند تمایز، رشد و نمو سلول‌ها و جانداران شوند و با آگاهی از طرز عمل ژن‌ها پروتئین‌های خاص بدن موجود زنده را در شیشه[1] به دست آورند. از جمله موفقیت‌های چند سال اخیر در زمینه انتقال ژن، انتقال ژن‌های سازندهٔ انسولین و هورمون‌های نمو را می‌توان نام برد که در کولی‌باسیل[2] نتایج رضایتبخشی داشته است. انتقال ژن از کرم شب‌تاب به توتون که موجب درخشندگی توتون شده است و نیز تغییرات و تحولات بیشمار در ویژگی‌های گونه‌ها از دست آوردهای جدید زیست‌شناسی سلولی و مولکولی می‌باشد. چنین تحقیقاتی در نهایت انقلابی در علوم زیستی به وجود خواهد آورد.

تغییر در رمز وراثتی و به کار انداختن ژن‌های مفید، یا از کار انداختن ژن‌های زیان‌بخش چشم‌انداز قابل ملاحظهٔ دیگری است که تا کنون در جانداران مختلف با موفقیت‌های زیادی همراه بوده و اساس علم مهندسی ژنتیک[3] را پی‌ریزی کرده است.

در زمینهٔ ژنتیک سلولی پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای به دست آمده است. برای مثال بسیاری از بیماری‌های کروموزومی انسانی هم اکنون نه تنها در دوران بعد از تولد با کشت سلول‌های لنفوسیت، مغز استخوان و مانند آن قابل تشخیص است بلکه از ماه‌های ابتدایی نمو رویانی نیز با کشت سلول‌های مایع آمنیونی شناخته می‌شود. در گیاهان نیز بهره‌گیری از اصول ژنتیک سلولی موجب پیشرفت‌های عمده‌ای شده است. به عنوان مثال ایجاد نژادها و گونه‌های مقاوم به ویروس‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌های بیماریزا، به دست آوردن نمونه‌های گیاهی با محصولات مرغوب‌تر (میوه‌های درشت و بدون هسته، گیاهان علوفه‌ای، گیاهان مورد استفاده در تهیهٔ فرآورده‌های صنعتی و دارویی) قابل ذکر است. مسأله تأمین کود برای گیاهان هزینه‌های سنگینی دارد و هم اکنون تحقیقاتی انجام می‌شود که با تغییر در رمز وراثتی گیاهان بتوان ارقامی از آنها را به دست آورد که بدون نیاز به کود احتیاجات غذایی خود را تأمین نمایند.

در زمینهٔ کشت سلول‌ها و بافت‌ها هم اکنون پیشرفت‌های شایانی نصیب بشر شده است. تا آنجا که با کشت سلول‌های منفرد گیاهی تا حد به دست آوردن گیاه گلدار و در جانوران تا حد تشکیل بافت‌ها موفقیت به دست آمده است. استفاده از روش‌های کشت سلول و بافت تهیهٔ فرآورده‌های مهمی چون انواعی از واکسن‌ها و پادتن‌های اختصاصی را ممکن ساخته است. هم اکنون رشد و نگاهداری برخی از بافت‌ها و اندام‌ها در محیط کشت جهت

1- in vitro 2- E.Coli 3- Genetic engineering

انجام پیوندهای بافتی و اندامی امکان‌پذیر است. با لقاح اسپرم و تخمک در محیط کشت، به دست آوردن جنین ابتدایی و کار گذاشتن آن در رحم مادر[1] مسأله برخی از نازایی‌ها حل شده است.

مطالعات وسیعی دربارهٔ ویروس‌ها و ارتباط آنها با سلول‌ها صورت گرفته که از یک سو موجب شناخت بهتری از ویروس‌ها و از سویی باعث شناخت راه‌های مقابله با آنها شده است و امید می‌رود در آینده راه‌حل‌های نهایی مقابله با این موجودات و حتّی استفاده از آنها جهت تغییرات مطلوب و موردنظر در حد وسیعی امکان‌پذیر گردد.

از آنجا که مواد پروتئینی از مهمترین ترکیبات موردنیاز بدن موجودات زنده می‌باشد هم اکنون تحقیقات گسترده‌ای در جریان است تا از مواد زاید گیاهی، و حتّی مواد نفتی پروتئین‌های موردنیاز تغذیه‌ای انسان و دام تهیه گردد.

تأمین انرژی سوختی و حرارتی از مواد زاید و فضولات جانوری که هم اکنون تحت عنوان "بیوگاز"[2] خوانده می‌شود راه جلوگیری از اتلاف انرژی است که در حال حاضر در برخی نقاط جهان از آن استفاده می‌شود.

شناختن راه‌های متابولیسمی مواد در بدن موجودات زنده از مسائل زیست‌شناسی سلولی است و هم اکنون موارد متعددی از نحوهٔ متابولیسم مواد در بدن بسیاری از موجودات زنده مشخص گردیده است لذا در آینده امکان جانشین‌سازی مواد شیمیایی مختلف که بتوانند عمل آنزیم‌ها و پروتئین‌های آسیب‌دیده را در بدن انجام دهند وجود دارد و بدین ترتیب درمان بسیاری از بیماری‌های مربوط به نقص آنزیم‌ها و پروتئین‌ها امکان‌پذیر خواهد شد.

دست بردن در رمز وراثتی و دست کاری ژن‌های موجودات زنده ارتباط مستقیمی با فرهنگ حاکم بر جوامع بشری دارد. انجام این نوع تحقیقات به همان نحو که می‌تواند موجب حل بسیاری از مشکلات انسان باشد ممکن است مورد سوء استفاده قرار گیرد و مصایب جبران‌ناپذیری را به وجود آورد.

همان‌طور که تاکنون شناخت هر ابزار یا روش جدیدی در سایر علوم تجربی بنحوی موجب گسترش و پیشرفت علوم سلولی و مولکولی شده است و با اشاراتی که به برخی پیشرفت‌های سال‌های اخیر در زمینهٔ این علوم بعمل آمد، براحتی می‌توان دست‌یابی به موارد زیر را به عنوان حداقل پیشرفت‌های ممکن علوم سلولی و مولکولی در سال‌های آینده پیش‌بینی کرد:

۱- شناخت کامل سازمان مولکولی سلول و فرآیندهای زیستی وابسته به آن.

۲- فراهم آوردن امکانات انجام پدیده‌های پیچیدهٔ زیستی از جمله سنتز انواع مختلف پروتئین‌ها، آنزیم‌ها، اسیدهای هسته‌ای و ماکرومولکول‌های دیگر در شرایط آزمایشگاهی.

۳- تغییرات انتخابی در کد ژنتیکی و از آن طریق کاستن و حتّی از میان بردن نواقص و بیماری‌های ژنتیکی در انسان، جانور و گیاه.

۴- امکان تعیین و تغییر جنسیت جنین قبل و بعد از تولد.

۵- ایجاد جنس‌ها و گونه‌های جدید جانداران با تغییر در کدهای ژنتیکی.

۶- کنترل ژنتیکی گونه‌های موردنظر.

۷- فراهم آوردن امکانات بیشتر در زمینه کشت سلول‌ها، بافت‌ها، پیوند بافت‌ها و حتّی اندام‌ها.

۸- به وجود آوردن امکان ساختن نمونه‌های بافتی و اندامی بدن جانوران.

۹- افزودن ظرفیت مغزی انسان و جانوران به منظور گسترش انواع حس، حافظه، قدرت فراگیری، هوش و قدرت سازگاری یا مقابله با محیط زیست، و به احتمال امکان انتقال حافظه.

۱۰- به وجود آوردن ایمنی کامل در انواع جانداران در برابر بیماری‌ها در طول حیات.

1- In Virto fertilization 2- Biogas

۱۱- به‌نژادی گیاهان و جانوران به منظور مقابله با کمبود غذا و گرسنگی در جهان با بهره‌گیری از روش‌های جدید بیوتکنولوژی.

۱۲- ریشه‌کن کردن انواع بیماری‌های بدون علاج امروزی نظیر برخی از بیماری‌های روانی، سرطان‌ها، بسیاری از بیماری‌های ژنتیکی و مانند آن.

سطوح تشکّل[1] در زیست‌شناسی

پیشرفت شناخت دوبارهٔ ترکیب سلولی، بخصوص پیشرفت حاصل از کاربرد روش‌های فیزیک مدرن، نظیر استفاده از نور پلاریزه، تفرق اشعهٔ X و میکروسکوپ الکترونی، اشعه لیزر و مانند آن موجب تغییر اساسی در تفسیر ساختمان‌های سلولی شده است. ساختمان‌های اصلی‌تر زیادی در حد ماکرومولکولی وجود دارند که فراساختمان سلول را می‌سازند. در چنین حدی خود را در قلمرو زیست‌شناسی مولکولی از نقطه نظر بررسی شکل، تجمع، جهت مولکول‌ها و ساختمان‌های بین مولکولی می‌یابیم. چنین مولکول‌هایی در ترکیب و ساختمان سیستم سلولی به صورت مجموعهٔ واحدی شرکت و عمل می‌نمایند. کشف این دنیای زیرمیکروسکوپی[2] که اجزای سازندهٔ آن را ماکرومولکول‌ها، آنزیم‌ها، سوبستراها و متابولیت‌ها تشکیل می‌دهد، به علت این که مجموعهٔ تغییر و تبدیل‌های شیمیایی و انرژی را به وجود می‌آورند و شاخص پدیده‌های حیاتی می‌باشند، اهمیت اساسی دارد.

مطالعات جدید نشان می‌دهد که در درون ماده زنده، ترکیبی از سطوح تشکل که با یکدیگر تداخل کرده‌اند موجود است و از این تداخل تظاهرات حیاتی جاندار نتیجه می‌شود. این مفهوم از سطوح تشکل که به وسیلهٔ نیدهام[3] و پژوهشگران دیگر ایجاد شده، دلیل بر این است که در تمام جهان، چه جهان جاندار و چه بیجان، انواعی از آمیختگی‌ها در سطوح مختلف وجود دارند به طوری که «قوانین یا قواعدی که در یک حد تشکل وجود دارد الزاماً در حدی پایین‌تر از آن یافت نمی‌شود». باید خاطر نشان ساخت که کل، هیچ چیزی از جمع اجزاء را مشخص نمی‌سازد، به طوری که کلرورسدیم خصوصیاتی دارد که در کلر یا در سدیم موجود نیست به همین شکل، خصوصیات ماکرومولکول‌ها (مثلاً گلیکوژن) نمی‌تواند از قبل به وسیلهٔ آنچه که آن را می‌سازد مشخص شود. همین مفهوم می‌تواند در مورد بخش‌های مختلف ساختمانی یک سلول یا در مورد ارتباط تعداد زیادی سلول در یک بافت به کار برده شود.

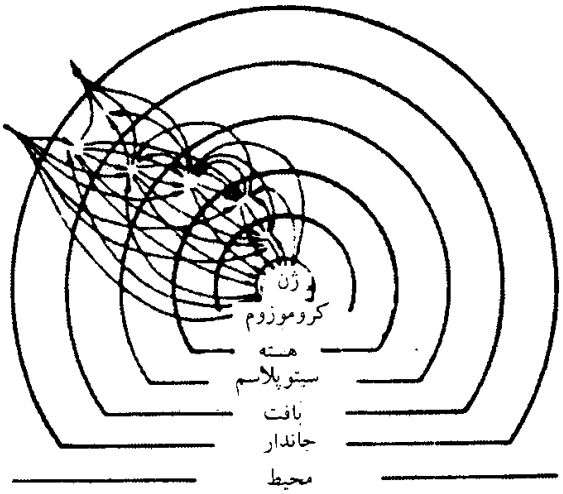
چنین سطوح تشکل یا سازمان‌یافتگی از حد سلول‌ها تا بافت‌ها، اندام‌ها و دستگاه‌ها و رسیدن به یک جاندار پرسلولی پیشرفته وجود دارد. همچنین در جهان جانداران سطوح تشکل گسترده‌تری بین افراد هرگونه، جنس‌ها، تیره‌ها، راسته‌ها، رده‌ها، شاخه‌ها و سلسله‌ها دیده می‌شود.

اجزای سازندهٔ هر سطح سازمان یافته از سطوح تشکیلاتی فوق با یکدیگر و با سطوح سازمان‌یافته قبل و بعد از خود در ارتباط و تأثیر متقابل هستند، همانگونه که کل سطوح سازمان یافتهٔ زیستی نیز با سطوح تشکل جهان بی‌جان در ارتباط و تأثیر متقابل دایمی هستند. برهم کنش متقابل اجزاء همین سطوح سازمان‌یافتگی یکی از عوامل عمدهٔ بروز انواع گوناگونی از پدیده‌های زیستی می‌باشد.

شکل ۱-۱ سطوح مختلف تشکل زیستی را به وسیلهٔ لایه‌های متحدالمرکزی نشان می‌دهد که از درون به یکدیگر وابسته‌اند، هر دایره برای نزدیکترین دایره خود محیط را می‌سازد. شبکهٔ پیکان‌ها که لایه‌های متحدالمرکز را به هم متصل می‌کنند تصوری از برهم‌کنش و وابستگی‌های بین سطوح مختلف تشکل را به دست می‌دهد، که خود

1- Lend of organization 2- Submicroscopic 3- Needham

نشانه‌ای از پیچیدگی‌های اعمال متقابل در درون مادهٔ زنده است.



شکل ۱-۱. لایه‌های متحدالمرکز و از درون وابسته سطوح مختلف تشکل زیستی را نشان می‌دهند (برگرفته از پ. وایس P.Weiss)

بین مادهٔ زنده و بیجان حتّی اگر هر دو از اتم‌های یکسانی ساخته شده باشند اختلاف اساسی وجود دارد. بنا به مفاهیم کنونی، دنیای غیرزنده تمایلی دایمی به سوی تعادلی ترمودینامیک همراه با پراکنش اتفاقی ماده و انرژی دارد، در حالی که ماده زنده به کمک تغییر و تبدیل انرژی که وابسته به مصرف و آزاد شدن دایم ماده و انرژی در آن است مرتبه بالایی از تشکل ساختمانی و عملی را دارد. به بیان دیگر یک دستگاه منفک (بسته) بربنای قوانین ترمودینامیک تمایل دایمی به افزایش آنتروپی تا رسیدن آن به میزان حداکثر دارد در حالی که تغییر و تبدیل انرژی در سلول کنترل شده، تدریجی و منظم است. این نظم اساساً با دخالت کاتالیزورهای حیاتی برقرار می‌شود و از افزایش سریع آنتروپی جلوگیری کرده آنتالپی را می‌افزاید. با درهم ریختن سازمان سلول آنتروپی به مقدار قابل توجهی افزایش می‌یابد و این به مفهوم مرگ سلول است. شرح بیشتری از تغییر و تبدیل انرژی در سلول در فصل بیوانرژتیک آمده است.

واحدهای اندازه‌گیری و اندازه‌ها در زیست‌شناسی سلولی

جدول ۱-۱ حدودی را نشان می‌دهد که مطالعه مجموعه‌های حیاتی را از نظر بُعد از هم جدا می‌کند. تقسیم‌بندی انجام شده نشان می‌دهد که مرزهای بین این سطوح تشکیلاتی تا حد زیادی تداخل داشته و عملاً در ارتباط با حد تفکیک وسایل به کار گرفته شده بودند و به طور قراردادی مشخص شده‌اند. به عنوان مثال چشم آدمی قدرت تشخیص دو نقطه که فاصله آنها کمتر از ۰/۱ میلی‌متر (۱۰۰ میکرومتر) باشد را ندارد. اغلب سلول‌ها خیلی کوچک‌تر از ۱۰۰ میکرومترند، بنابراین بایستی به وسیلهٔ میکروسکوپ نوری که حد تفکیک آن تا حدود ۰/۲ میکرومتر می‌باشد مطالعه شوند، به همین ترتیب، اغلب ساختمان‌های سلولی ابعاد کوچکتری دارند و بایستی با

جدول ۱-۱. قلمروهای مختلف زیست‌شناسی سلولی

بُعد	قلمرو	ساختمان‌ها	روش
۰/۱ میلی‌متر (۱۰۰ میکرومتر) و بیشتر	تشریح	اندام‌ها	چشم و عدسی ساده
۱۰۰ میکرومتر تا ۱۰ میکرومتر	بافت‌شناسی	بافت‌ها	انواع مختلف میکروسکوپ‌های نوری
۱۰ میکرومتر تا ۰/۲ میکرومتر (۲۰۰۰ آنگستروم)	سلول‌شناسی	سلول‌ها، باکتری‌ها	میکروسکوپ با اشعه X
۲۰۰۰ آنگستروم تا ۱۰ آنگستروم	شکل‌شناسی زیر میکروسکوپی فراساختمان زیست‌شناسی مولکولی	مواد متشکله سلولی ویروس‌ها	میکروسکوپ پلاریزان میکروسکوپ الکترونی
کوچک‌تر از ۱۰ آنگستروم	ساختمان مولکولی و اتمی	ترتیب اتم‌ها	تفرق اشعه X

میکروسکوپ الکترونی مشاهده شوند.

از نظر شکل‌شناسی، تمامی این قلمروهای مطالعه در زیست‌شناسی، از یک نظام پیروی می‌کنند و آن تشریح[1] است که از نظر لغوی، دلالت بر جدا کردن قسمت‌های متشکله مختلف به منظور شناسایی و بررسی آنها چه به صورت اجزای جدا از هم (منفک) و چه به صورت قسمت‌هایی تداخل یافته (وابسته به هم) در جاندار کامل دارد. به‌نت[2] با تفسیر روشنی از این مفاهیم، تأیید می‌کند که «تشابه علمی تمامی شاخه‌های تشریح خصوصیات اصلی مشترک را نشان می‌دهند». چه در قلمرو تشریح ماکروسکوپی، میکروسکوپی یا مولکولی کار کنیم، معمولاً مبادرت به جدا کردن اشیاء مورد مطالعه می‌ورزیم. از نظر روش شناسی، تشابه در آن حد است که از اسکالپل برای قطعه‌قطعه کردن یک جسد، از برش‌ها برای بررسی با میکروسکوپ نوری و الکترونی و یا از جدا کردن ساختمان‌های مختلف سلولی به روش همگن‌سازی و سانتریفوگاسیون استفاده می‌کنیم. با داخل شدن در این قلمرو، تفکیک ساختمان‌های مختلف سلولی به مولکول‌ها یا اتم‌های سازندهٔ آنها به کمک وسایل نوری صورت می‌گیرد که از انواع مختلف امواج الکترومغناطیسی استفاده می‌کنند (شکل ۱-۲).

به منظور ساختن تصویری قابل قبول از سازمان مولکولی یک مجموعهٔ حیاتی، ابتدا بایستی ترکیبات اصلی مولکولی آن، مخصوصاً آنهایی را که وزن مولکولی زیادی دارند از جمله اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها را شناخت. لیپیدها گرچه وزن مولکولی کمتری دارند، ولی از نظر مواد متشکله ساختمانی سلول‌ها نقش مهمی دارند.

در شکل ۱-۲ ابعاد سلول‌های مختلف، باکتری‌ها، ویروس‌ها، مولکول‌ها و اتم هیدروژن در مقیاس لگاریتمی نشان داده شده و با طول موج پرتوهای مختلف و همچنین با قدرت تفکیک چشم، میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی مقایسه شده است و در جدول ۱-۲ روابط بین بعضی اندازه‌های طولی و وزن مادهٔ مورد استفاده در محدوده‌های تجزیهٔ شیمیایی نشان داده شده است (جدول ۱-۳).

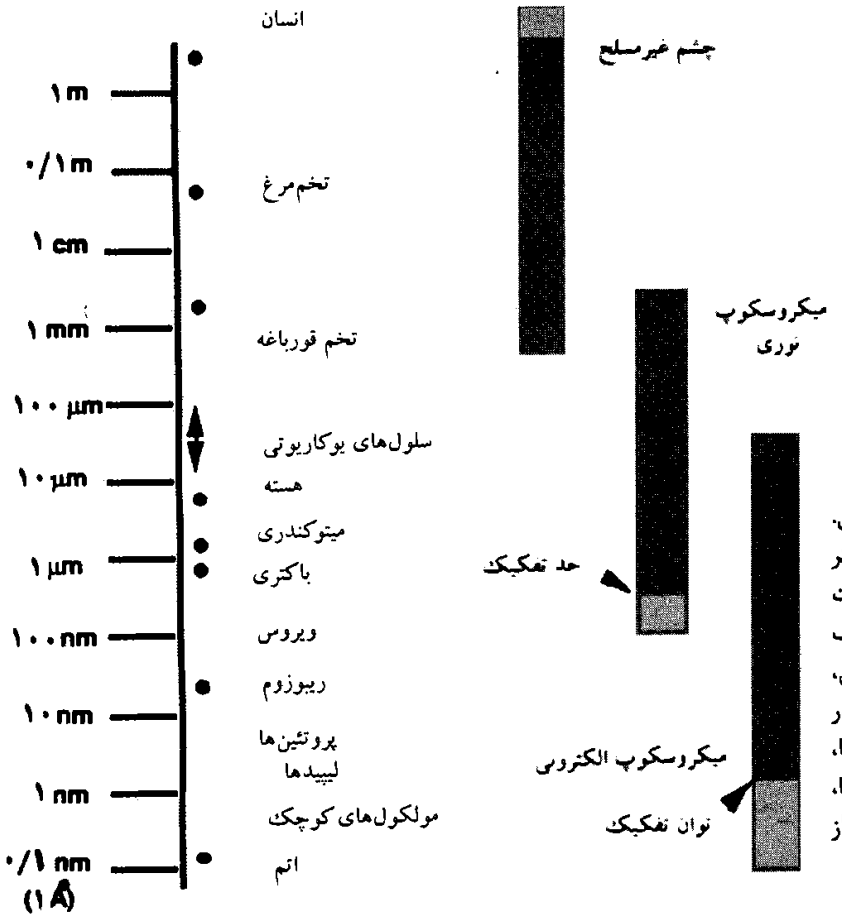
جدول ۱-۲. ارتباطات بین اندازه‌های طول و وزن‌ها در شیمی سلولی

اندازه طولی	وزن	محدوده لغوی
۱ سانتی‌متر	۱g (گرم)	ماکروشیمی
۱ میلی‌متر	۱mg یا 10^{-3}g	میکروشیمی
۱۰۰ میکرومتر	۱μg یا 10^{-6}g	هیستوشیمی
۱ میکرومتر	۱pg یا یک پیکوگرم یا 10^{-12}g	سیتوشیمی

جدول ۱-۳. واحدهای اندازه‌گیری در بافت‌ها و سلول‌ها

10^{-3}μm = 10^{-6}mm = 10^{-7}Å	1mm	
10^{-3}mm = 10^{-7}Å	1μm	10^{-3}mm
1Å	1nm	10^{-3}μm = 10^{-6}mm
	1Å	10^{-1}nm = 10^{-4}μm = 10^{-7}mm
آنگستروم = Å	نانومتر = nm	میکرومتر = μm

1- Anatomy 2- Bennette



شکل ۱-۲. مقیاس لگاریتمی ابعاد میکروسکوپی. هر یک از تقسیمات اصلی اندازه‌ای ۱۰ بار کوچک‌تر از اندازه قبلی خود را مشخص می‌سازد. در سمت چپ، وضعیت طول موج‌های مختلف طیف الکترومغناطیس و حدود تشخیص چشم انسان، میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی. در طرف راست، ابعاد سلول‌های مختلف، باکتری‌ها، PPLO (کوچکترین موجود زنده)، ویروس‌ها، مولکول‌ها و اتم‌ها. (اصلاح شده با برگرفته از M.Beissis).

خاطرنشان سازیم که میکروسکوپ نوری حد تفکیکی حدود ۵۰۰ برابر چشم انسان و میکروسکوپ الکترونی حد تفکیکی تا ۲۰۰۰ برابر میکروسکوپ نوری دارد.

برخی از ساختمان‌های سلولی نظیر میتوکندری‌ها، سانتریول‌ها، کروموزوم‌ها و هستک‌ها را می‌توان با میکروسکوپ نوری بررسی کرد. عدهٔ زیاد دیگری مثل ریبوزوم‌ها، غشاء سیتوپلاسمی، میکروتوبول‌ها و میکروفیلامان‌ها و مانند آن با میکروسکوپ الکترونی قابل بررسی هستند. از طرفی، اغلب ساختمان‌های مولکولی از نظر اندازه از این ساختمان‌های سلولی نیز کوچکترند. به عنوان مثال درازای یک مولکول گلوکز بیش از ۵Å نیست. یک میلیون ذره به بزرگی حدود یک مولکول پروتئینی (۱۰۰Å) لازم است تا به اندازه یک میتوکندری برسیم.

نظریهٔ سلولی

یکی از مفاهیم کلی و اساسی زیست‌شناسی «نظریهٔ سلولی» است که بر بنای آن: همهٔ موجودات زنده (جانوران - گیاهان - تک‌سلولی‌ها) از سلول و فرآورده‌های فعالیت سلول‌ها تشکیل شده‌اند. این نظریه با پژوهش‌های متعدد که در ابتدای قرن نوزدهم توسط پژوهشگرانی چون: میربل[1] (در سال ۱۸۰۲) - اوکن[2] (در سال ۱۸۰۵) - لامارک[3] (در سال ۱۸۰۹) - دوتروشه[4] (در سال ۱۸۲۴) - تورپن[5] (در سال ۱۸۲۶) انجام شد، شکل گرفت و در نهایت منجر به مطالعات شلایدن (در سال ۱۸۳۸) گیاه‌شناس و شوان (در سال ۱۸۳۹) جانورشناس گردید که نظریهٔ سلولی را به صورت مشخصی ارائه کردند. نظریهٔ سلولی تأثیر زیادی بر همه زمینه‌های تحقیقاتی زیستی داشته است، به طوری که بلافاصله پس از طرح آن، مشخص شده که هر سلول از تقسیم سلولی قبل از خود به وجود می‌آید. با پیشرفت

1- Mirbel 2- Oken 3- Lamarck 4- Dutrochet 5- Turpin

علم بیوشیمی نشان داده شد که شباهت‌های اساسی در ترکیب شیمیایی و فعالیت‌های سوخت‌وسازی همهٔ سلول‌ها وجود دارد و فعالیت جاندار روی هم رفته نتیجه مجموع فعالیت‌ها و اعمال متقابل واحدهای سلولی سازنده آن است.

براون (در سال ۱۸۳۱) هسته را به عنوان جزء پایدار و اساسی سلول مطرح کرد. عدهٔ دیگری از پژوهشگران (دوژاردن - شولتز[1] - پورکنژ[2] - فون مول) مطالعات خود را در مورد محتوای سلول که پروتوپلاسم نامیده شد متمرکز ساختند.

بدنبال شکل‌گرفتن این نظریه‌ها و مفاهیم اساسی، دانش سلول‌شناسی پیشرفت سریعی نمود. تغییراتی که ضمن تقسیم سلولی در هسته روی می‌دهند توجه تعداد زیادی از پژوهشگران را بخود جلب کرد. به عنوان مثال پدیدهٔ تقسیم مستقیم[3] توسط رماک[4] و تقسیم غیرمستقیم توسط فلمینگ در جانوران و توسط استراسبورگر در گیاهان کشف شد. این تقسیم در ۱۸۷۸ به وسیلهٔ شلیشر، کاریوکینز نامیده شد. والدیر[5] (در سال ۱۸۹۰) مشخص کرد که اساس میتوز عبارت از تشکیل رشته‌های هسته‌ای یا کروموزوم‌ها و توزیع متساوی آنها بین دو هسته (هسته سلول‌های دختر) می‌باشد.

کشفیات مهم دیگر شامل: لقاح تخمک و ترکیب دو پیش هسته[6] توسط هرت وایک[7] (در سال ۱۸۷۵) وجود سانتروزوم توسط ون‌بندن و بووری[8]، میتوکندری توسط بندا و آلتمن[9] و دستگاه شبکه‌ای توسط گلژی بودند.

پیشرفت و تکامل زیست‌شناسی سلولی در قرن بیستم به دو دلیل عمده می‌باشد:

۱- افزایش حد تفکیک وسایل تجزیه که مهمترین آنها میکروسکوپ الکترونی و فنون مربوط به تفرق اشعه X می‌باشد.

۲- نزدیکی سلول‌شناسی با حوزه‌های دیگر تحقیقات زیستی مخصوصاً با ژنتیک، فیزیولوژی و بیوشیمی که بالاخره منجر به از میان رفتن مرزهای مصنوعی بین این علوم و ایجاد دانشی براساس تشکیلات مولکولی سلول گردید.

سلول‌های پروکاریوت و یوکاریوت[10]

در گروه بزرگی از موجودات زنده (جانوران و اکثر گیاهان) که آنها را یوکاریوت می‌نامیم سلول‌ها دارای سه بخش اصلی‌اند: غشاء سلولی، سیتوپلاسم و هسته.

درگروه دیگری از موجودات زنده که شامل باکتری‌ها - آکتینومیست‌ها - سیانوباکترها می‌باشند، سلول‌ها اغلب کوچکند و بخصوص هسته کاهش یافته‌ای دارند. این گروه از موجودات زنده را پروکاریوت می‌نامند.

بعلت کوچک بودن اندازه پروکاریوت‌ها تا مدت‌ها ساختمان دقیقشان شناخته نشده بود و تنها پس از کاربرد میکروسکوپ‌های الکترونی اختلافات عمده این موجودات زنده با جانداران دیگر مشخص شد.

پروکاریوت‌ها با خصوصیات زیر مشخص می‌شوند

۱- هسته کاهش یافته‌ای دارند که به وسیلهٔ غشاء مشخص احاطه نشده و بیشتر با یک کروموزوم قابل مقایسه است. شیره هسته با سیتوپلاسم آمیخته شده یا با آن تماس مستقیمی دارد.

1- Sholtze 2- Purkinje 3- Amitose 4- Remak 5- Waldeyer
6- Pronucleus 7- Hertwig 8- Boveri 9- Altman 10- Eucaryotes

۲- در پروکاریوت‌ها، میتوکندری و دستگاه گلژی شناخته نشده است.
۳- در سیتوپلاسم آنها گاه دو بخش خارجی و داخلی با ساختمان‌های متفاوت قابل تشخیص می‌باشد.
۴- اکثر آنها به وسیلهٔ دیواره اسکلتی محکمی احاطه شده‌اند.

ویژگی‌های عمده سلول‌های پروکاریوت و یوکاریوت در جدول ۱-۴ خلاصه شده است.

کشف ویروس‌ها در آخر قرن نوزدهم آگاهی جدیدی از موجودات بسیار ابتدایی است. ویروس‌ها که در آغاز به وسیلهٔ خاصیت عبورشان از صافی‌های چینی و تغییرات بیماریزایی که در سلول‌ها ایجاد می‌کنند شناخته شدند، امروز چه از نظر شکل‌شناسی و چه از نظر سازمان ماکرومولکولی مستقیماً به وسیلهٔ میکروسکوپ الکترونی بررسی می‌شوند. گرچه ویروس‌ها برخی پدیده‌های مشترک در موجودات زنده مثل وراثت، جهش و خودزایشی را دارند اما فعالیتشان در شرایط طبیعی وابسته به حیات سلول‌های میزبان است و به دلیل حالت انگلی که دارند به دشواری می‌توان آنها را به عنوان ابتدایی‌ترین موجودات سازمان یافته منظور داشت[1].

به منظور امکان مقایسه روشن‌تری از ساختمان سلول‌های پروکاریوت و یوکاریوت ابتدا به شرح خلاصه برخی نمونه‌های پروکاریوتی و سپس به بررسی خصوصیات کلی سلول‌های یوکاریوتی می‌پردازیم.

میکوپلاسماها[2]

میکوپلاسماها کوچکترین واحدهای زنده شناخته شدهٔ پروکاریوتی هستند. ریزترین آنها حدود ۱۰۰۰ آنگستروم می‌باشد. این جانداران که برای اولین بار در سال (۱۸۹۲) توسط ایوانوفسکی[3] از خاک جدا شدند، قادرند از صافی‌های باکتریایی عبور کنند.

بعدها به دلیل نقش بیماریزایی که برخی گونه‌های این جانداران در ایجاد عفونت‌های ریوی داشتند آنها را شبه پلورونمونیا[4] نامیدند. هم‌اکنون نمونه‌های زیادی از میکوپلاسماها که برای انسان، جانوران و گیاهان بیماریزا هستند، شناخته شده و فراساختمانشان با میکروسکوپ‌های الکترونی بررسی شده است. برای مثال در نمونه میکوپلاسما گالیسپتیکوم[5] (شکل ۱-۳) فراساختمان زیر دیده می‌شود:

دو لایه فسفولیپوپروتئینی جدار خارجی سلول را تشکیل می‌دهد.

درون سیتوپلاسم، DNA با دو رشته طویل مارپیچی و دارای پیچیدگی مشخص است.

مولکول‌های RNA به صورت رشته‌های کوتاه و ریبوزوم‌ها به صورت ذرات کروی بزرگ و مولکول‌های پروتئینی به صورت ذرات متنوع پراکنده دیده می‌شوند.

سلول باکتری

یک سلول باکتری نظیر اشرشیاکولی براحتی در محلول آبکی واجد گلوکز و تعدادی از یون‌های غیرآلی کشت داده می‌شود. توده سلولی در چنین محیطی حدود هر شصت دقیقه یک بار تقسیم و مضاعف می‌گردد. این زمان با افزودن بازهای پورین و پیریمیدین که مولکول‌های پیش‌ساز اسیدهای نوکلئیک‌اند به بیست دقیقه کاهش می‌یابد. شکل ۱-۴ باسیل کولی را نشان می‌دهد که درازای آن حدود ۲۰۰۰۰ آنگستروم و ضخامتش حدود ۸۰۰۰

۱- با توجه به آگاهی‌های کنونی از ویروس‌ها، آنها را به عنوان ساده‌ترین موجودات زنده در نظر می‌گیرند و شرایط کشت آزمایشگاهی (in vitro) آنها نیز فراهم شده است.

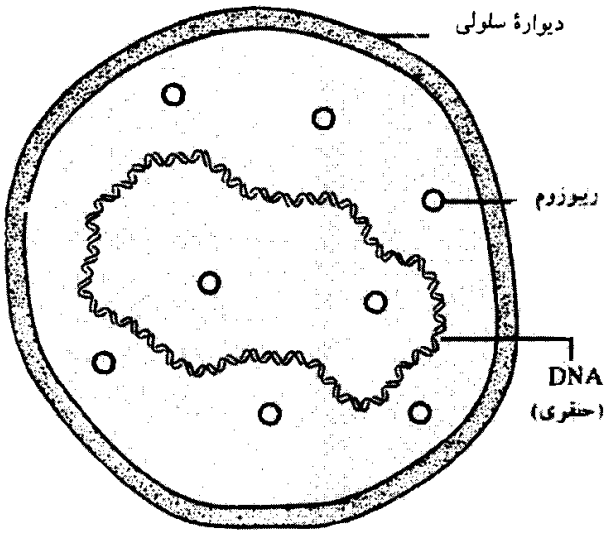
2- Mycoplasma 3- Ivanofsky 4- P.P.L.O.(Pleuro Penomonia Like Organisme)
5- Mycoplasma - gallisepticum

جدول ۱-۴. ویژگی‌های عمده سلول‌های پروکاریوت و یوکاریوت

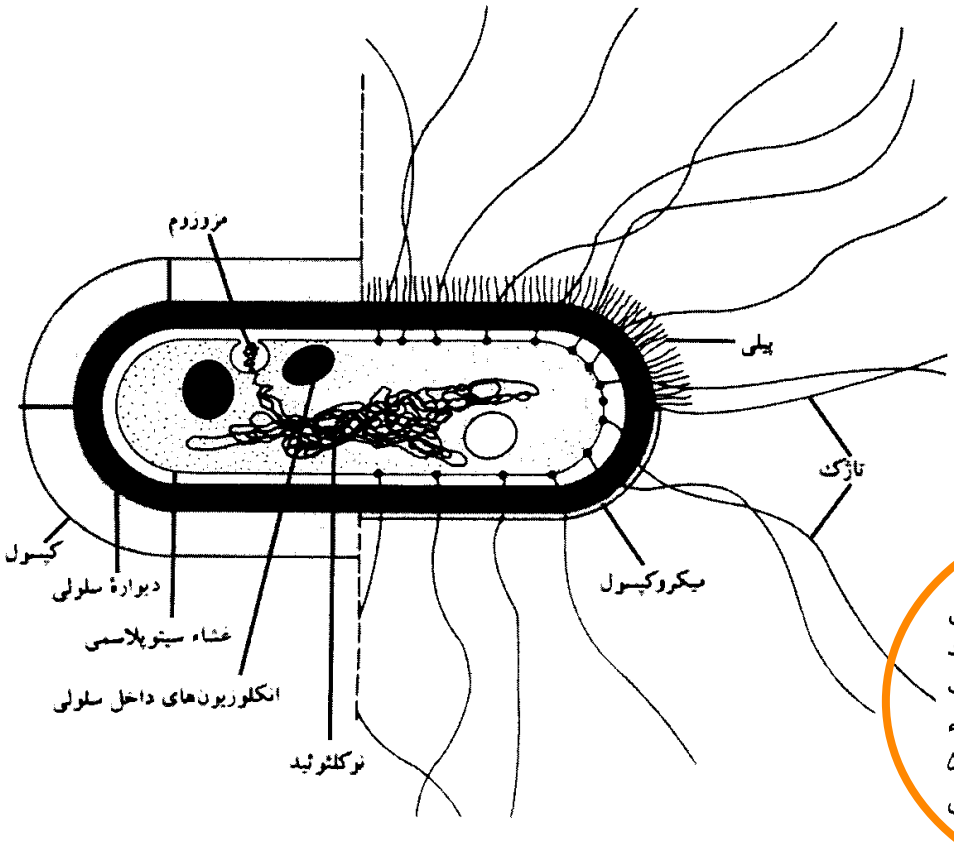
	سلول‌های پروکاریوت	سلول‌های یوکاریوت
فضای هسته DNA	میکوپلاسماها - باکتری‌ها - سیانوباکترها ندارند حلقوی (بسته) - به حالت نوکلئوئیدی همراه با پروتئین‌های شبه هیستونی	تک سلولی‌ها - جلبک‌ها - گیاهان و جانوران پرسلولی دارای فضای مشخصی در اطراف هسته می‌باشند. در میتوکندری و کلروپلاست مانند پروکاریوت‌ها در هسته به حالت ترکیب با پروتئین‌های هیستونی و غیرهیستونی
ژنوم DNA	از نوع چندژنی (پلی سیسترونی)	از نوع تک ژنی (مونوسیسترونی)
کروموزوم	منفرد	چند کروموزوم با شکل‌های مختلف
تقسیم	ساده (دوتایی)	میتوز - میوز
سیستم غشاء درونی	ندارند	دارند (در اندامک‌هایی مثل میتوکندری - گلژی شبکه آندوپلاسمی - پلاست‌ها و مانند آن)
میتوکندری	ندارند (آنزیم‌های تنفسی در غشاء سلول هستند)	دارند (آنزیم‌های تنفسی درونی در میتوکندری هستند)
کلروپلاست	ندارند	تنها در سلول‌های گیاهان سبز وجود دارد
ریبوزوم	۷۰S (۳۰S + ۵۰S)	در سیتوپلاسم ۸۰S (۴۰S + ۶۰S) در میتوکندری‌ها و پلاست‌ها ۷۰S
هسته‌ک	ندارند	دارند
سانتریول	ندارند	دارند (جز در سلول‌های گیاهان عالی)
دیوارهٔ اسکلتی	معمولاً دارای دیواره اسکلتی سخت و محکم‌اند	جز در اکثر سلول‌های گیاهی در بقیه سلول‌های یوکاریوت وجود ندارد
جریان پلاسمایی	ندارند	دارند
شبکهٔ ER	ندارند	دارند
دیکتیوزوم	ندارند	دارند
واکوئل‌ها	(برخی دارای واکوئل گازی)	دارند
رنگدانه‌ها	کلروفیل باکتری + کلروفیل a + فیکوبیلین	انواع مختلفی از کلروفیل‌ها + کلروئوئید و مانند آن
فتوسنتز	در باکتری‌ها بدون تولید اکسیژن	با تولید اکسیژن
میزوزوم	دارند	ندارند
مواد اصلی	موراین	پکتین‌ها
دیوارهٔ سلولی	لیپوپروتئین لیپوپلی ساکارید	همی‌سلولز سلولز
ژن	اغلب از زنجیرهای پروتئین درهم پیچیده هستند	از ۱ + ۹ جفت میکروتوبولی

آنگستروم است.

این سلول به وسیلهٔ دیواره سختی احاطه شده که حدود ۱۰۰Å ضخامت دارد و از مولکول‌های پروتئینی - لیپیدی و پلی ساکاریدی ساخته شده است. سطح داخلی این دیواره به وسیلهٔ یک غشاء سلولی حقیقی یا پلاسمالم پوشیده شده که ساختمان لیپوپروتئینی دارد و سد مولکولی را در مقابل محیط می‌سازد. این غشاء با کنترل ورود و خروج مولکول‌های کوچک و یون‌ها، برقراری محیط داخلی خاصی را برای پروتوپلاسم سلول باکتری موجب می‌شود. جالب است خاطر نشان سازیم که آنزیم‌های مربوط به اکسیداسیون متابولیت‌ها و آنزیم‌های زنجیر تنفسی به طور تنگاتنگی با این غشاء پلاسمایی در ارتباطند.



شکل ۱-۳. دیاگرام میکوپلاسما گالسپکتیکوم (Mycoplasma gallespecticum)

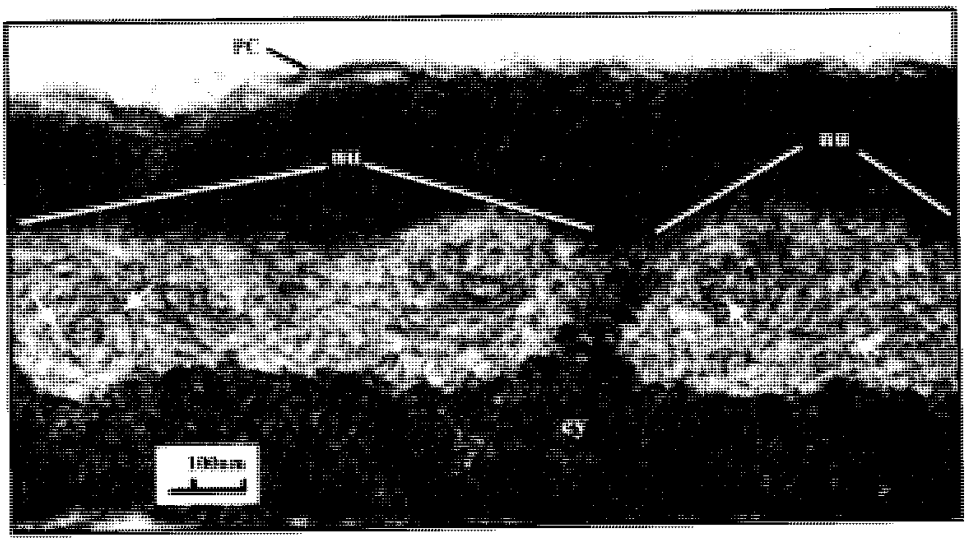


شکل ۱-۴. نمایی از باسیل کولی (E.coli) دارای دو کروموزوم (بعد از همانندسازی) به درازای یک میلیمتر (10^{7}Å) که به غشاء سلولی چسبیده‌اند. ارزش‌های ۵۰S و ۳۰S مربوط به زیر واحدهای ریبوزومی است.

در سلول‌های یوکاریوتی این آنزیم‌های تنفسی، خاص برخی اندامک‌های سیتوپلاسم یعنی میتوکندری‌ها هستند. با میکروسکوپ الکترونی (شکل ۱-۵) سلول باکتری نواحی روشنی را نشان می‌دهد که گاهی نوکلئوئید[1] (شبه هسته) نامیده می‌شود.

در این نواحی کروموزوم باکتری جای گرفته که تنها از یک مولکول حلقوی اسید دزوکسی ریبونوکلئیک (DNA)

1- Nucleoide



شکل ۱-۵. تصویر گرفته شده با میکروسکوپ الکترونی از باسیل کولی. رشته‌های بسیار کوچک DNA (فلش‌ها) در نوکلئوئید (nu) دیده می‌شود. نبودن غشاء در اطراف نوکلئوئید را خاطرنشان می‌سازیم. سیتوپلاسم (cy) خیلی متراکم است. pc = دیواره سلولی (× ۱۰۰۰۰۰)

ساخته شده است. این مولکول DNA که حدود یک میلی‌متر (10^7Å) طول دارد، واجد تمام اطلاعات ژنتیکی این جاندار است. بعلاوه این مولکول در سیتوپلاسم قرار دارد و از آن به وسیلهٔ غشاء هسته که خاص یوکاریوت‌هاست جدا نشده است. نواحی تیره‌تر پروتوپلاسم که DNA را احاطه می‌کنند واجد ۲۰۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰ ذره کوچکند که قطرشان حدود (۲۰۰Å) است و آنها را ریبوزوم می‌نامند که از اسید ریبونوکلئیک (RNA) و پروتئین‌ها ساخته شده‌اند. این ریبوزوم‌ها محل سنتز پروتئین‌ها هستند و هر یک از یک بخش بزرگ‌تر و یک بخش کوچک‌تر (زیر واحد بزرگ‌تر و زیر واحد کوچکتر) ساخته شده‌اند. ریبوزوم‌ها می‌توانند به صورت گروه‌هایی که آنها را پُلی‌زوم[1] نامند مجتمع شوند. بقیه سلول باکتری از آب، مولکول‌های RNA، پروتئین‌ها (که شامل آنزیم‌ها نیز می‌شوند) و مولکول‌های کوچک‌تر مختلفی تشکیل می‌شود.

یک باسیل کولی به تنهایی دارای ۳۰۰۰ تا ۶۰۰۰ نوع مختلف از مولکول‌هاست. مولکول DNA این باکتری دارای اطلاعات ژنتیکی کافی برای رمزدار کردن ۲۰۰۰ تا ۳۰۰۰ پروتئین مختلف است.

به طور کلی در مقایسه با سلول‌های یوکاریوت، دیواره اسکلتی که در باکتری‌ها جنس متفاوتی دارد، از چند لایهٔ قابل ارتجاع ساخته شده و بخش داخلی آن بیشتر موکوپپتیدی است. غشاء سلولی باکتری‌ها مخصوصاً از پروتئین‌ها ساخته شده که با لیپیدها و گاهی با گلوسیدها مشترک شده‌اند در این غشاء لیپیدها با مقدار و تنوعی کمتر از غشاء سلولی یوکاریوت‌ها یافت می‌شوند.

غشاء سلولی باکتری‌ها که شامل آنزیم‌های مختلف بخصوص پرمه‌آزها[2] و آنزیم‌های لازم در اکسیداسیون‌های درون سلولی است، شباهت زیادی به غشاء داخلی میتوکندری‌ها دارد، سیتوپلاسم باکتری‌ها که ریبوزوم‌های فراوانی دارد، فاقد دستگاه گلژی و شبکهٔ درون سیتوپلاسمی مشخص است. هسته باکتری‌ها که فاقد غشاء و هستک است از یک رشته مارپیچی DNA بدون هیستون‌ها ساخته شده و بیشتر شبیه یک کروموزوم است. طول این رشته تا هزار برابر اندازه باکتری می‌رسد بنابراین به طور چین‌خورده‌ای، در درون باکتری جای گرفته است. در برخی موارد این رشته مارپیچی با بخش چین‌خورده‌ای از غشاء سلولی که آن را مزوزوم نامند، در ارتباط است. بررسی‌های جدید وجود تا ۸۰ ناحیه اتصال بین زنجیره‌ای از DNA باکتری را با پروتئین‌های ویژه غشایی نشان داده است که این پروتئین‌ها به پروتئین‌های ویژه دیواره‌ای اتصال دارند. بعد از همانندسازی کروموزوم باکتری، مزوزوم

1- Polysome 2- Permeases

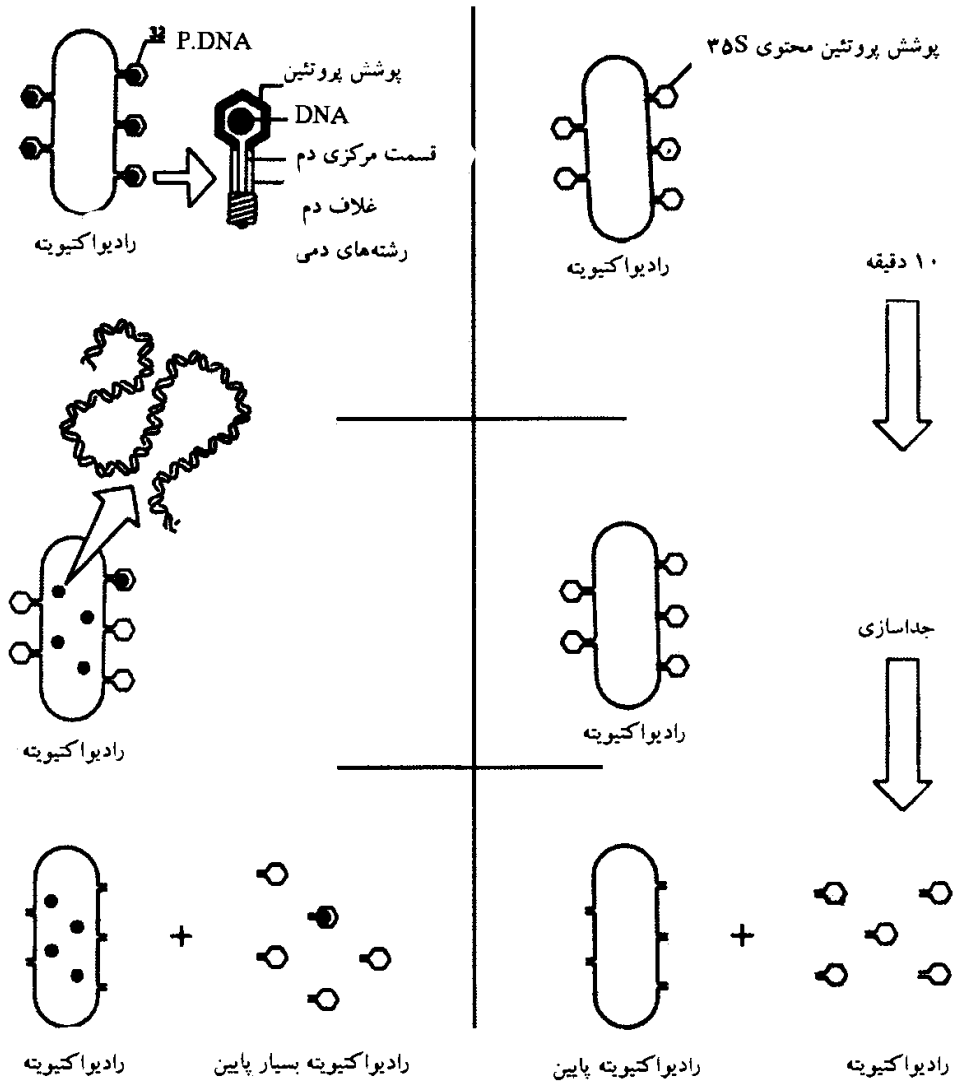
مضاعف می‌شود و رشد دیوارهٔ باکتری بین دو مزوزوم در نهایت منجر به جدا شدن دو باکتری می‌شود.

ویروس‌ها اساساً از پروتئین و اسیدهای نوکلئیک تشکیل یافته‌اند. اسید نوکلئیک ویروس‌ها براساس نوع ویروس می‌تواند DNA و یا RNA باشد. پروتئین‌ها، پوششی در اطراف ویروس‌ها به وجود آورده و مغز اسید نوکلئیکی را احاطه می‌کنند. هرشی[1] و چیس[2] در سال ۱۹۵۲ یک سری آزمایش‌ها برای پی‌بردن به حقیقت انتقال وراثت به وسیلهٔ پروتئین‌های ویروسی و یا اسید نوکلئیک آنها انجام دادند. هرشی و چیس باکتری کولی باسیل و باکتریوفاژ T_2 (نوعی ویروس حاوی DNA که کولی‌باسیل را آلوده می‌کند) را در دو سری از آزمایش‌ها به کار گرفتند. در یک سری از آزمایش‌ها، کولی‌باسیل در محیطی حاوی ایزوتوپ گوگرد رادیواکتیو کشت داده شد. در طی رشد جمعیت باکتری، ^{35}S به سلول‌ها وصل شد. بعداً این سلول‌ها به وسیلهٔ باکتریوفاژ T_2 آلوده شدند و طی تکثیر باکتریوفاژها در سلول‌های میزبان، ^{35}S باکتریایی برای ساخت پروتئین فاژ T_2 مورد استفاده قرار گرفت (یعنی S به اسید آمینه‌های سیستئین و متیونین وصل شد). اسیدهای نوکلئیک فاقد اتم گوگرد هستند. پس از لیز شدن باکتری‌ها ویروس‌های حاوی ^{35}S جمع‌آوری شده و برای آلوده کردن کولی‌باسیل‌های موجود در محیط عاری از ^{35}S به کار برده شدند. بعداً با استفاده از یک خردکن وارینگ کپسید ویروس‌های متصل به سطح باکتری‌های میزبان به طور فیزیکی رها شدند. سپس با استفاده از سانتریفوژ باکتری‌ها را از ویروس‌های رها شده جدا کردند. مقایسه‌ای از گوگرد رادیواکتیو موجود در باکتری‌های رسوب شده و ویروس‌های رسوب نشده معلوم کرد که تقریباً همهٔ گوگرد رادیواکتیو در کپسید ویروس‌ها باقی مانده و به سیتوپلاسم باکتری وارد نشده است. در آزمایش‌های دیگر، کولی‌باسیل پیش از آلوده‌شدن با فاژ در محیط غذایی حاوی رادیو ایزوتوپ ^{32}P قرار داده شد. اسیدهای نوکلئیک حاوی مقدار زیادی فسفر است بنابراین ^{32}P به DNA تازه ساخته شده ویروسی ملحق می‌شود. هنگامی که این ویروس‌های نشاندار برای آلوده‌کردن باکتری‌های دیگر مورد استفاده قرار گرفته و سپس به وسیلهٔ خردکن وارینگ کپسید ویروس‌های متصل به سلول رها شدند ^{32}P در داخل سلول های آلوده یافت شدند. در شکل ۱-۶ دو سری آزمایش ترسیم شده است. هرشی و چیس نتیجه‌گیری کردند که DNA ویروس وارد سلول آلوده می‌شود بدین معنی که برای تکثیر قطعات هم شکل ویروسی از طریق ماشین متابولیکی سلول میزبان وجود DNA ویروسی ضروری است.

مشاهدات هرشی و چیس یافتهٔ پیشین آندرسون[3] و هریوت[4] را نیز توضیح داد. براساس یافتهٔ آندرسون و هریوت اگر سوسپانسیون فاژ T_2 را پیش از مخلوط کردن با محیط کشت باکتری در آب مقطر قرار دهیم قدرت تولیدمثلی خود را از دست خواهد داد. اگرچه چنین ویروس‌هایی قدرت حمله به باکتری‌ها را دارند، اما شوک اسمزی در اثر قرار گرفتن در آب مقطر باعث تخلیهٔ اسیدهای نوکلئیک آنها به محیط اطراف می‌شود. بنابراین، بایستی اسید نوکلئیک به داخل باکتری تزریق شود تا اجازهٔ تکثیر را به ویروس بدهد.

ویروس موزائیک توتون (TMV) که برگ‌های توتون را آلوده می‌کند به جای DNA دارای RNA است. در سال ۱۹۵۰ فرانکل - کونرات[5] RNA و پروتئین را از TMV جدا کرد، ملاحظه کرد که در صورت تزریق RNA خالص به برگ‌های توتون، گیاه آلوده شده و قطعات ویروسی جدید حاوی RNA و پروتئین را تولید خواهند کرد. همچنین فرانکل - کونرات دریافت که اگر پروتئین جدا شده از یک زیرگونه TMV با RNAهای جدا شده از زیرگونهٔ دیگر آن مخلوط بشوند، نوعی ویروس دو رگه با قدرت حمله به برگ‌های توتون تولید خواهند کرد. ویروس‌های جدید حاصل از آلودگی توتون با ویروس دو رگه جدا شد، و پروتئین‌ها و RNA آنها تجزیه شد و معلوم شد که نوع پروتئین موجود در پوشش این ویروس‌های جدید شبیه ویروس‌های تأمین کنندهٔ RNA ویروس‌های دو رگه است

1- A.D. Hershey 2- M.W. Chase 3- T.F. Anderson 4- R.M. Herriott 5- Frankel - Conrat

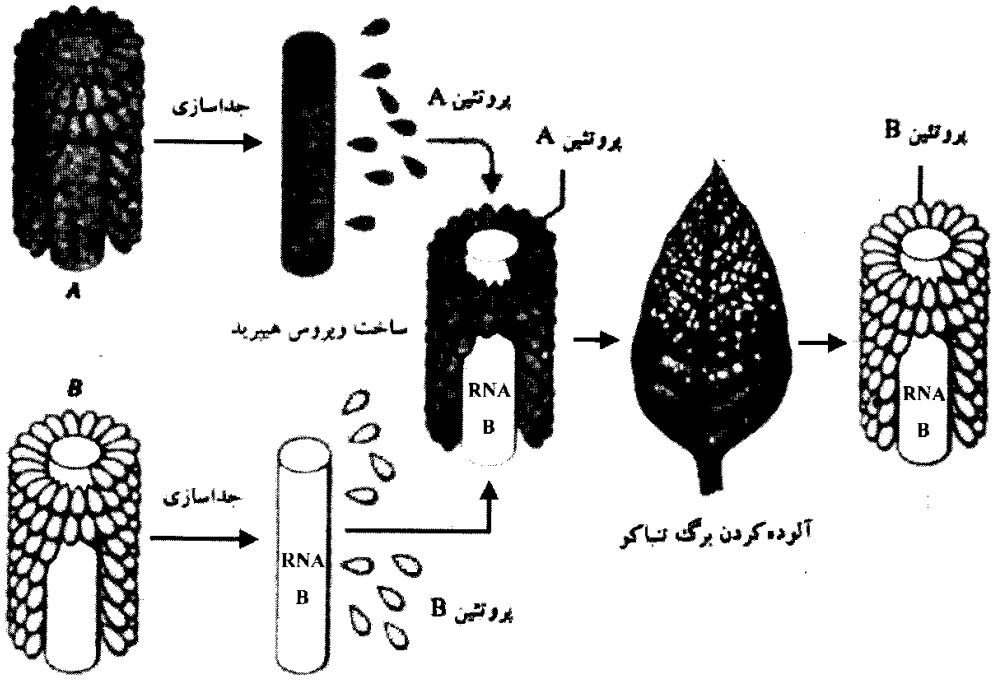


شکل ۱-۶. آزمایش‌های هرشی و چیس

(شکل ۱-۷). به عبارت دیگر شکل پروتئین ویروس‌های جدید شبیه پروتئین‌های هیبرید آلوده‌کنندهٔ برگ‌ها نیست. این مشاهدات از نتیجه‌گیری‌های قبلی در مورد نقش وراثتی اسیدهای نوکلئیک پشتیبانی کرده و همچنین دارا بودن اطلاعات جهت تعیین طبیعت پروتئین‌های تازه ساخته شده را توسط این مولکول ثابت می‌کند.

اگرچه مستقیم‌ترین دلیل برای اثبات نقش DNA (و یا در بعضی ویروس‌ها RNA) به عنوان مادهٔ اصلی وراثت از مطالعه بر روی سیستم‌های میکروبی به دست آمده لکن مشاهدات تأیید کنندهٔ این حقیقت در موجودات عالی‌تر نیز انجام شده است. براساس مطالعات فراوانی که در مورد مکانیسم لقاح به وسیلهٔ هرت ویگ[1] (۱۸۶۵)، فول[2] (۱۸۷۷)، استراسبورگر (۱۸۸۴)، ویزمن[3] (۱۸۹۲) و ویلسون[4] (۱۸۹۵) انجام گرفته، تقریباً با شروع قرن حاضر دخالت کروموزوم‌های داخل هسته‌ای در انتقال وراثت پذیرفته شده است. توسعهٔ واکنش‌های رنگ‌آمیزی (واکنش‌های فولگن) اختصاصی DNA و نیز تعیین محل استقرار DNA در روی کروموزوم نقش وراثتی DNA را بیان می‌کند. دلایل بیشتری در دههٔ ۱۹۴۰ از تجزیه‌های کمی DNA موجود در مقادیر مشخصی از سلول‌ها (یعنی تعداد، وزن خشک و مانند آن) به دست آمد. نتیجهٔ این اندازه‌گیری‌ها معلوم کرد که مقدار DNA در هر سلول از بافت‌های جانوری تقریباً ثابت است. به علاوه معلوم شد که DNA موجود در هستهٔ سلولی به پلوئیدی (به تعداد

1- O. Hertwig 2- H. Fol 3- A. Weisman 4- E.B. Wilson



شکل ۱-۷. آزمایش‌های فرانکل - کونرات که نشان می‌دهد RNA مادهٔ وراثتی ویروس موزائیک تنباکو است نه پروتئین (برای جزئیات بیشتر به متن مراجعه کنید).

سری‌های کامل کروموزومی) آن ارتباط دارد. DNA گامت‌های (اسپرم‌ها و سلول‌های تخم‌زا) موجودات زنده به اندازهٔ نصف سلول‌های سوماتیک است و هنگامی این حقیقت قابل انتظار است که DNA به عنوان مادهٔ وراثتی انجام وظیفه کند.

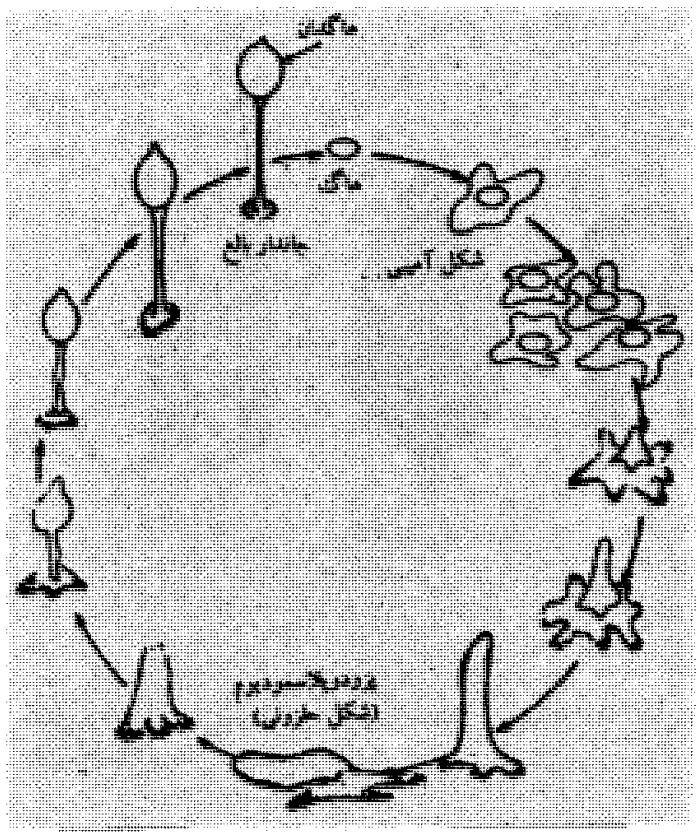
اگرچه RNA مادهٔ وراثتی بعضی ویروس‌ها است اما هیچ دلیلی مبنی بر نقش مشابه آن در سلول‌ها موجود نیست. RNA به عنوان میانجی بین اطلاعات وراثتی DNA و بیانگر این اطلاعات برای ساخت آنزیم‌ها و سایر پروتئین‌های سلولی انجام وظیفه می‌کند. بیشتر DNA سلول‌های یوکاریوت در هسته قرار دارد با وجود این بعضی اندامک‌ها (مانند میتوکندری و کلروپلاست) نیز دارای DNA هستند. پیش از کشف چگونگی تغییر نسبت این دو اسید نوکلئیک و مکانیسم تعیین‌کنندهٔ DNA به عنوان مادهٔ وراثتی بهتر است ابتدا این دو ماکرومولکول از نظر شیمیایی مورد بحث قرار بگیرد.

پیوستگی سلول‌ها

گرچه موجودات تک‌یاخته درجه تمایز ساختمانی قابل ملاحظه‌ای از خود نشان می‌دهند اما از نظر امکانات زیستی محدودیت‌هایی نیز برای ادامه حیات آنها وجود دارد. در این موجودات کلیه اعمال حیاتی تنها در یک سلول انجام می‌گیرد. در نتیجه کوچکترین عارضه‌ای از قبیل سوراخ شدن غشاء سیتوپلاسمی و مانند آن، موجب مرگ آنها می‌شود. این قبیل محدودیت‌ها برای موجودات عالی پرسلولی علیرغم این که در این جانداران هم سلول‌ها شکل، اندازه و حدود معینی دارند، کمتر است؛ زیرا اعمال زیستی آنها بین سلول‌ها و بافت‌های به هم پیوسته بدنشان تقسیم گردیده و هر گروهی از سلول‌ها و بافت‌ها کار مشخصی را بعهده دارند. بدین جهت موجودات پرسلولی با داشتن اختصاصات مذکور در برابر عوارض محیطی ایمنی بیشتری نسبت به تک‌یاختگان پیدا می‌کنند.

برای بررسی پیوستگی سلول‌ها به یکدیگر و رفتارهای سلولی، نوعی کفک لعابی به نام دیکتیوستلیوم[1] را مورد بررسی قرار می‌دهیم:

کفک‌های لعابی تحت عنوان قارچ‌های متحرک و حتّی تک‌یاختگان نیز رده‌بندی می‌شوند. آنها سلول‌های حقیقی گیاهی نیستند. زیرا عمل فتوسنتز را انجام نمی‌دهند. این موجودات تحرک زیادی ندارند و تنها در جاهایی که مواد غذایی وجود دارد، مثلاً در روی سبزیجات در حال فساد رشد و تکثیر می‌یابند. دیکتیوستلیوم دارای دورهٔ زندگی خاصی است که شامل مراحل پیوستگی سلول‌ها به یکدیگر و حرکت سلولی آمیبی می‌باشد (شکل ۱-۸).



شکل ۱-۸. چرخه زندگی کفک لعابی (دیکتیوستلیوم)

هنگامی که هاگ‌های این موجود در محیط دارای شرایط زندگی مناسب قرار گیرند. رویش یافته از هر هاگ، سلولی آمیبی شکل آزاد می‌گردد. این سلول‌ها از باکتری‌های محیط خود تغذیه می‌کنند و در صورت موجود بودن ذخیره غذایی کافی، رشد کرده و تقسیم می‌شوند. این کیفیت تا حد تشکیل یک لایه سلولی مستقل ادامه می‌یابد و هنگامی که جمعیت سلولیِ هر لایهٔ مستقل به اندازه کافی زیاد شد، لایه‌های سلولی متعدد جهت چسبیدن به یکدیگر به سوی هم جلب می‌شوند. مطالعات بونر[2] (در سال ۱۹۶۹) نشان داد که از بین هر ۲۰۰ الی ۳۰۰ سلول آمیبی شکل، یک سلول، ماده‌ای به نام آکرازین[3] از خود ترشح می‌کند که باعث تحریک و جلب سلول‌ها و سرانجام چسبندگی ورقه‌های سلولی به یکدیگر می‌شود. مطالعات بیشتر نشان داده است که آکرازین‌ها، ترکیب آدنوزین منوفسفات چرخه‌ای (CAMP)[4] از ترکیبات اسیدهای هسته‌ای می‌باشند. این مراکز چسبیده به هم سلولی هنوز متحرک بوده و طول آنها ممکن است به بیش از ۲ میلیمتر هم برسد. سرانجام ورقه‌های سلولی به صورت توده‌های متراکمی به نام لیسه (لیسک) یا پلاسمودیوم[5] در می‌آیند. در این هنگام حرکت سلولی قطع می‌شود. لیسه تدریجاً قد می‌کشد و سلول‌های پیشین هر لیسه پایه‌ای را می‌سازند که در یک غلاف سلولزی پوشیده شده است.

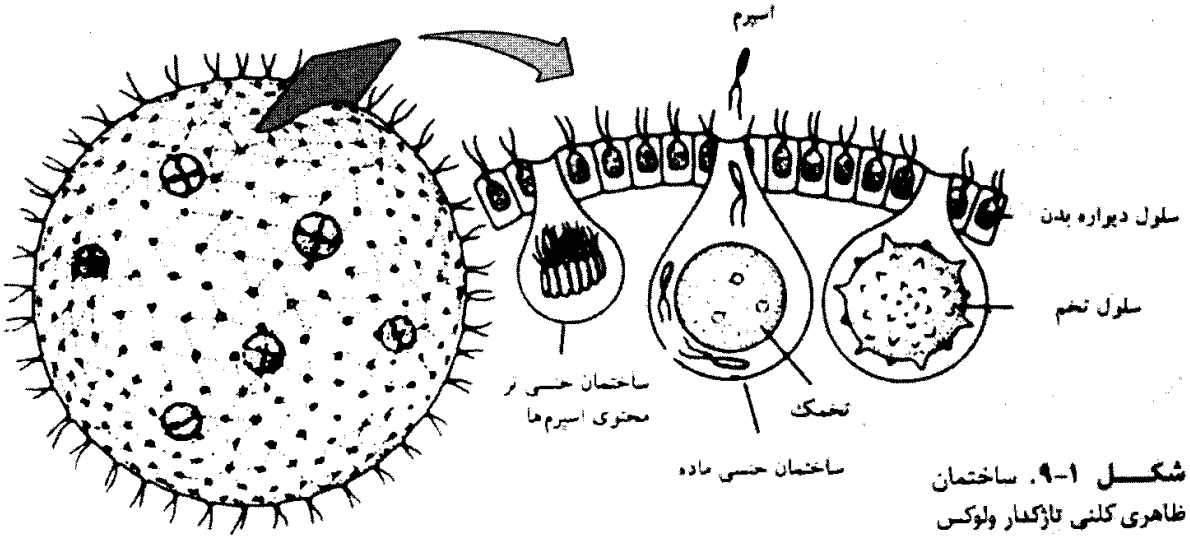
پایه بر اثر تکثیر سلول‌ها رشد کرده و سلول‌های انتهایی آن، ایجاد تودهٔ سلولی کروی شکلی به نام ساختمان شبه هاگدان می‌نماید که درون آن هاگ‌ها بتدریج تمایز می‌یابند. این چرخه‌زندگی به ترتیب مذکور دوباره تکرار می‌شود.

یادآوری می‌شود که در کفک‌ها یکی دیگر از راه‌های تکثیر، تشکیل زئوسپورهای تاژکدار و متحرک است. زئوسپورها با از دست دادن تاژک‌ها ثابت شده به هم می‌پیوندند و ایجاد پلاسمود جدید می‌کنند.

اجتماعات و پیوستگی سلولی ساده در بعضی از تک یاختگان نیز دیده می‌شود. نمونه‌ای از این موجودات، یک

1- Dictyostlium 2- Bonner 3- Acrasin 4- Cyclic adenosine monophosphate
5- Plasmodium = slug

نوع تاژکدار آب شیرین به نام ولوکس[1] است. هر مجموعهٔ سلولی ولوکس از یک کرهٔ توخالی تشکیل می‌شود که اندازه آن در حدود برجستگی یک ته سنجاق ته‌گرد است. هر توده سلولی از ۵۰۰ الی ۵۰۰۰ سلول که در یک ماده ژلاتینی قرار گرفته‌اند تشکیل می‌شود. هر سلولی از کلنی ولوکس دارای هسته، سیتوپلاسم، یک کلروپلاست و یک لکه‌چشمی و دو تاژک است که باعث تحرک سلول می‌شوند. هر سلولی به سلول‌های مجاور خود به وسیلهٔ رشته‌های سیتوپلاسمی متصل می‌شود و تاژک‌ها به سمت خارج لایه ژلاتینی که توده سلولی را احاطه کرده است، امتداد می‌یابند (شکل ۱-۹).



شکل ۱-۹. ساختمان ظاهری کلنی تاژکدار ولوکس

کلنی ولوکس به صورت یک موجود واحد عمل می‌کند و سلول‌های آن با یکدیگر هماهنگی دارند. بدین معنی که توده سلولی ولوکس به هنگام شنا همیشه به یک سمت حرکت می‌کند. تاژک‌ها نقش مهمی را در حرکات و ضربه‌های هماهنگ بعهده دارند.

با حذف عوامل هماهنگ کننده حرکات مژک‌ها، ولوکس حرکات نامنظمی خواهد داشت.

در نمونه‌های پیشرفته‌تر برای مثال در کاهوی دریایی[2] که نوعی جلبک سبز آبزی است، پیوستگی دو لایه سلولی سازنده پیکر گیاه علاوه بر آب به وسیلهٔ یک تودهٔ موسیلاژی تأمین می‌شود. مجموعه دو لایه سلولی و موسیلاژ بین و اطراف آنها، ایجاد ورقه نازکی به نام ریسه[3] می‌نماید، که حدود ۳۰ سانتی‌متر طول دارد (شکل ۱-۱۰).

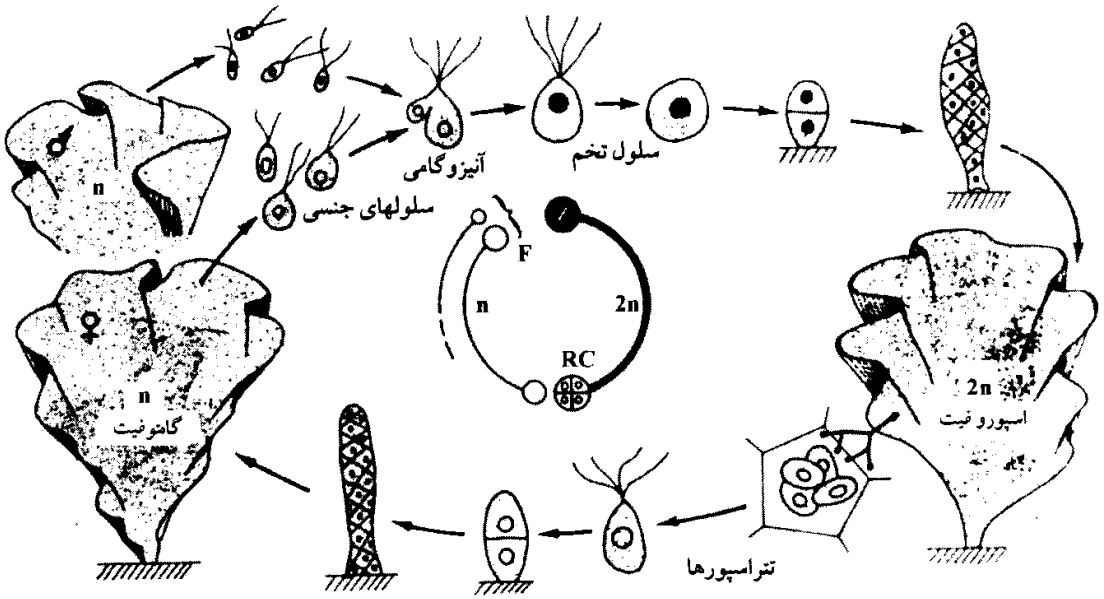
در گیاهان عالی خشکی‌زی، آب پیکر گیاه را احاطه نمی‌کند اما نوعی ارتباط و پیوستگی توسط نقل و انتقال آب با سلول‌ها تأمین می‌شود.

سلول‌های تمایزیافته پیکر این گیاهان به منظور تشکیل بافت‌ها و اندام‌ها به اشکال مختلف به هم‌پیوسته و در ارتباطند. تشکیل پلاسمودسم‌ها بین سلول‌های گیاهان عالی پیوستگی دقیق بین آنها را موجب می‌شود. از سویی مواد مختلفی مثل: کوتین، موم، ژله‌ها و لعاب‌ها و مانند آن نیز از دیگر امکاناتی هستند که علاوه بر نیروهای متقابل بین سلولی، سلول‌های این گیاهان را به هم می‌پیوندند.

در جانوران پرسلولی نیز پیوستگی سلول‌ها به اشکال متنوع دیده می‌شود.

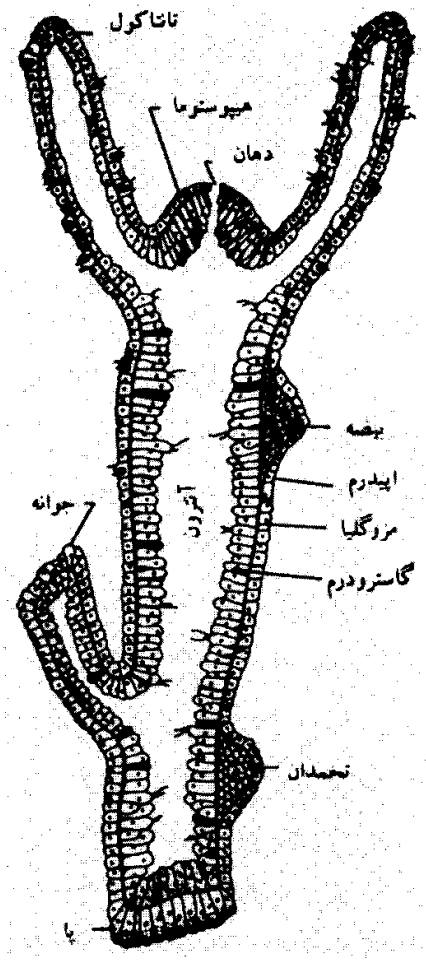
در عده‌ای از اسفنج‌ها که از جانوران آبزی هستند، پیوستگی سلول‌ها علاوه بر آب، به وسیلهٔ ماده‌ای به نام اسپونژین[4] که از ترشحات سلول‌ها است برقرار می‌شود.

1- Volvox 2- Ulva lactuca 3- thallus 4- Spongin



شکل ۱-۱۰. چرخهٔ تولیدمثل جلبک کاهوی دریایی

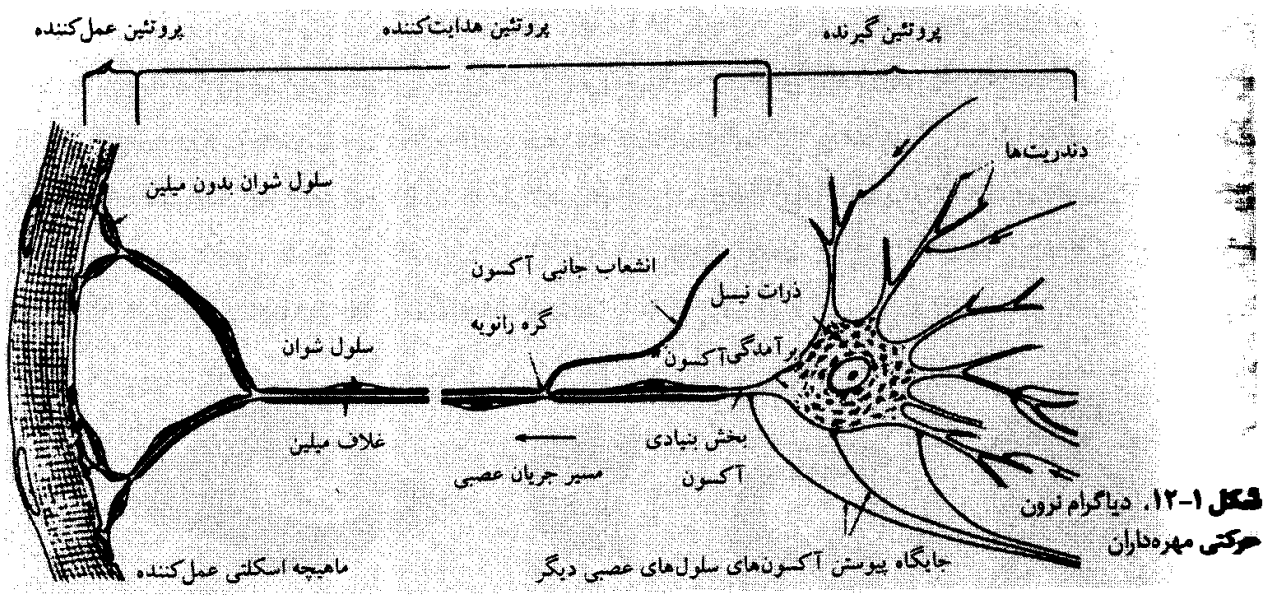
در هیدر که از کیسه تنان[1] آب شیرین است، علاوه بر آب، عامل اصلی پیوستگی سلول‌های لایه خارجی (دیواره بدن) و لایه داخلی (حفره گوارش) توسط مزوگلا[2]، تأمین می‌شود. مزوگلا از ترشحات سلول‌های دو لایه مذکور و فاقد ساختمان بافتی می‌باشد. همچنین شکل جدیدی از ارتباط بین سلول‌ها در این جاندار دیده می‌شود. بدین ترتیب که سلول‌های حسی تمایز یافتهٔ جانور از طریق تارهای نازک عصبی با یکدیگر مربوط شده و تحریکات عصبی را به نقاط مختلف بدن جانور انتقال می‌دهند (شکل ۱-۱۱).



شکل ۱-۱۱. برش طولی هیدر (از کیسته تنان) برای نشان دادن سازمان دیواره بدن جانور

جانوران پرسلولی خشکی‌زی نیز همانند گیاهان خشکی، سازگاری‌های قابل ملاحظه‌ای را برای ادامه حیات خود و حفظ پیوستگی سلول‌هایشان کسب کرده‌اند. در این جانوران ارتباط سلول‌ها به راه‌های مختلفی نظیر ایجاد محیط مایع داخلی (خون و لنف)، مایعات بین بافتی، عمل متقابل بین سلولی، تشکیل مجموعه‌های اتصالی بین سلول‌ها و ارتباطات دقیق عصبی برقرار می‌گردد. حالت پیشرفته‌ای از این نوع پیوستگی سلولی در بین نرون‌ها با یکدیگر و همچنین بین نرون‌ها با سلول‌های عضلانی مخطط، دیده می‌شود. مثال‌های یاد شده بیان کننده این واقعیت است که درجهٔ پیوستگی سلول‌های مختلف بدن در پریاختگان با پیشرفت ساختمانی آنها انطباق کاملی دارد. هرچه ساختمان و انواع سلول‌ها و بافت‌های بدن پریاختگان، تنوع بیشتری می‌یابد، کار و وظیفه بین آنها افزون‌تر و اشکال پیوستگی آنها متنوع‌تر و پیچیده‌تر می‌گردد.

1- Coelentra 2- Mesogla



شکل ۱-۱۲. دیاگرام نرون حرکتی مهره‌داران

ویژگی‌های عمومی سلول

مشاهده سلول زنده

سلول (واحد ماده زنده) از توده کوچک پروتوپلاسمی ساخته شده و شامل سیتوپلاسم که به وسیلهٔ غشاء پلاسمایی احاطه شده و هسته می‌باشد.

در یک موجود پرسلولی، شکل و ساختمان سلول‌ها، به حسب بافت‌ها و اندام‌های مختلف و اعمال اختصاصی که سلول‌ها به عهده دارند متفاوت است. به دلیل این طرز کار اختصاصی، تمام سلول‌ها در نهایت خصوصیات ویژه خود را پیدا می‌کنند. در عین حال، برخی ویژگی‌ها در همه سلول‌ها مشترک است و می‌توان آنها را حتّی در سلول‌هایی که تمایز کمی دارند، مثل سلول‌های اولیه جنینی، سلول‌های زایشی، سلول‌های مریستمی گیاهان و همچنین در سایر بافت‌هایی که سازمان ساده‌ای دارند، مثلاً برخی سلول‌های بافت پوششی یا پیوندی مشاهده کرد.

در این بحث، بیشتر ویژگی‌هایی را که در همه سلول‌ها مشترک است بررسی خواهیم کرد.

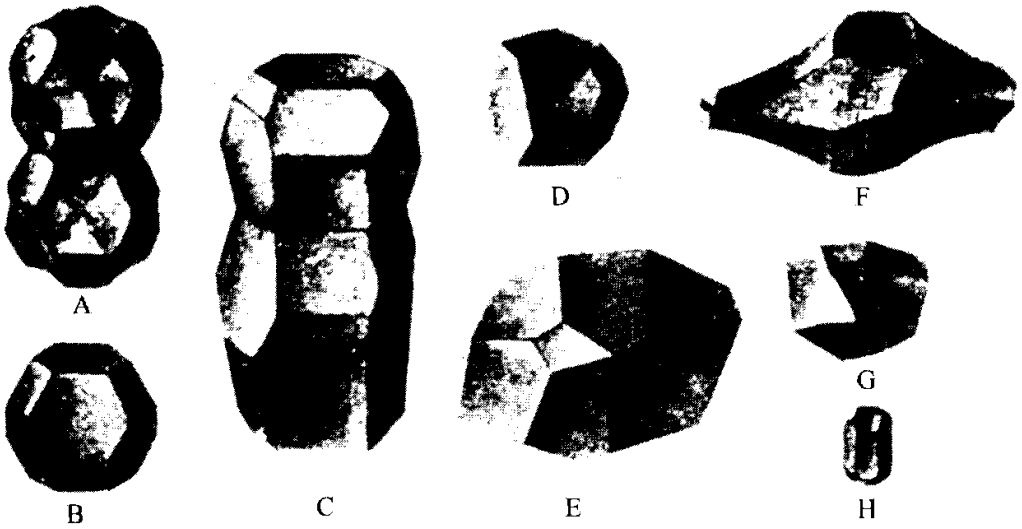
شکل

برخی سلول‌ها مثل آمیب‌ها و گلبول‌های سفید، غالباً شکل خود را تغییر می‌دهند. برخی دیگر شکل خاص کم و بیش مشخصی دارند، مثل اسپرماتوزوئیدها، سلول‌های پوششی، سلول‌های عصبی، اکثر سلول‌های گیاهی و مانند آن.

شکل سلول‌ها به طور عمده نتیجهٔ سازگاری با اعمال سلول است ولی عوامل دیگری مثل کشش سطحی، چسبندگی پروتوپلاسم، اعمال مکانیکی سلول‌های مجاور و سختی غشاء سلولی نیز در آن مؤثر است.

شکل سلول ممکن است تحت تأثیر ریزلوله‌ها و ریز رشته‌ها که از اندامک‌های اساسی سلول هستند نیز قرار گیرد. به حسب قانون کشش سطحی، بسیاری از سلول‌ها وقتی به صورت منفرد (جدا از سایر سلول‌ها) در مایعی قرار گیرند شکل کروی پیدا می‌کنند. به عنوان مثال گویچه‌های سفید در خون جاری شکل کروی دارند، اما در محیط خارج از رگ‌ها واجد پاهای کاذب شده (حرکت آمیبی) و شکل نامنظمی به خود می‌گیرند. سلول‌های تعداد زیادی از بافت‌های گیاهان و جانوران شکل چندوجهی دارند که نتیجه فشارهای متقابل سلول‌هاست (پیوستگی سلول‌ها).

شکل اصلی کروی این سلول‌ها همانند وضع یک حباب هوا در کف صابون، در نتیجه مجاورت با سایر سلول‌ها تغییر یافته است. در یک توده سلولی، سلول‌ها به صورت اجسام سخت چندوجهی با سطح حداقل بنظر می‌رسند که بین خود هیچ فاصله‌ای را باز نگذاشته‌اند. گرچه چندوجهی‌های نامنظم دارای ۴، ۶، ۱۲ پهلو می‌توانند بدون داشتن فاصله‌ای دور هم جمع شوند، اما چندوجهی دارای ۱۴ پهلو (تترادکاادر)[1] در چنین شرایطی با داشتن سطح حداقل مناسب‌تر است. پلاتو[2] و کالوین[3] نشان داده‌اند که شرایط داشتن سطح حداقل در حباب‌های هوای کف صابون که هر یک به طور متوسط ۱۴ پهلو دارند وجود دارد (شکل ۱-۱۳).



شکل ۱-۱۳. بازسازی‌های سه بعدی: B و A: چهارده وجهی حداقل کالوین - H و C: بازسازی نمونه‌های مختلف سلول‌ها با موم E: سلول چربی انسان - F، G و H: سلول‌های خارجی، میانی و تحتانی پوشش مطبق دهان متعلق به جنین ۵ ماهه انسان درشتنمایی تقریبی ۱۷۰ × C - ۱۵۰ × D - ۳۰۰ × E - ۷۵۰ × H و G و F

زمانی که سلول‌ها با میکروسکوپ مشاهده می‌شوند بایستی همواره مسأله سه بعد مختلف موردنظر باشد و به همین دلیل لازم است برش‌هایی که جهت‌های مختلف را مشخص می‌سازند، بررسی شود. بهترین حالت برای مشخص کردن شکل واقعی سلول‌ها تهیه برش‌های سری[4] (پشت سرهم) و با ضخامت مشخص از آنهاست به طوری که بتوان آنها را ترسیم و در نهایت با موم بازسازی کرد. (شکل ۱-۱۳) از C تا H نمونه‌هایی از بازسازی سلول‌های مختلف را نشان می‌دهد.

شکل مطلوب ۱۴ وجهی بندرت در سلول‌شناسی مشاهده شده است.

در عین حال مطالعات مربوط به بازسازی و شمارش سطوح تعداد زیادی از سلول‌ها که در توده‌های سلولی مشخص و بیشتر در سلول‌های جانوری صورت گرفته تا در سلول‌های گیاهی، شمارهٔ متوسط پهلوها بر سلول را به طور متوسط بسیار نزدیک به ۱۴ به دست می‌دهد.

اندازه

اندازه سلول‌ها بسیار مختلف است. برخی از سلول‌های گیاهی و جانوری با چشم غیرمسلح قابل مشاهده هستند. به عنوان مثال تخم برخی پرندگان (زرده و نطفه) که در اصل یک سلول است چند سانتی‌متر قطر دارد. حتّی

1- Tetradecaedre 2- Plateau 3- Kelvin 4- Serial sections

برخی باکتری‌ها مثل آپوسیسلوم[1] که به تازگی در استرالیا شناخته شده با چشم غیرمسلح قابل رؤیت است. ولی این موارد استثنایی هستند و بزرگی اکثر سلول‌ها بیش از چند میکرومتر نیست و تنها می‌توان آنها را با میکروسکوپ مشاهده کرد. کوچکترین سلول‌های جانوری اندازه‌ای حدود ۴ میکرومتر دارند. در بافت‌های بدن انسان، حجم سلول‌ها به استثنای عده‌ای از نورون‌ها، بین $۲۰۰\mu m^3$ و $۱۵۰۰\mu m^3$ تغییر می‌کند. به طور کلی حجم هر نوع سلول در حد نهایی رشد تقریباً ثابت است و این حجم مستقل از اندازهٔ جاندار موردنظر می‌باشد. به عنوان مثال سلول‌های کلیه یا کبد گاو، اسب یا موش تقریباً اندازه یکسانی دارند و اختلافی که در حجم کلی اندام‌های این جانوران وجود دارد مربوط به تعداد سلول‌هاست نه حجم سلول‌های سازنده آنها. این واقعیت گاهی به صورت قانونی شرح داده می‌شود که به آن قانون حجم ثابت گویند.

مقایسه کلی اندازه سلول گیاهی و جانوری

باید درنظر داشت که برخی سلول‌های جانوری مثل نورون‌ها که دارای زوایدی به صورت آکسون[2] و دندریت[3] هستند، طول کلی حدود ۶۰ سانتی‌متر و گاه بیش از آن دارند. با آنکه ابعاد سلول‌های مختلف بسیار متفاوت است ما به طور متوسط اندازه سلول‌ها در گیاهان و جانوران حدود ۴۰ - ۳۰ میکرومتر می‌باشد. تنوعی از اندازه، شکل و ساختمان عده‌ای از سلول‌ها در شکل ۱-۲ آمده است.

ساختمان

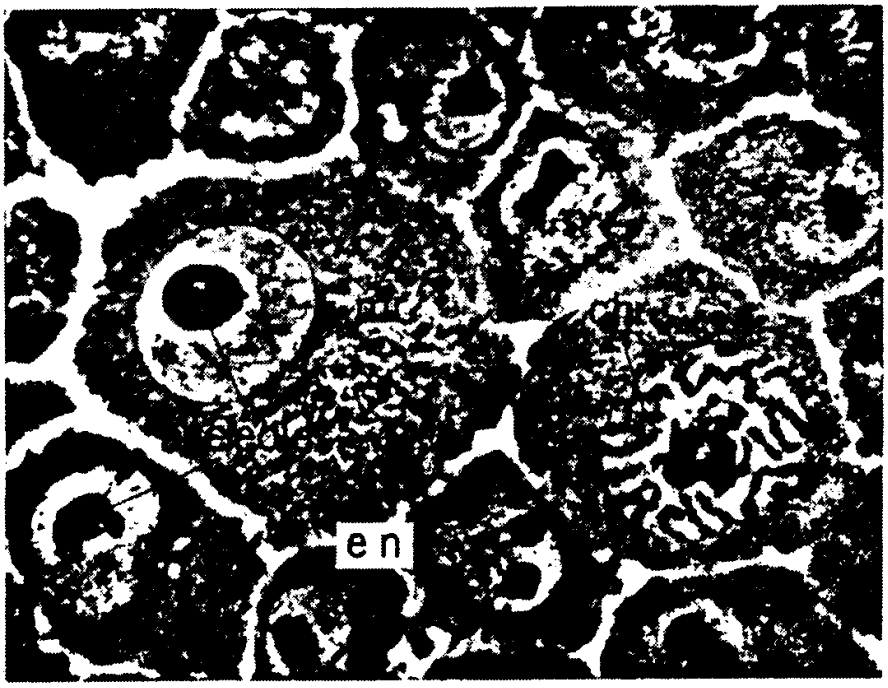
سلول‌های زنده را می‌توان به کمک انواع مختلف میکروسکوپ‌های نوری و در مواردی با میکروسکوپ الکترونی فشار قوی (H.V.E.M.)[4] بررسی کرد. در مطالعه با میکروسکوپ الکترونی مشاهده سلول‌ها در خلاء صورت می‌گیرد بنابراین تا به امروز مشاهده سلول زنده با میکروسکوپ‌های الکترونی (به جز با H. V. E. M.) مکان‌پذیر نبوده است. تعداد زیادی از سلول‌های جانوری را می‌توان به صورت منفرد در یک مایع هم غلظت مثل سرم خون، مایعات میان بافتی، سرم‌های فیزیولوژیکی، یا در کشت بافت‌ها مشاهده کرد. این سلول‌ها به صورت توده‌های نامنظم و شفافی از سیتوپلاسم که واجد یک هسته است و با غشاء سلولی احاطه شده، دیده می‌شوند.

اکثر سلول‌هایی که در شکل ۱-۱۴ مشاهده می‌شوند. در انترفاز هستند یعنی مرحله‌ای که تقسیم صورت نمی‌گیرد. هر یک از این سلول‌ها واجد یک هسته مشخص است که یک یا چند هستک دارد و به وسیلهٔ پوشش هسته‌ای از سیتوپلاسم جدا شده است. در زمان تقسیم سلول‌ها اجزای متراکمی در داخل هسته ظاهر می‌شوند که آنها را کروموزوم می‌نامند.

با میکروسکوپ نوری معمولی، سیتوپلاسم به صورت ماده‌ای بی‌شکل، همگن (ماده بنیادی سیتوپلاسم) بنظر می‌رسد که دارای اجزای متراکمی به اندازه‌های مختلف است و قابل رؤیت‌ترین آنها در سلول‌های جانوری میتوکندری‌ها هستند (شکل ۱-۱۴).

در بیشتر موارد مشاهده می‌شود که سیتوپلاسم حاشیه‌ای یا اکتوپلاسم متراکم‌تر و فاقد ذرات (گرانول‌ها) است. این اکتوپلاسم غالباً به حالت کلوئیدی است و تبدیل برگشت‌پذیر از حالت سُل[5] به ژِل[6] را دارد. چنین تبدیلی که مخصوصاً در آمیب در زمان کشیده شدن پاهای کاذب مشخص است، پدیده بسیار رایجی در سلول‌ها است.

1- Aposyslum 2- Axone 3- Dendrite 4- High Voltage Eletron Microscope
5- sol 6- gel



شکل ۱-۱۴. ساختمان کلی عده‌ای از سلول‌ها در انترفاز

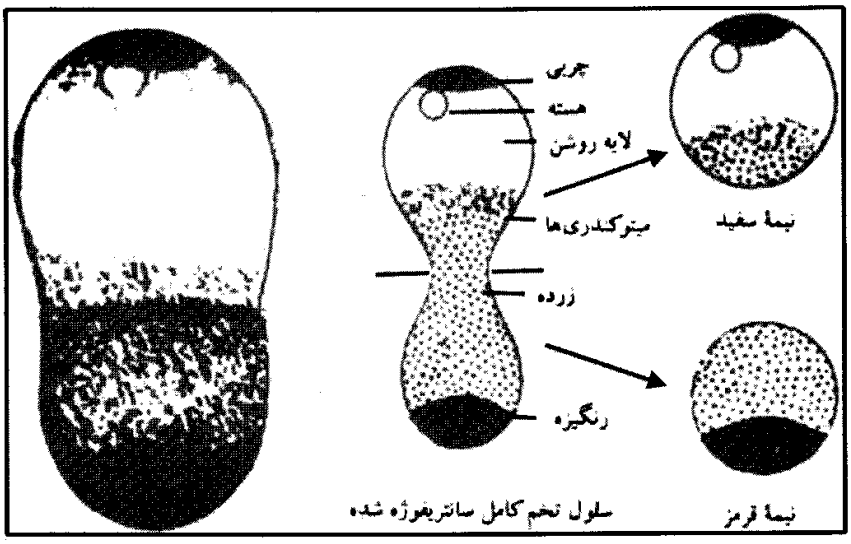
سیتوپلاسم داخلی یا آندوپلاسم که دارای ذرات مختلفی می‌باشد چسبندگی کمتری از اکتوپلاسم دارد.

سلول زنده را می‌توان سانتریفوژ کرد و به کمک میکروسکوپ مخصوصی (میکروسکوپ تداخلی و میکروسکوپ معکوس) تأثیر این سانتریفوژ را بر ساختمان‌های مختلف آن تجزیه و تحلیل کرد. به عنوان مثال: اگر تخم توتیای دریایی را تحت تأثیر سانتریفوژ شدید و طولانی قرار دهیم، اجزای مختلف سیتوپلاسم تا حدی از ماده بنیادی سیتوپلاسمی (هیالوپلاسم) یا سیتوزول[1] که جایگاه اولیه قرار گرفتن آنهاست جدا شده و برحسب تراکمشان ته‌نشین می‌شوند (شکل ۱-۱۵). تخم طویل و کشیده شده و بعد در وسط آن فرورفتگی ایجاد می‌شود. قطرات کوچک لیپیدی در قطب نزدیک به مرکز جمع می‌شوند. بعد لایه روشن به نسبت غلیظی که شامل ماده بنیادی سیتوپلاسمی و هسته است پدیدار می‌گردد. دو لایه دیگر پایینی بخصوص دارای میتوکندری‌ها و ذرات زرده‌ای هستند. بالاخره رنگیزه‌ها در قطب دور از مرکز جمع می‌شوند. اکتوپلاسم به دلیل چسبندگی زیاد خود و بخصوص به علت سختی که دارد، تحت تأثر نیروی گریز از مرکز جابجا نمی‌شود. بنظر می‌رسد که این ویژگی وابسته به حضور یون‌های کلسیم باشد زیرا با عمل برخی محلول‌ها (مثل اکسالات) که یون‌های کلسیم را به خود جذب می‌کنند، اکتوپلاسم حالت مایع بخود می‌گیرد.

مطالعات جانبی در مورد خصوصیات کلوئیدی سیتوپلاسم و نیروهای فیزیکوشیمیایی مؤثر بر آن صورت گرفته است. اگر فشار هیدروستاتیک افزایش یابد ممکن است اکتوپلاسم قشری حالت مایعی به خود بگیرد و قدرت تغییر شکل خود را از دست بدهد. این عمل تا حدودی برگشت‌پذیر است. ماده بنیادی سیتوپلاسمی معمولاً به حال یک مجموعه کلوئیدی است که براحتی امکان تبدیل برگشت‌پذیر (سُل - ژِل) را دارد. ممکن است این اختصاص با تأثیر یک عمل مکانیکی ساده از بین برود. این حالت را غالباً تیکسوتروپی[2] (تیکسو به معنی لمس کردن و تروپ به معنی تغییر) نامند.

علاوه بر میتوکندری‌ها، سلول به مقدار متغیری، ذرات مختلف دیگر مثل ذرات چربی، رنگیزه‌ها، مواد ذخیره‌ای

1- Sytosol 2- Thixotropie

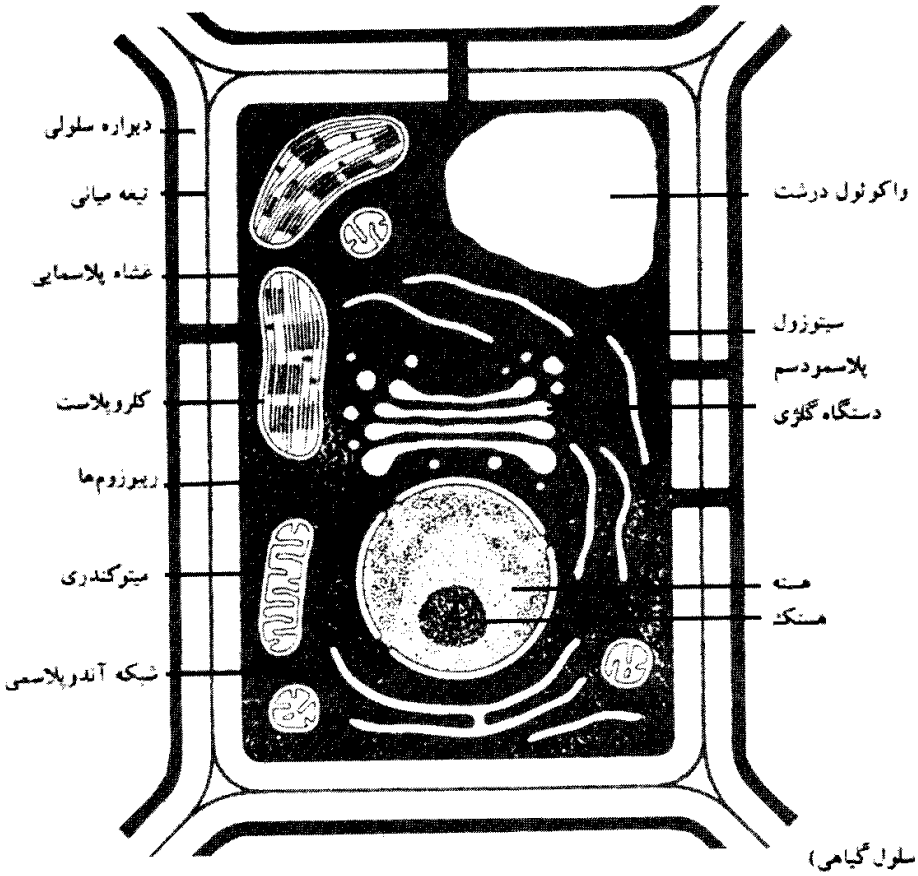


شکل ۱-۱۵. در سمت چپ تخم توتیای دریایی که تحت تأثیر نیروی گریز از مرکز قرار گرفته است دیده می‌شود. تخم طویل شده و به دو نیمه تقسیم می‌گردد. مواد سلولی لایه‌لایه می‌شود. در سمت راست طرح لایه‌لایه شدن تخم و تقسیم آن بدو قسمت نشان داده شده است.

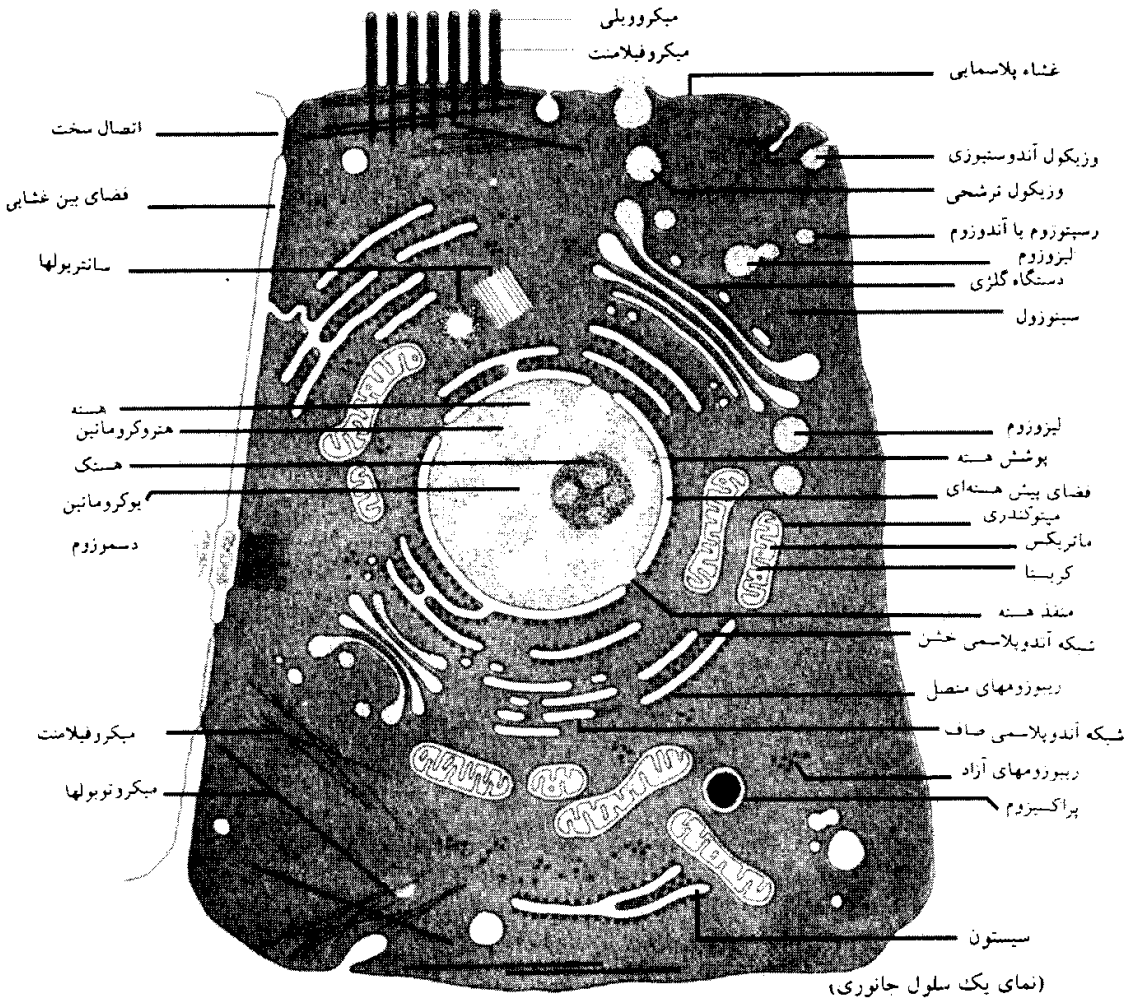
از جمله مواد زرده‌ای و ذرات ترشحی دارد که از فرآورده‌های سلولی هستند. چنین تشکیلاتی را انکلوزیون[1] یا دوتوپلاسم[2] (دوتوسل به معنی دوم) و یا پاراپلاسم[3] نامند. سلول‌های گیاهی علاوه بر میتوکندری‌ها، دارای اقسام مختلفی از پلاست هستند. سلول‌های جانوری و بخصوص سلول‌های گیاهی دارای واکوئل‌هایی با محتوای مایع‌اند که هر یک به وسیلهٔ یک غشاء نازک احاطه شده است. واکوئل‌ها، پلاست‌ها و میتوکندری‌ها در خارج از سلول به حسب اختصاصات اسمزی محیط، حجیم یا منقبض می‌شوند. این پدیده‌ها نتیجه وجود غشاء محدودکننده خارجی است که تغییرات اسمزی را تنظیم می‌کند. میتوکندری‌ها و پلاست‌ها (پلاست‌ها در سلول‌های گیاهی) را از نظر وجودشان در همه سلول‌ها و به دلیل اعمال مهمی که در سلول دارند شبه اندامک[4] یا اندامک[5] نامند.

برخی اندامک‌های دیگر مثل دستگاه گلژی و سانتریول‌ها براحتی در سلول‌های زنده قابل مشاهده نیستند. بالاخره اندامک‌هایی که ابعادشان کمتر از حد دید میکروسکوپ نوری است در سلول‌های زنده قابل رؤیت نخواهند بود (جز با H.V.E.M) بررسی دقیق اندامک‌های مختلف سلولی و نقش زیستی هر یک در فصل‌های بعدی به تفصیل مورد مطالعه قرار خواهد گرفت. همچنین ویژگی‌های عمومی دیگری از سلول‌ها نظیر تولید و مصرف انرژی، تکثیر سلول‌ها، حرکات سلولی و مانند آن که برداشت مناسبی از آنها نیاز به اطلاعات کافی از سازوکار اندامک‌های سلولی دارد، از مباحث فصول بعدی کتاب خواهد بود.

1- Inclusions 2- Deutoplasme 3- Paraplasme 4- Organoides 5- Organells



(نمای یک سلول گیاهی)



(نمای یک سلول جانوری)

شکل ۱-۱۶. مقایسه شکل ظاهری وکلیاتی از ساختمان داخلی یک سلول گیاهی و یک سلول جانوری

ترکیب شیمیایی سلول ۲

برای درک سازمان شیمیایی سلول درآغاز می‌بایست مولکول‌های اصلی سازنده آن را شناخت و اطلاعات کافی از ترکیبات با وزن مولکولی زیاد نظیر پروتئین‌ها، اسیدهای هسته‌ای، لیپیدها، گلوسیدها که بخش عمده‌ای از ساختمان‌های زیستی را شامل می‌شوند به‌دست آورد.

در گذشته ساده‌ترین راه مطالعه ترکیبات سلول، تجزیه شیمیایی بافت‌های مختلفی نظیر بافت کبد مغز یابافت مریستم گیاهان بود. این روش کار ارزش سلول‌شناسی محدودی به همراه داشت، زیرا مواد مورد تجزیه به‌طور معمول مخلوطی از انواع ترکیبات سلول‌های یک بافت و مواد بین سلولی آن بود.

در سال‌های اخیر تکمیل روش‌های بیوشیمیایی نظیر خردکردن و سانتریفوگاسیون اجزای سلولی و یافتنِ میکروسکوپ نوری، الکترونی و مانند آن امکان تشخیص ذرات و ترکیبات مولکولی سازنده سلو ل‌ها را فراهم آورده است و اطلاعات دقیقی از ساختمان، نحوه تغییر یا تحول و سنتز مواد در سلول‌ها را به‌دست داده است.

ترکیبات شیمیایی سلول را می‌توان به دو گروه غیرآلی (آب، نمک‌های کانی و یون‌های کانی) و ترکیبات آلی (پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، اسیدهای هسته‌ای و لیپیدها) تقسیم‌بندی کرد.

بعضی از ترکیبات آلی نظیر آنزیم‌ها، کوآنزیم‌ها و هورمون‌ها که دارای اعمال اختصاصی هستند در فصول مربوط به خود مورد بررسی قرار خواهند گرفت و اطلاعات تکمیلی درباره آنها را می‌توان از کتب بیوشیمی کسب کرد. به‌طور کلی پروتوپلاسم یک سلول گیاهی یا جانوری شامل حدود ۷۵ تا ۸۵ درصد آب، ۱۰ تا ۲۰ درصد پروتئین، ۲ تا ۳ درصد لیپید، ۱ درصد کربوهیدرات و ۱ درصد نمک‌های کانی می‌باشد.

آب

بهترین حلال طبیعی اغلب مواد کانی و عده زیادی از ترکیبات آلی است. آب به منظور ایجاد فشار اسمزی مناسب در سلول‌ها لازم است و امکان مبادلات سلول با محیطش را فراهم می‌سازد.

مولکول آب به علت ضریب حرارتی بالایی که دارد، قادر به جذب گرمای زیاد است و با ذخیره حرارتی بالای خود از تغییرات حرارتی شدید در درون سلول‌ها جلوگیری می‌کند. همچنین آب نقش محیط پراکنده‌کننده[1] ماکرومولکول‌ها در سیستم کلوئیدی پروتوپلاسم را به عهده دارد. وجود آب از نظر انجام فعالیت‌های متابولیکی سلول کاملاً لازم است و تنها در محیط مایع است که واکنش‌های زیستی از جمله فعالیت‌های آنزیمی امکان‌پذیر است.

مقدار آب موجود در سلول بستگی به فعالیت متابولیکی و سن سلول دارد. به‌عنوان مثال یک سلول جنینی ۹۰ تا ۹۵ درصد آب دارد. با افزایش سن سلول، مقدار آب آن کاهش می‌یابد.

آب به دو صورت در سلول وجود دارد:

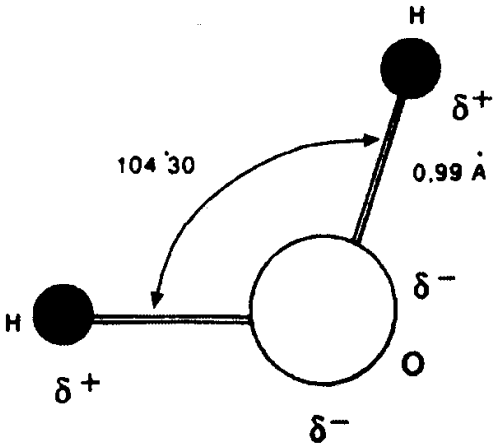
1- Dispersion media

آب آزاد[1]: که ۹۵ درصد کل آب موجود در سلول را می‌سازد و آبی است که به‌عنوان حلال یا محیط پراکنده‌کننده سیستم کلوئیدی در سلول وجود دارد. همچنین آب موجود در واکوئل‌ها را شامل می‌شود.

آب پیوسته[2]: که ۴ تا ۵ درصد کل آب سلول را تشکیل می‌دهد و به حالت ترکیب در ساختمان مولکول‌های سازنده سلول وارد است. این آب با اتصال‌های سستی از طریق پیوند ئیدروژنی و سایر پیوندها، به مولکول‌های پروتئینی متصّل می‌شود. این بخش شامل آب غیر متحرکی که در بین ساختمان‌های رشته‌ای ماکرومولکولی وجود دارد نیز می‌گردد.

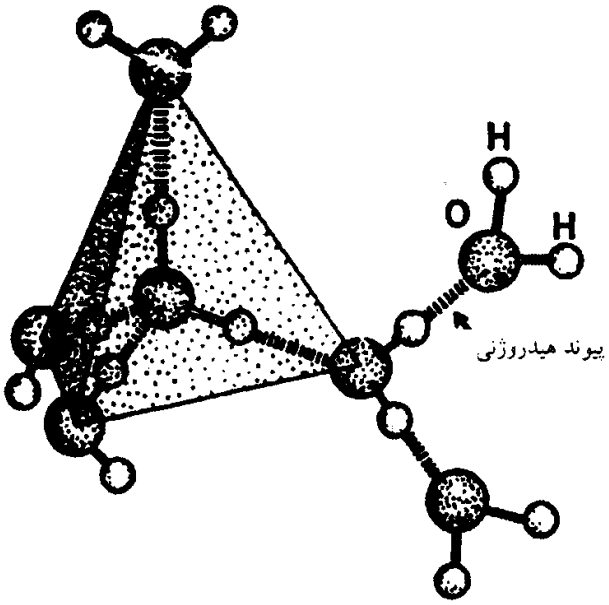
ساختمان آب

مولکول آب که از ترکیب دو اتم ئیدروژن با یک اتم اکسیژن تشکیل شده است، به علت پراکنش نامتقارن بارهای الکتریکی مولکولی قطبی یا دوقطبی[3] است. یعنی اکسیژن با بار الکتریکی منفی شدیدی که دارد تنها الکترون موجود در اتم ئیدوژن را به طرف خود می‌کشد و آن را به‌صورت هسته‌ای مثبت درمی‌آورد. درنتیجه این عمل، هر یک از دو اتم ئیدروژن دارای بار مثبت (δ^+) و اکسیژن تا حدی دارای بار منفی (δ^-) می‌شود (شکل ۲-۱).



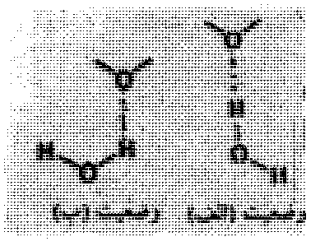
شکل ۲-۱. نمای ساختمانی یک مولکول آب

وقتی دو مولکول آب به یکدیگر نزدیک می‌شوند، بین بارهای مثبت و منفی اتصال‌های اکسیژن و ئیدروژن موجود در دو مولکول، کششی الکتروستاتیک پیش می‌آید که موجب پراکنش جدیدی در بارهای این دو مولکول می‌شود و با تشکیل پیوندهای ئیدروژنی دو مولکول ارتباط می‌یابند. هر مولکول آب، چهار پیوند ئیدروژنی با مولکول‌های مجاورش تشکیل می‌دهد که نتیجه آن ایجاد یک چهاروجهی[4] است (شکل ۲-۲). این خاصیت موجب ایجاد وابستگی (قدرت جاذبه مولکول‌ها نسبت به یکدیگر[5]) زیاد مولکول‌های آب می‌گردد که یکی از نتایج آن بالا بودن نقطه جوش آب است. پیوندهای ئیدروژنی در مقایسه با پیوندهای کووالانس ضعیف‌تر هستند. انرژی لازم برای شکستن پیوند ئیدروژنی ۶/۸ کیلو کالری بر مول می‌باشد. در حالی که شکستن پیوند کووالانس بیش از ۱۰۰ کیلوکالری انرژی لازم دارد. با وجود این در ماکرومولکول‌ها که پیوندهای ئیدروژنی تجمع پیدا می‌کنند انرژی زیادی برای شکستن آنها لازم است.



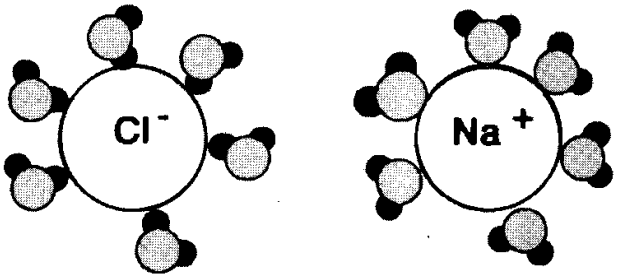
شکل ۲-۲. پیوستن مولکول‌های آب با پیوندهای ئیدروژنی و تشکیل ساختمان چهار وجهی

1- Free water 2- Bound water 3- Dipole 4- Tetrahedral
5- Intermolecular tension



اختصاص دیگر پیوندهای ئیدروژنی چگونگی آرایش[1] آنهاست. وقتی O-H با اتم گیرنده در یک امتداد قرار گیرد، بالاترین ثبات را دارد (وضعیت الف).

در سیستم‌های آبی، پیوندهای ئیدروژنی خیلی سریع‌تر از پیوندهای کووالانسی شکسته می‌شوند. این ترتیب همراه با خواص و جهت فضایی آب موجب اهمیت فراوان پیوندهای ئیدروژنی در پدیده‌های زیستی می‌شود، زیرا در سیستم‌های زیستی پدیده‌ها بسیار سریع اتفاق می‌افتند (مثال: پیچیدن پروتئین‌ها هنگامی که می‌خواهند به شکل طبیعی[2] خود در آیند). ایجاد پیوندهای ئیدروژنی توسط اکسیژن و ازت در سیستم‌های زیستی اهمیت زیادی دارد. آب موجب یونی شدن الکترولیت‌ها می‌شود (شکل ۲-۳). نمک‌ها نظیر کلرورسدیم از طریق کشش‌های الکتروستاتیک موجود بین بخش‌های مثبت و منفی ثبات خود را حفظ می‌کنند. برای تجزیه و جدا کردن یون‌های این الکترولیت‌ها انرژی زیادی لازم است. آب به آسانی این عمل را انجام می‌دهد و موجب انحلال الکترولیت‌ها می‌شود، زیرا اکسیژن با بار الکتریکی منفی زیاد، مثلاً Na^+ را جذب کرده و ئیدروژن با بار الکتریکی مثبت، Cl^- را جذب می‌کند و چون نیروهای وارد از طرف اکسیژن و ئیدروژن بیشتر از نیرویی است که از طرف عناصر سازنده کلرورسدیم به یکدیگر وارد می‌شود، درنتیجه مولکول‌های یونی شونده در محلول‌های آبکی، حل[3] می‌شوند. به همین نحو خاصیت قطبی مولکول آب موجب می‌شود که آب با بارهای الکتریکی مثبت و منفی با مولکول‌های پروتئین نیز اتصال یابد. هر عامل آمین در مولکول پروتئین قادر است به ۲/۶ از مولکول‌های آب متصل شود.

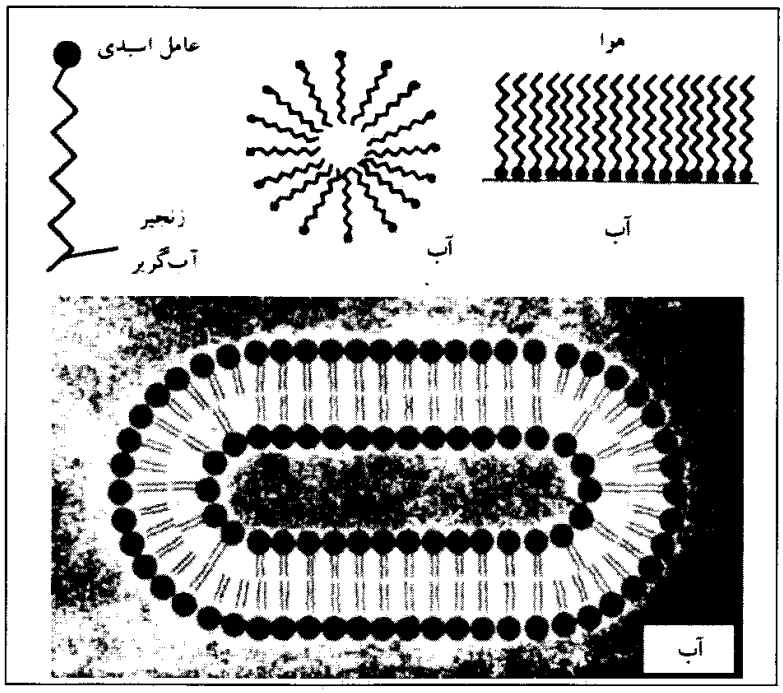


شکل ۲-۳. چگونگی دخالت مولکول‌های آب در یونی کردن الکترولیت‌ها

آب علاوه‌بر نقش حلال، نقش پراکنش ذرات خاص محیط‌های کلوئیدی یعنی میسل‌ها[4] را به عهده دارد.

برخی ترکیبات هم دارای گروه‌های قطبی و هم گروه‌های غیرقطبی هستند. چنین مولکول‌هایی آمفی‌پاتیک[5] نامیده می‌شوند (شکل ۲-۴). به‌عنوان مثال مولکول‌های اسیدهای چرب که دارای یک زنجیر طویل غیرقطبی (هیدروکربنی) و یک گروه قطبی (کربوکسیل) در انتهای خود هستند، هنگامی که در محیط آب قرار گیرند، به علت داشتن زنجیر طویل نامحلول در آب به‌صورت میسل‌هایی پراکنده می‌شوند. در این میسل‌ها، گروه‌های کربوکسیل با بار منفی در معرض مولکول‌های آب قرار گرفته، پیوندهای ئیدروژنی با مولکول‌های آب تشکیل می‌دهند. در حالی که زنجیر غیرقطبی هیدروکربنی از مولکول‌های آب فرار کرده، به طرف داخل قرار می‌گیرد. چنین میسل‌هایی در مجموع دارای بار منفی بوده و به‌صورت معلق در محیط آبکی باقی می‌مانند. باید توجه داشت که بین زنجیرهای هیدروکربنی (گروه‌های غیرقطبی) هیچ‌گونه پیوند واقعی تشکیل نمی‌شود و تنها عمل متقابل آب‌گریزی[6] وجود دارد و نه تشکیل پیوندهای آب‌دوستی[7] که در نتیجه آن گروه‌های آب‌گریز، دور از تماس با مولکول‌های آب با یکدیگر مجتمع می‌گردند.

1- Orientation 2- Native Configuration 3- Solvated 4- Micelles
5- Amphipatic 6- Hydrophobic intraction 7- Hydrophilic



شکـــــل ۲-۴. حالت‌های مختلفی از مولکول‌های آمفی‌پاتیکِ اسیدهای چرب

نمک‌های کانی

در بسیاری از واکنش‌های زیستی و نیز برای تنظیم فشار اسمزی و PH مناسب، در سلول‌ها به نمک‌های کانی نیاز است سلول با آب تنها زنده نمی‌ماند. برخی از مواردی که لزوم و اهمیت نمک‌های کانی در ماده زنده را مشخص می‌کند به شرح زیر است:

نمک‌های تفکیک شده به آنیون‌ها مثل Cl^- و کاتیون‌ها مثل Na^+ و K^+ برای ایجاد فشار اسمزی و توازن اسید و باز سلول اهمیت زیاد دارند. نگهداری یون‌ها موجب افزایش فشار اسمزی سلول شده و آب به طرف درون سلول کشیده می‌شود. برخی یون‌های غیرآلی مثل منیزیم، به‌صورت کوآنزیم برای بعضی فعالیت‌های آنزیمی ضروری هستند. برخی دیگر مثل فسفات در ترکیب مواد مختلف از جمله ATP (آدنوزین‌تری فسفات) با پیوندهای پرانرژی وارد شده، از طریق فسفوریلاسیون اکسیداتیو، انرژی شیمیایی لازم برای فعالیت‌های زیستی سلول را تأمین می‌کنند.

تراکم یون‌های مختلف در مایع درون سلولی با مایع بین سلولی یکسان نیست. به‌عنوان مثال، سلول دارای تراکم بالایی از K^+ و Mg^{++} است. در صورتی که Na^+ و Cl^- به‌خصوص در مایع بین سلولی زیادند.

یون‌هایِ اصلیِ لازم برای سلول‌ها، فسفات‌ها و بی‌کربنات‌ها هستند. یون‌های کلسیم در محیط داخلی در حال گردش در اطراف سلول‌ها وجود دارند، در استخوان‌ها این یون‌ها به منظور تشکیل زمینه (بستر) متبلور، با یون‌های فسفات و یون‌های کربنات ترکیب می‌شوند.

یون‌های فسفات آزاد، در خون و مایعات بافتی وجود دارند اما قسمت اعظم فسفات، به‌صورت فسفولیپیدها، نوکلئوتیدها، فسفوپروتئین‌ها و قندهای فسفردار است.

فسفات یک ظرفیتی ($H_2PO_4^-$) و فسفات دوظرفیتی (HPO_4^{--}) سیستم تامپونی موجود زنده را می‌سازند و همچنین PH خون و مایعات بافت‌ها را تثبیت می‌کنند.

بین یون‌های دیگری که در موجود زنده وجود دارند، یون‌های سولفات - کربنات - بی‌کربنات - منیزیم را می‌توان نام برد. برخی ترکیبات معدنی به‌صورت غیریونی هستند. به‌عنوان مثال آهن با اتصال‌های فلز - کربن در

ساختمان هموگلوبین، فریتین[1]، سیتوکروم‌ها و برخی آنزیم‌ها (مثل کاتالازوسیتوکروم اکسیداز) وجود دارد. منگنز، مس، کبالت، یُد، سلنیوم، نیکل، مولیبدن و روی برای فعالیت‌های طبیعی سلول‌ها ضروری هستند.

ماکرومولکول‌ها

ساختمان و برخی از خواص سلول، اساساً وابسته به مولکول‌های بزرگی است که از واحدهای تکرار شونده‌ای ساخته شده‌اند، که به وسیلهٔ پیوندهای کووالانس به یکدیگر متصل می‌شوند. این واحدها را منومر[2] می‌نامند و ماکرومولکول حاصل از تکرار آنها پلیمر[3] نامیده می‌شود. افزایش تعداد منومرها در یک ماکرومولکول موجب بروز خصوصیات کاملاً جدید و متفاوتی با ویژگی‌های منومر سازنده آن می‌شود. به‌عنوان مثال: هیدروکربورهایی مثل متان و اتیلن به‌صورت گاز هستند در حالی که پلیمر بزرگی از آنها (مجموعه ۲۰ منومر یا بیشتر) حالت روغنی دارد و در نهایت همانند پارافین شکل جامد به خود می‌گیرد. سه نمونه اصلی پلیمرهای موجود در ماده زنده عبارت‌اند از:

الف) اسیدهای هسته‌ای (اسیدهای نوکلئیک[4]) که از تکرار ۴ واحد مختلف که هر یک را نوکلئوتید نامند، تشکیل می‌شوند. تکرار این واحدها در مولکول DNA، منشاء اصلی اطلاعات ژنتیکی را به وجود می‌آورد.

ب) پلی‌ساکاریدها[5]، پلیمرهای متشکل از منوساکاریدها هستند. نمونه‌های مهم آنها نشاسته، سلولز و گلیکوژن می‌باشد. در ترکیب آنها مواد دیگری نیز به منظور تشکیل پلی‌ساکاریدهای خیلی پیچیده‌تر می‌تواند موجود باشد.

ج) پروتئین‌ها و پلی پپتیدها[6]، از منومرهایی به اسم اسیدهای امینه ساخته شده‌اند. تعداد و نسبت اسیدهای امینه در آنها مختلف است ولی به‌طور کلی از حدود ۲۰ اسید امینه مختلف که به وسیلهٔ پیوندهای پپتیدی به همدیگر متصل می‌شوند(با تعداد، نسبت و نوع متفاوت در هر پروتئین) تشکیل می‌گردند. ترتیب قرار گرفتن اسیدهای امینه (منومرها)، ترکیبات بسیار متفاوتی را در پروتئین‌های مختلف به وجود می‌آورد که نه تنها خواص آنها بلکه نوع فعالیت‌های زیستی آنها را نیز مشخص می‌سازد.

از بین ماکرومولکول‌های مورد بحث، اسیدهای هسته‌ای و پروتئین‌ها را که طرز ردیف شدن منومرهایشان دارای اهمیت ویژه می‌باشد، مولکول‌های اطلاعاتی[7] می‌نامند.

اسیدهای امینه و پروتئین‌ها

واحدهای ساختمانی پروتئین‌ها، اسیدهای امینه هستند. هر اسید امینه از یک اسید آلی به وجود آمده است که در آن، ئیدروژنی که در وضعیت آلفا(α) قرار داشته با یک گروه امینی ($-NH_2$) جایگزین شده است.

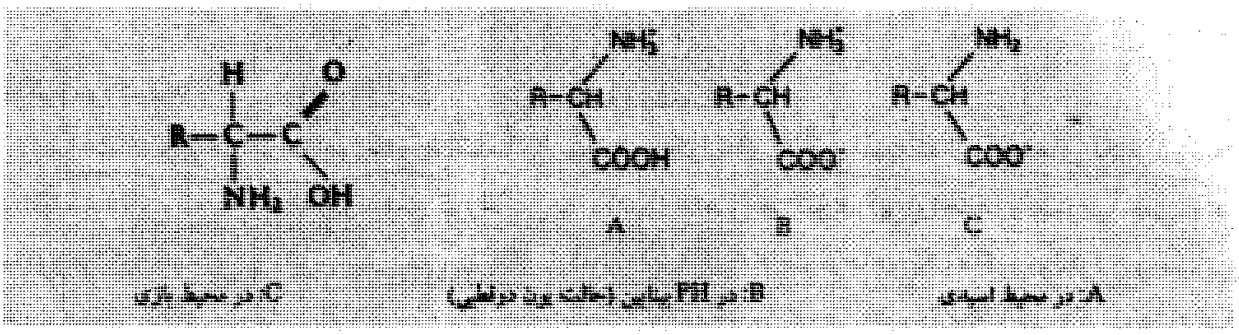
به‌عنوان مثال: با این وضع، اسیداستیک، گلیسین و اسیدپروپیونیک، آلانین را می‌سازد.

از آنجا که در هر اسید امینه حداقل یک گروه کربوکسیل اسیدی ($-COOH$) و یک گروه امینه بازی ($-NH_2$) وجود دارد، مولکول‌های آنها را آمفوتر[8] می‌نامند، زیرا در محیط اسیدی رفتار بازی و در محیط بازی رفتار اسیدی از خود نشان می‌دهند.

اسیدهای امینه آزاد در سلول ممکن است از تجزیه پروتئین‌ها یا در نتیجه جذب از سرمی که سلول در آن غوطه‌ور است (مایع بین سلولی) حاصل شده باشند. اسیدهای امینه آزاد در سلول صرف ساخته شدن پروتئین‌های

1- Ferritin 2- Monomere 3- Polymere 4- Nucleic acid 5- Polysacharides
6- Polypeptides 7- Informatinal molecules 8- Amfoter

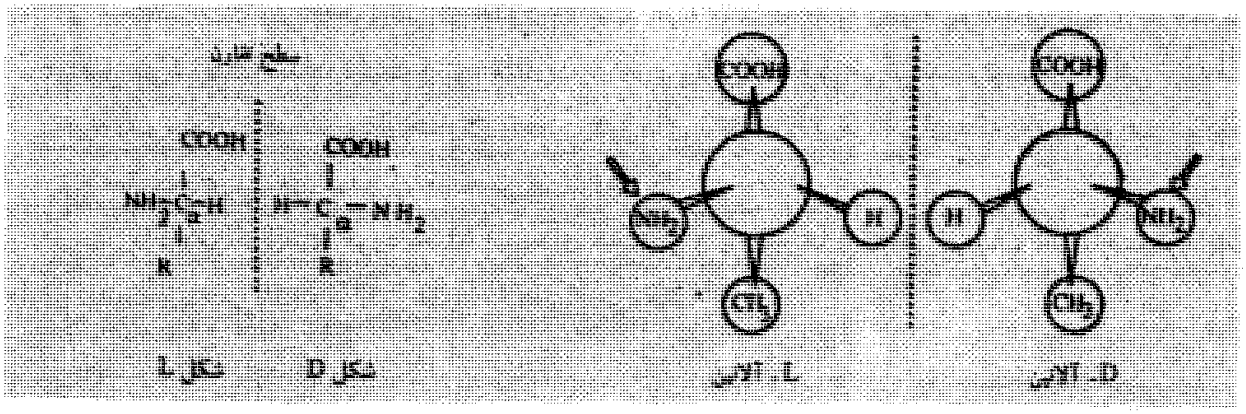
جدید ضروری می‌شوند. به‌طور کلی هر اسید امینه (α) دارای یک گروه آمین ($-NH_2$) و یک گروه کربوکسیل ($-COOH$) بر روی کربن آلفا (α) می‌باشد و فرمول عمومی آنها به‌صورت زیر نشان داده می‌شود.



ریشه R می‌تواند ئیدروژن یا کربورهای مختلف آن باشد و بنابراین در اسیدهای امینه مختلف، متفاوت است. اسیدهای امینه را به‌حسب این که گروه‌های R در آنها غیرقطبی، قطبی خنثی، دارای بار مثبت و یا دارای بار منفی باشد، به چهار گروه تقسیم می‌کنند.

همه اسیدهای امینه به‌جز گلیکول دارای یک کربن نامتقارن هستند و بنابراین نور پلاریزه را به طرف راست یا چپ منحرف می‌کنند. به حسب قرار داد، در مقایسه با ساختمان فضایی آلدئیدگلیسریک، اگر عامل ($-NH_2$) در سمت راست کربن آلفا باشد، اسید امینه را از نوع (D) و چنانچه در سمت چپ باشد، آن را نوع L نامند.

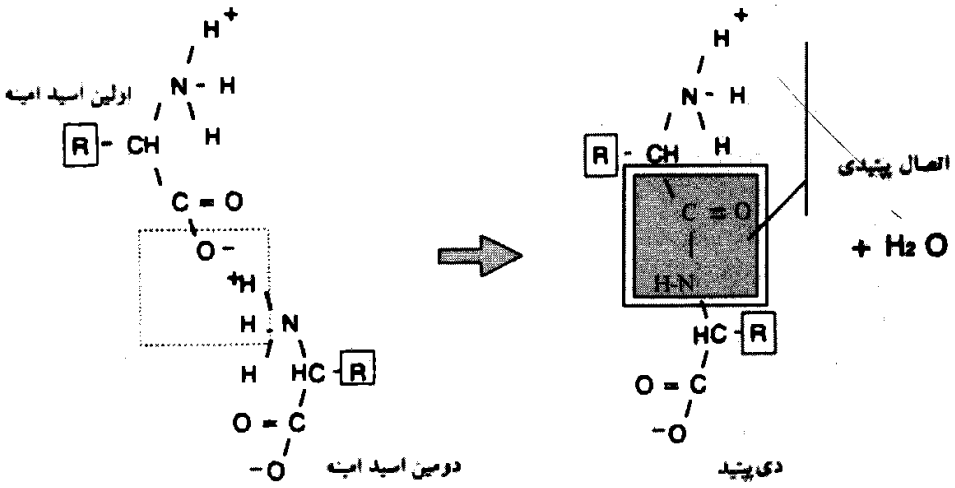
تمام اسیدهای امینه موجود در ساختمان پروتئین‌های سلول از نوع (L) هستند.



علاوه بر ۲۰ اسید امینه طبیعی، ۱۵۰ اسید امینه دیگر نیز در سیستم‌های زنده یافت شده که در ساختمان پروتئین‌ها شرکت ندارند و آنها را اسیدهای امینه غیرپروتئینی می‌نامند. این اسیدهای امینه گاهی به‌صورت ترکیب در جانداران یافت می‌شوند که آنها را تحت عنوان فرم‌های β و α و s نیز می‌نامند.

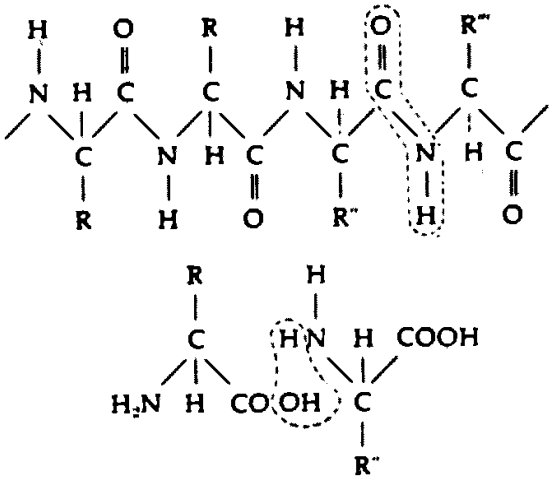
به‌عنوان مثال: β آلانین، زیربنای ساختمانی اسید پنتاتونیک است. هوموسیستین و هوموسرین واسطه‌های متابولیسم سایر اسیدهای امینه‌اند. D- آلانین در لاروها و شفیره‌های بعضی حشرات، D گلوتامیک اسید در دیواره باکتری‌ها و D- سرین در کرم خاکی را می‌توان نام برد (جدول ۲-۱).

ترکیب اسیدهای امینه با یکدیگر با تشکیل پیوندهای پپتیدی صورت می‌گیرد. به این ترتیب که در طی سنتز پروتئین، گروه آمین یک اسید امینه با گروه کربوکسیل اسید امینه دیگر ترکیب شده با از دست دادن یک مولکول آب پیوند کووالانسی را به وجود می‌آورد که همان پیوند پپتیدی است.



مولکولی که از ترکیب دو اسید امینه به وجود می‌آید دی‌پپتید نامیده می‌شود که می‌تواند با اسید امینه دیگری ترکیب شده و تری‌پپتید را به وجود آورد و غیره.

زنجیر حاصل از ترکیب اسیدهای امینه مختلف، پلی‌پپتید نامیده می‌شود که ساختمان نخستین[1] پروتئین‌ها را تشکیل می‌دهد.



برحسب قرارداد اگر وزن مولکولی مجموع اسیدهای امینه در مولکول از ۵۰۰۰ دالتون[2] تجاوز نکند مولکول را پپتید یا پلی‌پپتید و در حد بیش از ۵۰۰۰ دالتون، مولکول را پروتئین می‌نامند.

فاصله بین اتصال‌های پپتیدی حدود ۳/۵ آنگستروم است. یک پروتئین با وزن مولکولی ۳۰۰۰۰ دالتون و دارای ۳۰۰ اسید امینه اگر به‌طور کامل کشیده باشد طولی حدود ۱۰۰۰ آنگستروم و عرضی معادل ۱۰ آنگستروم و ضخامتی حدود ۴ تا ۶ آنگستروم خواهد داشت.

بر حسب درجه سازمان یافتگی برای مولکول‌های پروتئینی، ۴ حد ساختمانی به شرح زیر در نظر گرفته می‌شود:

ساختمان نخستین پروتئین‌ها

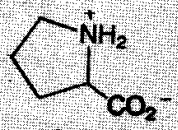
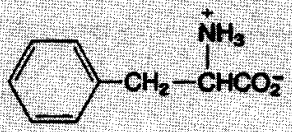
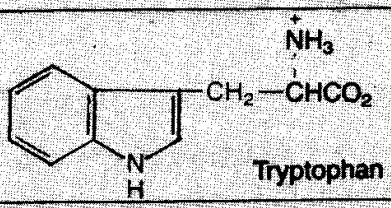
ترتیب[3] قرارگرفتن اسیدهای امینه در زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی را ساختمان نخستین مولکول پروتئینی می‌نامند که مهم‌ترین و اختصاصی‌ترین ساختمان پروتئین‌هاست و از برخی لحاظ مشخص کننده ویژگی‌های ساختمان دومین[4] و سومین[5] پروتئین‌ها نیز می‌باشد. تجمع واحدهای پروتئینی دارای ساختمان‌های دوم و سوم، ساختمان چهارم پروتئین‌ها را می‌سازد. در ساختمان نخستین پروتئین‌ها علاوه بر پیوندهای پپتیدی که نوع اساسی اتصال است،

1- Primary Structure

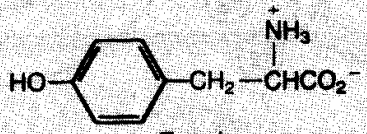
۲- دالتون (D)

3- Sequence 4- Scondary Structure 5- Tritary Structure

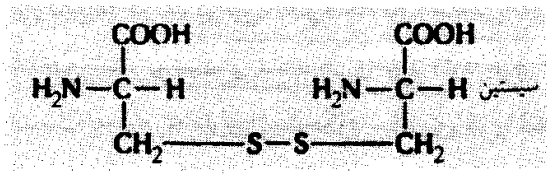
جدول ۲-۱. انواع اسیدهای امینهٔ طبیعی با علامت اختصاری هر یک، فرمول‌های مربوطه، بعضی خصوصیات شیمیایی و گروه R را نشان می‌دهد. گروه اول - اسید امینه‌هایی که بنیان R در آنها غیرقطبی است. PH = ۶-۷

مشخصات اسید امینه	فرمول اسید امینه	توضیحات
آلانین Ala-A وزن مولکولی ۸۹	$CH_3-CH(NH_3^+)CO_2^-$ Alanine	بنیان R آلیفاتیک - منبع مهم فیبروئین ابریشم به فرم α و β آلانین وجود دارد β- آلانین فاقد فعالیت نوری است
والین Val-v وزن مولکولی ۱۳۱	$(CH_3)_2CH-CH(NH_3^+)CO_2^-$ Valine	بنیان R آلیفاتیک. اسید امینه ضروری برای پستانداران و پرندگان
لوسین Leu-l وزن مولکولی ۱۳۱	$(CH_3)_2CHCH_2-CH(NH_3^+)CO_2^-$ Leucine	بنیان R آلیفاتیک. اسید امینه ضروری برای پستانداران و پرندگان
لوسین Leu-l وزن مولکولی ۱۳۱	$(CH_3)_2CHCH_2-CH(NH_3^+)CO_2^-$ Leucine	بنیان R آلیفاتیک. در تمام پروتئین‌ها به جز هموگلوبین. اسید امینه ضروری - به دلیل داشتن دو کربن نامتقارن دارای ۴ ایزومر فضایی است
پرولین Pro-p وزن مولکولی ۱۱۵	 Proline	بنیان R هتروسیکلیک - فاقد عامل آمین آزاد در حقیقت یک آلفا - ایمنو اسید است
فنیل آلانین Phe-F وزن مولکولی ۱۶۵	 Phenylalanine	بنیان R آروماتیک - اسید امینه ضروری - به جز پروتامین در غالب پروتئین‌ها وجود دارد
تریپتوفان Trp-W وزن مولکولی ۲۰۴	 Tryptophan	بنیان R آروماتیک - اولین اسید امینه که ضروری شناخته شده است. در آب گرم محلول می‌باشد.
میتونین Met-M وزن مولکولی ۱۲۹	$CH_3SCH_2CH_2-CH(NH_3^+)CO_2^-$ Methionine	بنیان R دارای گوگرد (تیواتر) - اسید امینه ضروری به جز هیستون‌ها و پروتامین‌ها در اغلب پروتئین‌ها یافت می‌شود

ادامهٔ جدول ۲-۱. گروه دوم - اسید امینه‌هایی که بنیان R در آنها قطبی ولی فاقد بار است. PH = ۶~۷

مشخصات اسید امینه	فرمول اسید امینه	توضیحات
گلیسین Gly-G وزن مولکولی ۷۵	$H-CH(NH_3^+)CO_2^-$ Glycine	بنیان R آلیفاتیک - اولین و ساده‌ترین اسید امینه - فاقد کربن نامتقارن - در نتیجه فاقد ایزومر فضایی و فعالیت نوری
سرین Ser-S وزن مولکولی ۱۰۵	$HOCH_2-CH(NH_3^+)CO_2^-$ Serine	بنیان R آلیفاتیک. منبع مهم آن ذرت و گردو
ترئونین Thn-T وزن مولکولی ۱۱۹	$CH_3CH(OH)-CH(NH_3^+)CO_2^-$ Threonine	بنیان R آلیفاتیک. اسید امینه ضروری
سیستئین Cys-C وزن مولکولی ۱۲۱	$HSCH_2-CH(NH_3^+)CO_2^-$ Cysteine	بنیان R گوگردار - در اثر دهیدروژناسیون به سیستئین تبدیل می‌شود.
تیروزین Tyr-Y وزن مولکولی ۱۸۱	 Tyrosine	بنیان R آروماتیک - پاراهیدراکسی فنیل آلانین نیز نامیده می‌شود
آسپاراژین Asn-N وزن مولکولی ۱۳۲	$^-OCCH_2-CH(NH_3^+)CO_2^-$ Aspartic	بنیان R دارای عامل آمین - آمید اسید آسپارتیک
گلوتامین Glu-Q وزن مولکولی ۱۴۶	$H_2NCOCH_2CH_2-CH(NH_3^+)CO_2^-$ Glutamine	بنیان R دارای عامل آمین آمید اسید گلوتامیک

اتصال‌های دیگری نیز مثل پیوندهای دی‌سولفید (S – S) می‌تواند وجود داشته باشد. چنین پیوندی در سیستین که از اتصال دو سیستئین به وجود می‌آید دیده می‌شود.

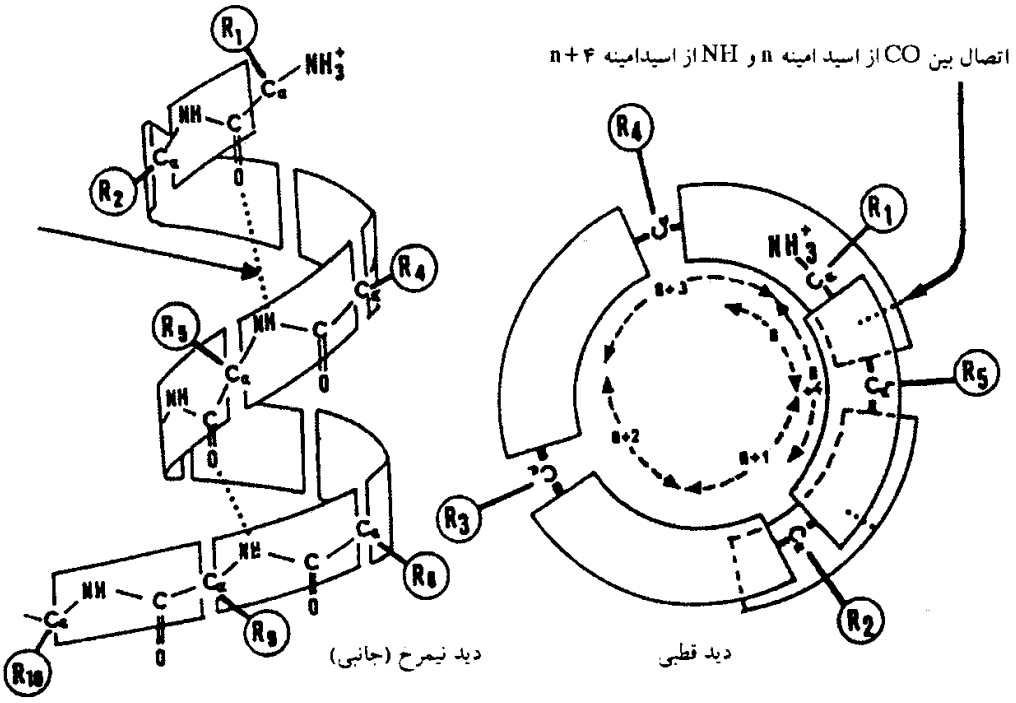


ساختمان دوم پروتئین‌ها

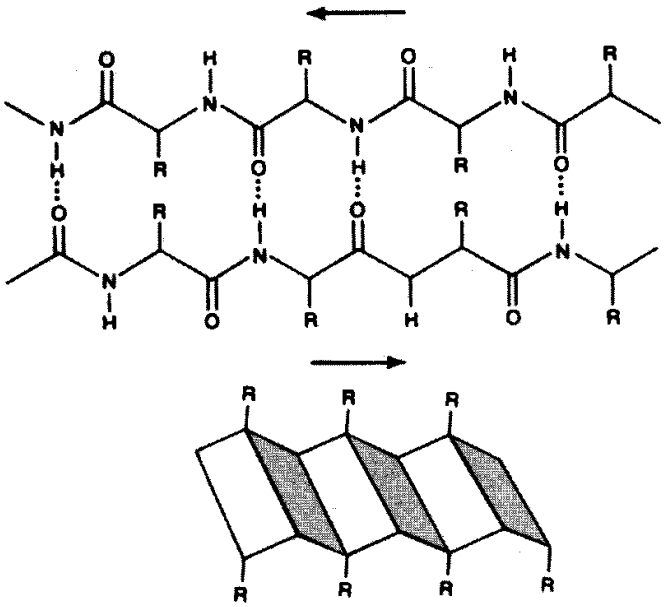
هنگامی که در ساختمان مولکول پلی‌پپتیدی علاوه بر اتصال‌های نوع پپتیدی و دی‌سولفیدی انواع دیگری از اتصال‌ها نظیر پیوندهای هیدروژنی وجود داشته باشد زنجیره دارای ساختمان دوم شده است. به عبارتی دیگر: در یک پروتئین دارای چندصد اسید امینه گاهی زنجیر پروتئینی خطی و مستقیم است اما در بیشتر موارد این زنجیر شکل‌های مختلفی به خود می‌گیرد که آن را ساختمان دوم پروتئین می‌نامند. استفاده از اشعه X امکان داده است که

برای ساختمان دوم پروتئین‌ها فرم‌های زیر شناخته شود: فرم α یا α هلیکس[1] (فرم مارپیچی): که در آن پیوندهای هیدروژنی بین بخش‌های مختلف یک زنجیره پلی‌پپتیدی (نه بین گروه‌های کناری یا R) برقرار شده و به همین دلیل زنجیره حالت مارپیچی پیدا کرده است.

تجسم ساده‌ای از فرم α هلیکس، شبیه فنری است که بین مارپیچ‌های مختلف آن پل‌هایی موجود باشد (شکل ۲-۵). این فرم از ساختمان دوم پروتئین‌ها را می‌توان در α کراتین، کلاژن (مجموعه‌ای از سه زنجیرهٔ به‌هم تابیده α کراتین)، آنزیم‌ها، سیتوکروم‌ها، هموگلوبین و بسیاری از پروتئین‌های مهم زیستی مشاهده کرد.



شکل ۵-۲. نمای ساختمان دوم پروتئین‌ها - فرم α



شکل ۶-۲. نمای ساختمان دوم پروتئین‌ها - فرم β

فرم β یا زنجیره β (فرم زیگزاگ)[2]: که در آن پیوندهای هیدروژنی بین دو زنجیره پلی‌پپتیدی کناری (R) ایجاد شده و به مجموعه دو زنجیره حالت صفحه چین‌خورده یا دارای تاشدگی‌هایی را داده است (شکل ۲-۶). این فرم از ساختمان دوم پروتئین‌ها در β کراتین، مو، ناخن، بخش‌های شاخی شده پوست و مانند آن وجود دارد. فرم β نسبت به فرم α دارای استحکام بیشتری می‌باشد و به همین دلیل در ساختمان بافت‌هایی که استحکام زیادی دارند فراوان است. از سوی دیگر فرم α که حالت ناپایداری دارد در ساختمان‌هایی که دارای فعالیت‌های زیستی بیشتری هستند و

1- α Helix 2- β. chain

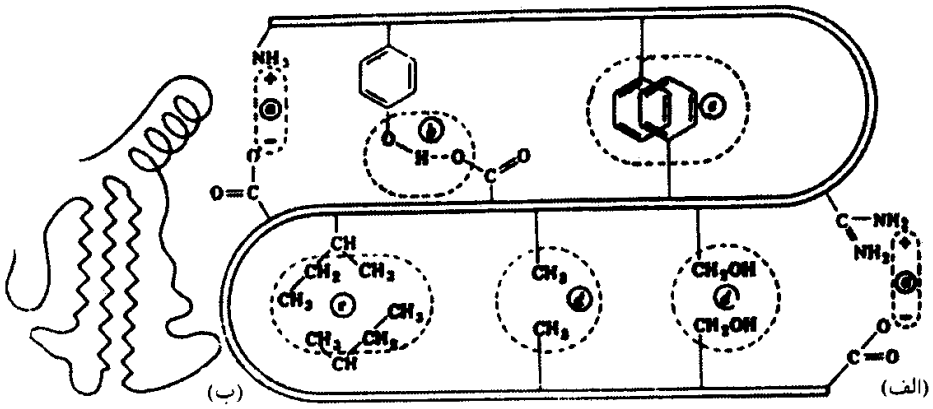
نیاز به تغییر شکل‌های زیادتری دارند (از جمله آنزیم‌ها و سیتوکروم‌ها) فراوان است.

ساختمان سوم پروتئین‌ها[1]

این ساختمان نحوه چین خوردگی یا خمیدگی زنجیره پلی‌پپتیدی در وضع سه بعدی را مشخص می‌سازد. ساختمان سوم پروتئین‌ها عامل تشکیل وضع متراکم و به شدت چین‌خوردهٔ ساختمان پروتئین‌های گویچه‌ای[2] می‌باشد.

با نگرشی دیگر وقتی در ساختمان پلی‌پپتیدی علاوه بر ساختمان منظم اول و دوم، بخش‌های اتفاقی و بی‌نظم نیز وجود داشته باشد و مولکول دارای ساختمان سه بعدی گردد، پروتئین دارای ساختمان سوم می‌شود.

بسیاری از خواص زیستی پروتئین‌ها نظیر فعالیت آنزیمی و خواص پادگنی آنها مربوط به ساختمان سوم می‌شود. در پروتئین‌های گویچه‌ای که دارای ساختمان سوم هستند، زنجیره‌های پلی‌پپتیدی به‌هم پیچ و تاب خورده و به ترتیبی قرار می‌گیرند که گروه‌های آبدوست آنها در سطح و گروه‌های آب‌گریز آنها به طرف داخل مولکول قرار می‌گیرد (فرار از مولکول‌های آب) این پروتئین‌ها دارای مقادیر مختلفی از ساختمان‌های β و α و بخش‌هایی به‌صورت نامنظم (مارپیچ نامنظم)[3] می‌باشند. ساختمان سوم پروتئین‌ها نیز مانند ساختمان دوم دارای تعدادی پیوندهای غیرکووالانسی از جمله پیوندهای یونی، هیدروژنی و پیوندهای ضعیفی است که در نتیجه برهم کنش[4] زنجیره‌های کناری یا (ب) غیرقطبی با یکدیگر ایجاد شده‌اند (نیروهای واندروالس[5])، می‌باشد (شکل ۲-۷).

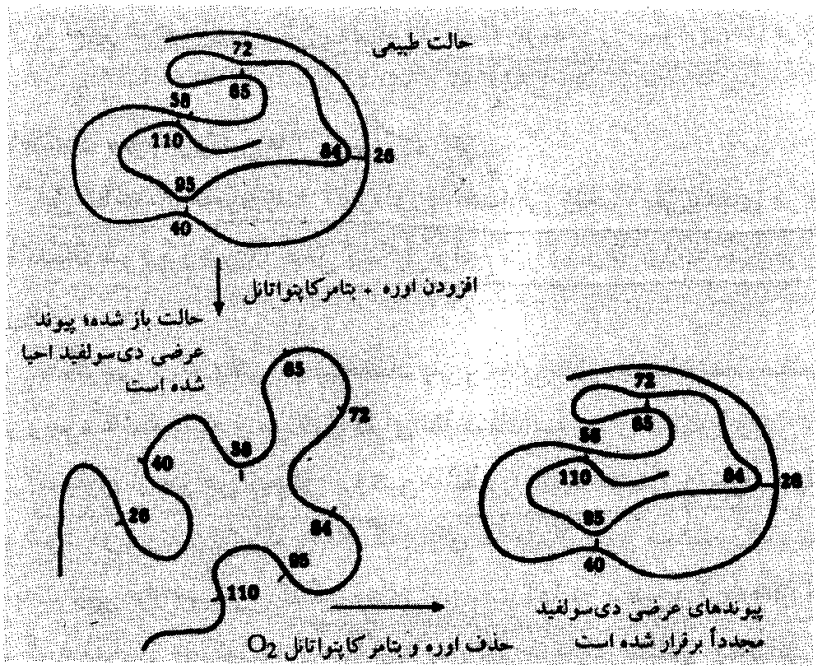


شکل ۲-۷. ساختمان سوم پروتئین. الف - وجود بخش α، β و بخش‌های نامنظم ب-انواع پیوندهای غیرکووالانسی در ساختمان سوم پروتئین

به علت وجود اسید امینه آب‌گریز در پروتئین‌ها (حدود نیمی از اسیدهای امینه آب‌گریز هستند) و به دلیل این که این اسیدهای امینه از مولکول‌های آب فرارکرده، به طرف داخل مولکول پروتئین می‌روند، بخش‌های آب‌گریز، بر یکدیگر تأثیر متقابل داشته، در تعیین شکل پروتئین اهمیت دارند و نیز موجب به‌هم فشردگی بیشتر مولکول پروتئین می‌شوند. گرمای زیاد یا سایر شرایط غیرطبیعی موجب می‌شود که پروتئین ساختمان طبیعی خود را از دست بدهد[6] این عمل با از دست دادن ساختمان سوم و از دست رفتن فعالیت زیستی پروتئین همراه است (شکل ۲-۸).

گاهی پدیدهٔ غیرطبیعی شدن برگشت‌پذیر است و پروتئین می‌تواند با حذف شرایط غیرطبیعی دوباره ساختمان و خواص خود را پیدا کند. این پدیده را بازگشت به حالت طبیعی[7] پروتئین گویند.

1- Tertiary structure 2- Globular proteins 3- Random coil
4- Interaction 5- Vanderwales forces 6- Denaturation 7- Renaturation



شکـــــل ۲-۸. تغییر حالت در ساختمان سوم پروتئین

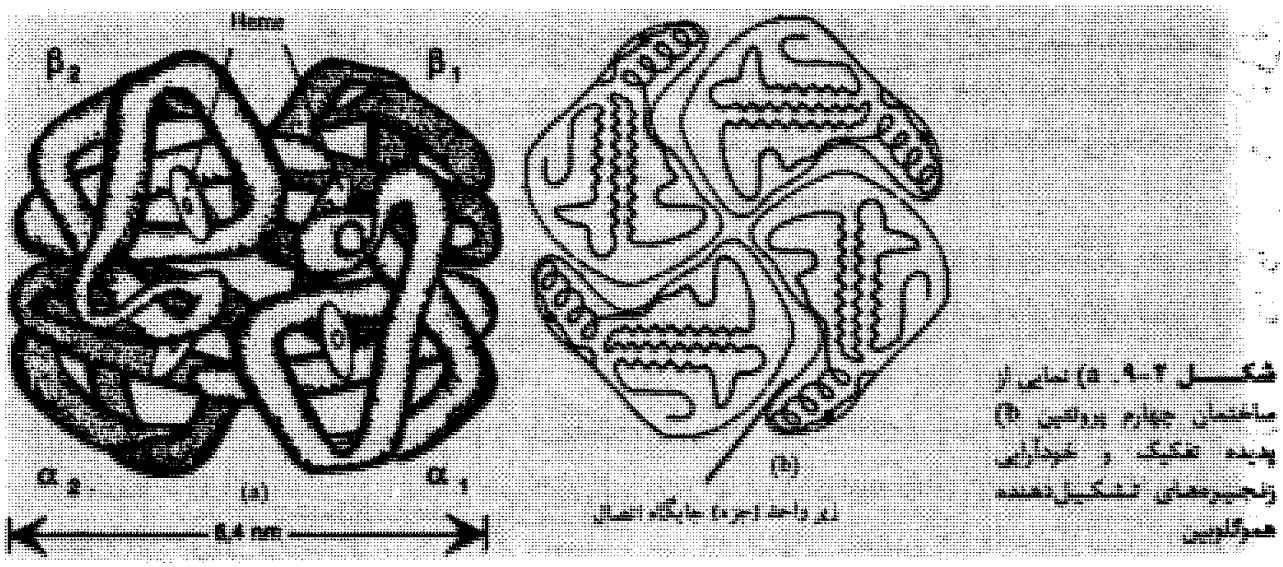
ساختمان چهارم[1] پروتئین‌ها

اساس پدیده خود آرایی[2]: بر خلاف ساختمان اول، دوم و سوم که به‌طور معمول از یک زنجیر پلی‌پپتیدی تشکیل می‌شود، ساختمان چهارم از دو یا چند زنجیر ساخته شده است. این زنجیرها ممکن است یکسان یا مختلف باشند. در هر دو حال زنجیرها به وسیلهٔ پیوندهای ضعیفی (پیوندهای غیرکووالانسی) به‌هم متصل می‌شوند. به‌عنوان مثال، مولکول هموگلوبین از چهار زنجیر پلی‌پپتیدی یا چهار زیر واحد[3] ساخته شده که دوتای آنها زنجیرهای α و دوتای دیگر زنجیرهای β هستند. اوره می‌تواند موجب گسستن هموگلوبین به دو زنجیر α و دو زنجیر β گردد. با دور شدن اوره از محیط هموگلوبین، اتصال مجدد این زنجیرها صورت می‌گیرد. اتصال بین زنجیرهای پلی‌پپتیدی در ساختمان چهارم پروتئین‌ها بسیار اختصاصی است و تنها بین دو نیمه مولکول (مولکول‌های نصف شده) می‌تواند صورت پذیرد. این پدیده اساس خودآرایی[4] است که زیر بنای سازمان یافتن برخی از اندامک‌های سلولی است (شکل ۲-۹).

این عمل در برخی ساختمان‌های سلولی خیلی پیچیده مثل غشاء سلولی، میکروتوبول‌ها و مانند آن نیز صورت می‌گیرد. برخی از این ساختمان‌ها می‌توانند انواع مختلفی از مولکول‌ها (لیپیدها و پروتئین‌ها) را بسازند. بسیاری از آنزیم‌ها و همچنین پروتئین‌های دیگری که وزن مولکولی بیشتر از ۵۰۰۰۰ دالتون دارند احتمالاً دارای ساختمان چهارم می‌باشند. آلدولازیا وزن مولکولی ۱۵۰٫۰۰۰ دالتون یکی از پروتئین‌هایی است که می‌تواند در PH اسیدی به دو زیر واحد ۵۰٫۰۰۰ دالتونی تقسیم شود. در PH خنثی دو زیر واحد می‌توانند دوباره به‌هم چسبیده به وضع اول بازگردند.

در حال حاضر به کمک روش‌های مختلف تجزیه تدریجی پروتئین‌ها می‌توان طرز ارتباط (نوع پیوند) اسیدهای امینه را در آنها مشخص کرد. با استفاده از چنین روش‌هایی اولین‌بار، ساختمان انسولین مشخص شد (سنجر[5]، ۱۹۴۵). این مولکول از دو زنجیر ساخته شده است: زنجیر A، ۲۱ اسید امینه و زنجیر B، ۳۰ اسید امینه دارد.

1- Quarternary Structure 2- Auto - assamblage 3- Sub - unit
4- Autoassemblage 5- Sanger



شکل ۲-۹. a) نمایی از ساختمان چهارم پروتئین b) پدیده تقلیدی و غیرارثی زنجیرهای تشکیل‌دهنده هموگلوبین

دو زنجیر به وسیلهٔ پل‌های دی‌سولفید (S – S) به‌هم مربوط می‌شوند. پس از آن، ساختمان پروتئین‌های دیگری مثل ریبونوکلئاز، هموگلوبین، سیتوکروم C، لیزوزیم، تریپسینوژن و مانند آن مشخص شد. در مولکول پروتئین، اسیدهای امینه شبیه گره‌های روی یک طناب قرار دارند و طرز ردیف شدنشان اهمیت زیادی دارد. به‌عنوان مثال خصوصیات آنزیمی بعضی پروتئین‌ها مربوط به بخشی است که آن را جایگاه فعال[1] می‌نامند و در آن ردیف شدن خاص اسیدهای امینه موجب بروز این اختصاصات می‌شود.

پیوندها در مولکول پروتئینی

در ساختمان مولکول پروتئین پیوندهای گوناگونی وجود دارد. ساختمان نخستین به وسیلهٔ پیوندهای شیمیایی یا کووالانسی پپتیدی مشخص می‌شود. پیوندهای دی‌سولفید (S – S) که از نوع پیوندهای شیمیایی کووالانسی هستند نیز می‌تواند در ساختمان اول بین شبکه‌های سیستین ایجاد شود. برای مثال در مولکول انسولین و یا ریبونوکلئاز چنین پیوندهایی دیده می‌شود. در ساختمان‌های دوم و سوم پیوندهای ضعیف‌تری وجود دارند (شکل ۲-۹). این پیوندها را می‌توان به‌صورت زیر تقسیم‌بندی کرد:

۱- **پیوندهای یونی یا الکتروستاتیک:** این پیوندها، یون‌های مثبت و منفی را که فاصله‌ای در حدود ۲ تا ۳ آنگستروم دارند به‌هم مربوط می‌سازند (شکل ۲-۷، a).

۲- **پیوندهای هیدروژنی:** پیوندهای ضعیف‌تر از پیوندهای یونی هستند و عمل آنها در فاصله ۲/۵ تا ۳/۲ آنگستروم صورت می‌گیرد. این پیوندها اساساً پیوندهای الکترواستاتیکی هستند که بین دو اتمی که شدیداً منفی‌اند مثل کربن یا ازت یا اکسیژن نوعی پل می‌سازند. (شکل ۲-۷، b)

۳- **پیوندهای خیلی ضعیف‌تر:** این پیوندها یا از عمل متقابل زنجیرهای جانبی غیرقطبی یا در نتیجهٔ فرار از مولکول‌های حلّال ایجاد شده‌اند (شکل ۲-۷، c). برای مثال نیروهای واندروالس نوعی از این پیوندهای ضعیف است که از عمل متقابل زنجیرهای جانبی غیرقطبی ایجاد می‌شود. (شکل ۲-۷، d)

1- Active site

بار الکتریکی پروتئین‌ها

تمام اسیدهای امینه موادی آمفوتر هستند. یعنی هم گروه‌هایی با بار مثبت و هم گروه‌هایی با بار منفی دارند (COOH− و NH_2−). از آنجا که این گروه‌ها به منظور تشکیل پیوندهای پپتیدی با هم ترکیب می‌شوند، چنانچه اسیدهای امینه با دو عامل کربوکسیل یا با دو عامل آمینی وجود نمی‌داشت تنها عوامل COOH− و NH_2− انتهایی آزاد می‌ماند. چنین مولکول‌هایی می‌توانند به‌صورت زیر تفکیک (تجزیه) شوند:

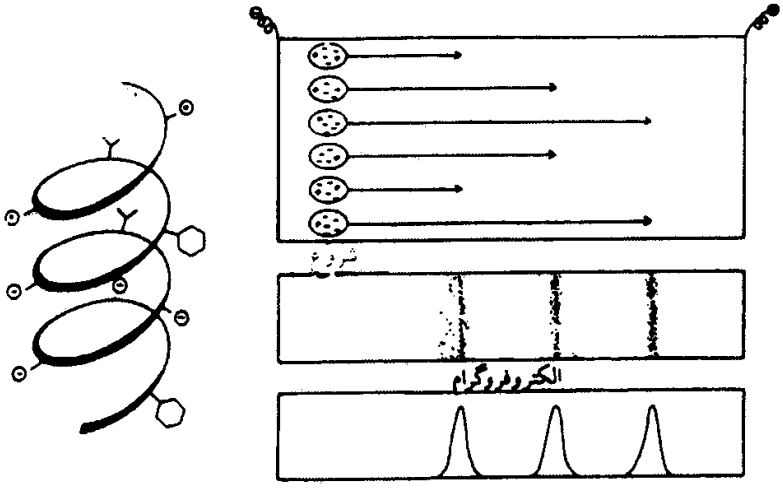
۱- گروه‌های اسیدی می‌توانند پروتون‌های خود را از دست داده و دارای بار منفی شوند. چنین تفکیکی در اسیدهای امینه دارای دو عامل کربوکسیل مثل اسید آسپارتیک و اسید گلوتامیک وجود دارد که گروه کربوکسیل آزاد آن به‌صورت H^+ و COO^-− تجزیه می‌شود.

۲- گروه‌های بازی، با کسب پروتون‌ها دارای بار مثبت می‌شوند (H^+ و NH_2−). چنین وضعی در اسیدهای امینه دارای دو گروه بازی مثل لیزین یا آرژینین صورت می‌گیرد که در آنها گروههای امینه آزاد می‌توانند دارای بار مثبت شوند.

تمام این عوامل یون‌ساز و نیز عوامل کربوکسیل یا آمین آزاد انتهایی به پروتئین‌ها خصوصیات الکتریکی مشخص و امکان انجام واکنش‌های اسید - باز هستند.

شکل ۲-۱۰ یک مولکول پروتئینی با بارهای مختلف راکه بر روی زنجیرهای جانبی و همچنین زنجیر بدون بار آن قرار دارند، نشان می‌دهد. بار کلی یک مولکول پروتئینی برابر با مجموع تمام بارهای مستقل شبکه‌های مختلف آن است. چون تفکیک ریشه‌های مختلف اسیدی یا بازی در رابطه با تراکم‌های مختلف یون هیدروژن محیط است، PH اثر شدیدی بر بار الکتریکی کلی مولکول دارد. در محیطی اسیدی، گروه‌های امینه یون‌های هیدروژن را جذب کرده و سپس به‌صورت باز عمل می‌کنند؛ ($-NH_2 + H^+ \rightarrow -NH_3^+$). بر عکس در محیطی قلیایی، گروه‌های کربوکسیل تفکیک می‌شوند؛ ($-COOH \rightarrow COO^- + H^+$) و پروتون‌ها را در محیط آزاد می‌کنند. برای هر پروتئین، PH مشخصی وجود دارد که در آن جمع بارهای مثبت و منفی برابر صفر است. این PH را نقطه ایزوالکتریک[1] می‌نامند و آن را با (P_I) مشخص می‌کنند. در نقطه ایزوالکتریک، چنانچه پروتئین‌ها در یک میدان الکتریکی قرار گیرند، بسوی هیچ یک از قطبین نمی‌روند. در PH پایین‌تر از نقطه ایزوالکتریک بسوی کاتد و در PH بالاتر از آن به طرف آند می‌روند. این جابه‌جایی، الکتروفورز نامیده می‌شود. با استفاده از روش الکتروفورز پروتئین‌های مختلف از یکدیگر تفکیک می‌شوند.

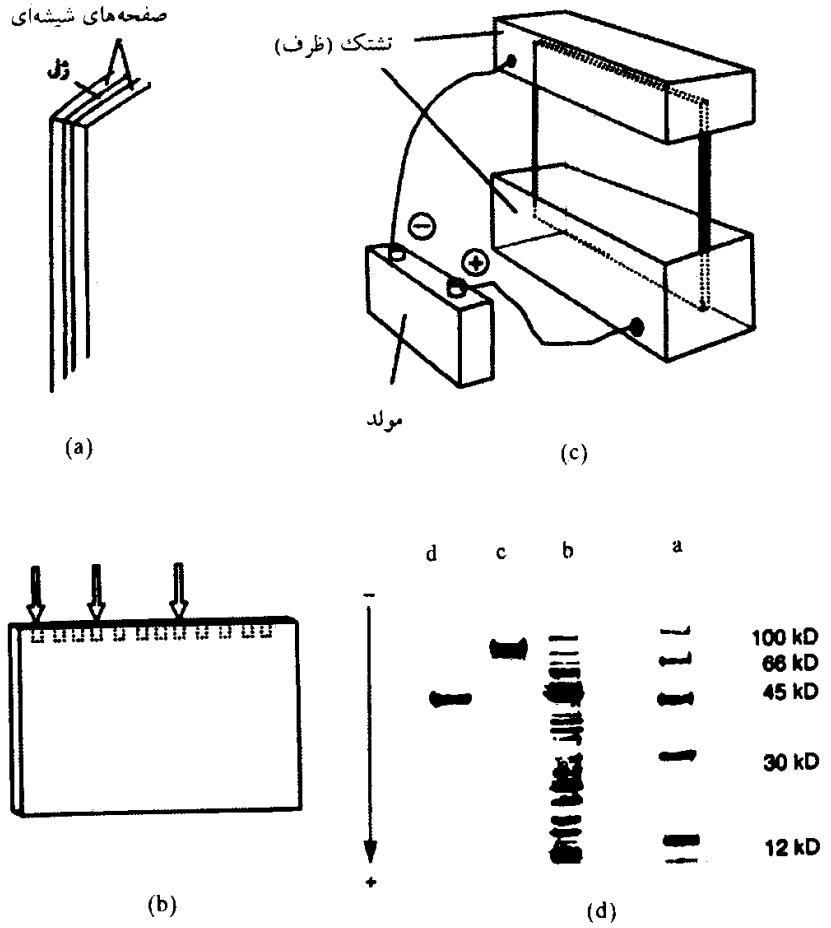
الکتروفوروگرام[2] با رنگ‌آمیزی قابل رؤیت شده و تراکم پروتئین‌ها به کمک یک فوتومتر محاسبه شده است.



شکل ۲-۱۰. طرح مشخص‌کننده الکتروفورز. سمت چپ بخشی از یک زنجیرهٔ α است که محل برخی از ریشه‌های دارای بارهای الکتریکی را نشان می‌دهد. در سمت راست پروتئین‌هایی که بار الکتریکی متفاوتی دارند در محل خاص خود قرار گرفته‌اند. در یک زمان موردنظر مثلاً ۱۵ ساعت تا نقاطی که به وسیلهٔ فلش‌ها مشخص شده‌اند جابه‌جا می‌شوند. الکتروفروگرام[3] با رنگ‌آمیزی قابل رؤیت شده و تراکم پروتئین‌ها به کمک یک فوتومتر محاسبه شده است.

1- Isoelectric Point 2- Electrophrogram 3- Electrophorogram

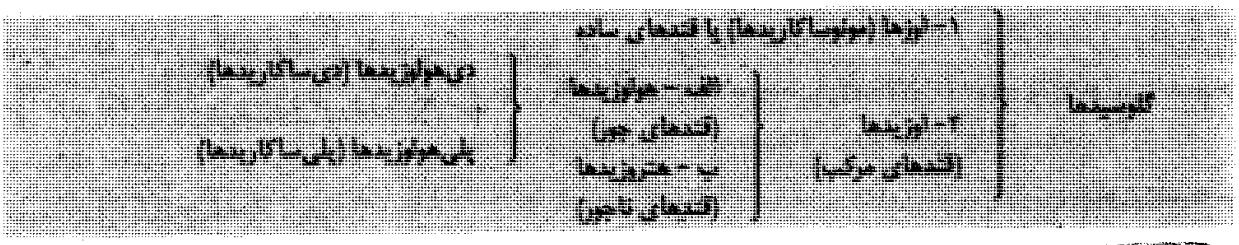
شکل ۱۱-۲ طرح ساده‌ای از دستگاه الکتروفورز و نتیجه کار آن در جداسازی پروتئین‌ها روی صفحه ژل را نشان می‌دهد.



شکل ۲-۱۱. الکتروفورز روی صفحه ژل. **a)** موقعیت ژل بین دو صفحه شیشه‌ای. **b)** گودال‌هایی در قسمت بالای ژل (پیکان‌ها) که در آن پروتئین‌ها قرار می‌گیرند (این پروتئین‌ها پس از دناتوراسیون با استفاده از مولفات دودسیل سدیم دارای بار منفی شده‌اند. **c)** وضعیت ژل که جریان الکتریکی بین دو مخزن دارای محیط تامپونی را به‌هم می‌پیوندد. **d)** در پایان الکتروفورز، پروتئین‌ها به‌صورت نوارهایی از هم جدا شده‌اند که موقعیت آنها به سرعت جابه‌جائیشان در میدان الکتریکی بستگی دارد.

گلوسیدها، قندها یا هیدرات‌های کربن

گلوسیدهامواد آلی هستند که در ترکیبشان اغلب ۳ عنصر کربن، هیدروژن و اکسیژن و گاهی عناصر دیگری مثل ازت، فسفر و مانند آن وجود دارد. فرمول عمومی آنها $C_n(H_2O)_m$ است و به همین دلیل در گذشته آنها را هیدرات‌های کربن نامیده‌اند. این مواد منبع انرژی برای سلول‌های گیاهی و جانوری هستند. همچنین در ساختمان دیواره بسیاری از سلول‌های گیاهی، به‌عنوان بخش محافظت‌کننده شرکت دارند. بافت‌های جانوری اغلب گلوسید کمتری از بافت‌های گیاهی دارند. به‌طور کلی گلوسیدها را به‌صورت زیر تقسیم‌بندی می‌کنند:

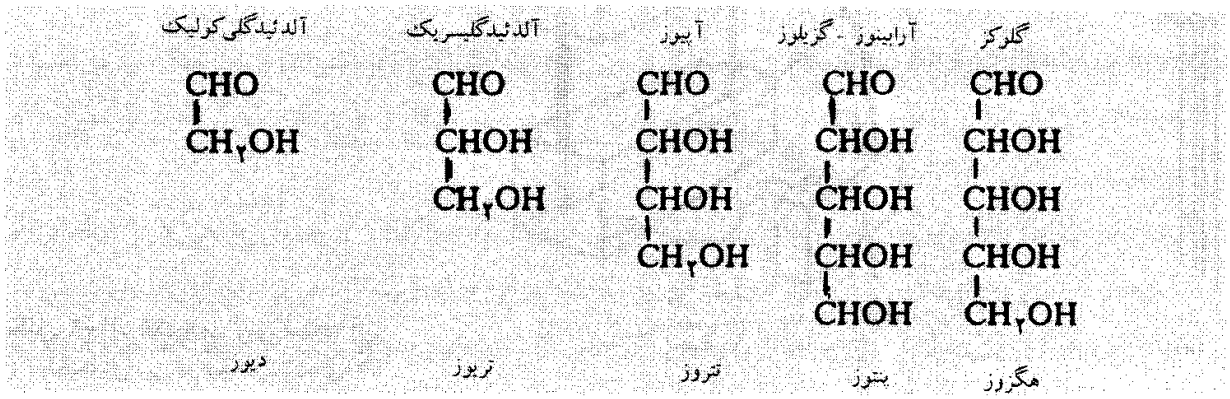


مونوساکاریدها (اوزها)[1]: قندهای ساده‌اند که از کربن، اکسیژن و هیدروژن ساخته شده‌اند، فرمول عمومی آنها $C_n(H_2O)_m$ است. در آب محلول و در اتر نامحلولند، قابلیت تبلور دارند و در ساختمانشان اغلب یک عامل

1- Oses

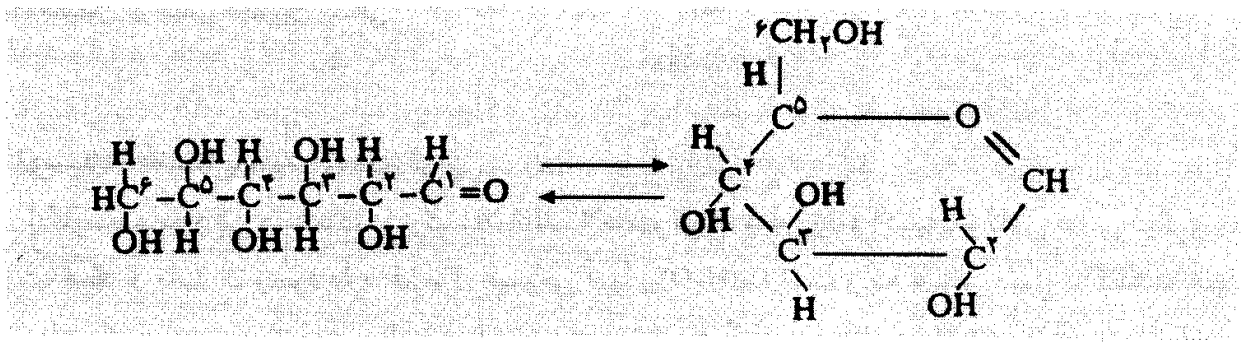
احیاکننده وجود دارد. قندهای ساده را به‌طور کلی به دو گروه: آلدوزها[1] با فرمول عمومی $CH_2OH-(CHOH)_n-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-CH_2OH$ و ستوزها یا کتوزها[2] با فرمول عمومی $CH_2OH-(CHOH)_n\,O-\overset{\overset{H}{|}}{C}=O$ تقسیم می‌کنند.

قندهای ساده را از روی تعداد کربنشان نیز نام‌گذاری می‌کنند:



مهم‌ترین الدوزها و ستوزها که در اعمال زیستی نقش عمده‌ای دارند عبارت‌اند از: ریبوز، دزوکسی ریبوز که در ساختمان اسیدهای نوکلئیک (DNA و RNA) واردند، ریبولوز (از ستوزها) در فتوسنتز اهمیت دارد.

گلوکز به‌عنوان مهم‌ترین منبع انرژی سلولی محسوب می‌شود. گالاکتوز در شیر و در ترکیب لاکتوز وارد است، فروکتوز یا لولز[3] در ترکیب ساکاروز وجود دارد. کربن شماره ۱ «Anomeric carbon» نامیده می‌شود. با خواص این کربن، دو انتهای مولکول می‌تواند با تشکیل پیوندهایی ترکیب شده و مولکول را به حالت حلقوی درآورد.



هاورت[4] برای مونوساکاریدها ساختمان حلقوی پیشنهاد کرده است. این ساختمان به ویژه در مورد هگزوزها به‌صورت مدل صندلی (Chair) پیشنهاد شده که دارای ثبات بیشتری است و شکل غالب مولکول در محیط‌های آبکی می‌باشد. مدل‌های دیگر مثلاً مدل قایق نیز برای این قندها پیشنهاد شده است.

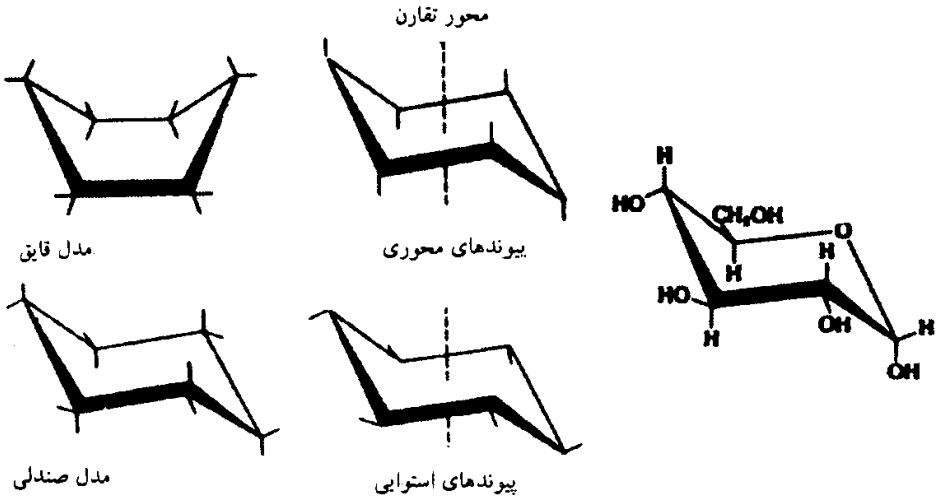
هولوزیدها[5]: شامل کلیه ترکیباتی هستند که از دو یا چند مولکول قند ساده ساخته شده و در اثر هیدرولیز دو یا چند مولکول قند ساده به وجود می‌آورند. فرمول عمومی آنها $(C_6H_{12}O_6)_n-(n-1)H_2O$ است و به حسب تعداد n ترکیبات مختلف زیر را می‌سازند:

الف - دی‌ساکاریدها یا دی‌هولوزیدها $n=2 \rightarrow C_{12}H_{22}O_{11}$

ب - تری‌هولوزیدها $n=3 \rightarrow C_{18}H_{32}O_{16}$

ج - تتراهولوزیدها $n=4 \rightarrow C_{24}H_{42}O_{21}$

1- Aldoses 2- Ketoses 3- Levulose 4- Haworth 5- Holosides



شکل ۲-۱۲. نمونه‌هایی از مدل‌های پیشنهادی برای هگزوزها

د - (n=۵) یا بیشتر را پلی‌هولوزید یا پلی‌ساکارید نامند.

الف - دی ساکاریدها: فرمول عمومی آنها $C_{12}H_{22}O_{11}$ است، از ترکیب دو مونوساکارید ساخته شده و در اثر هیدرولیز به دو مولکول قند ساده تبدیل می‌شوند. نمونه‌های مهم آن ساکارز، ترهالوز، لاکتوز و مالتوز است.

ساکاروز در بسیاری از گیاهان به‌خصوص در ساقه نیشکر وجود دارد. هیدرولیز ساکارز موجب ایجاد یک مولکول گلولز و یک مولکول می‌شود.

ساکاروز $\xrightarrow{\text{هیدرولیز}}$ گلوکز + لولز

ترهالوز در بعضی قارچ‌ها مثل آگاریکوس موسکاروم[1] وجود دارد هیدرولیز آن تولید دو مولکول گلوکز می‌کند.

ترهالوز $\xrightarrow{\text{هیدرولیز}}$ گلوکز + گلوکز

لاکتوز در شیر پستانداران وجود دارد. در اثر هیدرولیز تولید یک مولکول گلوکز و یک مولکول گالاکتوز می‌کند.

لاکتوز $\xrightarrow{\text{هیدرولیز}}$ گلوکز + گالاکتوز

مالتوز در جوانه‌های گیاهی و در برخی از سلول‌های جانوری وجود دارد یا از هیدرولیز گلیکوژن و نشاسته[2] ایجاد می‌شود. دراثر هیدرولیز به دو مولکول گلوکز تبدیل می‌شود.

مالتوز $\xrightarrow{\text{هیدرولیز}}$ گلوکز + گلوکز

ب- تری هولوزیدها: از ترکیب سه مولکول قند ساده ایجاد شده‌اند. نمونه‌های مهم آنها ژانسیانوز (در ریشه گیاه ژانتیان[3]) و رافینوز (در ریشه چغندر) است.

ج - تتراهولوزیدها: از چهار مولکول قند ساده ساخته شده‌اند. نمونه آنها استاکیوز[4] است. از نظر زیستی اهمیت چندانی ندارند.

د - پلی‌ساکاریدها (پلی‌هولوزیدها): از ترکیب تعداد زیادی مونوساکارید تشکیل شده‌اند.

1- Agaricus muscarum 2- Amidon 3- Jention 4- Stachiose

فرمول عمومی آنها $(C_6H_{10}O_5)_n$. در اثر هیدرولیز به وسیله آنزیم‌های خاص، یا تحت تأثیر اسیدها و حرارت تجزیه شده و چند مولکول قند ساده می‌سازند. مهم‌ترین آنها عبارت‌اند از:

نشاسته: قند ذخیره‌ای مهم گیاهان است به‌خصوص در دانه‌ها (گندم، جو، ذرت و مانند آن) و در غده‌ها (سیب زمینی) ذخیره می‌شود. محل ذخیره آن در سلول‌ها در آمیلوپلاست‌ها می‌باشد. نشاسته در آب سرد نامحلول است، در آب گرم متورم می‌شود و چسب نشاسته را می‌سازد.

نشاسته با یُد به رنگ آبی در می‌آید. حرارت موجب زایل‌شدن این رنگ است. نشاسته که یکی از محصولات فتوسنتز است خود از دو بخش آمیلوز[1] به‌صورت زنجیره خطی و آمیلوپکتین[2] دارای انشعاب ساخته شده است. هیدرولیز نشاسته ابتدا تولید دکسترین و مالتوزو در نهایت (هیدرولیز کامل) تولید مولکول‌های گلوکز را می‌نماید.

گلیکوژن: قسمت اعظم قندذخیره‌ای سلول‌های جانوری است و به‌خصوص در سلول‌های عضلانی و کبد ذخیره می‌شود. گلیکوژن در آب محلول و در الکل نامحلول است. با یُد به رنگ قرمز قهوه‌ای در می‌آید. ساختمان کلی آن شبیه ساختمان نشاسته است ولی تعداد گلوکزهای موجود در آن کمتر است. در ساختمان مولکولی آن حدود سی هزار گلوکز وجود دارد. گلیکوژن در سلول‌های زنده قابل مشاهده نیست ولی بعد از تثبیت بافت‌ها در سلول‌ها رسوب می‌کند و قابل تشخیص می‌شود. هیدرولیز کامل آن تولید مولکول‌های گلوکز می‌کند.

سلولز: در گیاهان به ویژه در ساختمان دیوارهٔ اسکلتی سلول‌های گیاهی وجود دارد، در آب و در حلال‌های مواد آلی حل نمی‌شود. حلال آن محلول شوایتزر (محلول آمونیاکی اکسید مس) است و پس از حل شدن در این حلال، در محیط اسیدی رسوب می‌کند (ابریشم مصنوعی) هیدرولیز ممتد سلولز در نهایت تولید مولکول‌های گلوکز را می‌کند.

در گیاهان سلولز اغلب همراه گزیلان‌ها و ترکیبات پکتیکی در ساختمان دیواره‌های سلولزی وجود دارد.

مانان‌ها: پلی‌ساکاریدهایی هستند که در خرما و گیاهان تیره پروانه آسا وجود دارند. در اثر هیدرولیز به کمک اسیدها تولید مانوز می‌کنند.

هتروزیدها (قندهای ناجور): در ساختمان این گروه از مواد گلوسیدی علاوه بر یک یا چند مولکول قند ساده، مواد غیرقندی نیز وجود دارند و به همین دلیل در اثر هیدرولیز یک یا n مولکول قند ساده و مواد غیرگلوسیدی تولید می‌کنند. هتروزیدها در تشکیلات مولکولی به‌خصوص به‌عنوان مواد بین سلولی اهمیت دارند. د رگیاهان فراوانند و آنها را به حسب نوع ماده غیرگلوسیدی که دارند نامگذاری می‌کنند. نمونه‌های مهم آنها عبارتند از:

الف - گلیکوپروتئین‌ها[4]: ترکیباتی مرکب از پروتئین‌ها و یک گروه پیشگام (پروستاتیک) گلوسیدی‌اند و به دو گروه عمده درون سلولی و ترشحی تقسیم می‌شوند. گلیکوپروتئین‌های درون سلولی در غشاء سلول وجود دارند و اعمال مهمی را از نظر برهم‌کنش وتشخیص سلول‌ها بر عهده دارند. گلیکوپروتئین‌های ترشحی از سلول‌های مختلف ترشح می‌شوند: گلیکوپروتئین‌های پلاسما از جگر، تیروگلوبولین‌ها از غده تیروئید و غیره.

به‌طور کلی بخش گلوسیدی گلیکوپروتئین‌ها در ایجاد خواص فیزیکوشیمیایی آنها (مثل تأثیر چسبندگی موسین در محافظت و لغزنده ساختن غشاء مخاطی دیواره لوله گوارش) و اعمال متقابل مولکول غشاء (مثل: خواص ایمنی سطح اریتروسیت‌ها) و در اعمال متقابل غشاء - غشاء (در تماس بین سلول‌ها با یکدیگر) اهمیت زیادی دارد.

ب - موکوپلی‌ساکاریدها: هتروزیدهایی هستند که علاوه بر قندهای ساده، در ترکیبشان هگزوز آمین نیز وجود دارد مثل

1- Amylose 2- Amylopectine 3- Mannanes 4- Glycoproteines

هپارین[1] که ماده‌ای ضد انعقاد است و کیتین که در ساختمان پوشش حشرات فراوان است. بعضی موکوپلی‌ساکاریدها به‌صورت ترکیب با پروتئین‌ها، آنتی‌ژن‌های گروه‌های خونی را می‌سازند.

ج -گلوکزیدهای ناجور حلقهٔ اکسیژن‌دار: بخش غیرگلوسیدی آنها، کومارین است، نمونه مهم آنها آنتوسیانین‌ها (مواد رنگی سمی) گل‌ها است.

د -گلوکزیدهای سیانوژنی: بخش غیرگلوسیدی آنها، اسید سیانیدریک CNH و مواد فسفردار است. نمونه مهم آنها آمیگدالین (آمیگدالوزید) بادام تلخ است.

هـ-گلوکوزیدهای گوگردی: بخش غیرگلوسیدی آنها ترکیبات دارای گوگرد است. نمونه مهم آن سینیگروزیدها[2] است که در نعناع وجود دارد.

چربی‌ها یا لیپیدها[3]

لیپیدها استرهای اسیدهای آلی با وزن مولکولی زیاد به اسم اسیدهای چرب و الکل‌ها هستند. لیپیدها در آب نامحلولند ولی در حلال‌های مواد آلی (حلال‌های غیرقطبی) مثل اتر، کلروفرم، بنزن، سولفور کربن حل می‌شوند. لیپیدها در مولکول خود دارای زنجیر طویل هیدروکربنی غیرحلقوی و یا حلقه‌های بنزنی هستند به همین دلیل قطبی نیستند و در نتیجه نسبت به مولکول‌های قطبی آب از خود تمایلی نشان نمی‌دهند و آنها را آب‌گریز[4] گویند. در برخی موارد مولکول‌های چربی به مولکول‌های قطبی دیگری متصل می‌شوند، در این حالت مولکول چربی آبدوست[5] خواهد بود.

اعمال مهم لیپیدها از نظر کارهای زیستی

۱- لیپیدها در ساختمان غشاء سلولی شرکت دارند و حدود ۵۰٪ وزن غشاء را می‌سازند. به علت عدم حل شدنشان در آب به غشاء استحکام می‌بخشند، د رساختمان گیرنده‌های موجود در سطح سلول شرکت می‌کنند. این گیرنده‌ها بین سلول و محیط ارتباط برقرار می‌کنند مثل گانگلیوزیدها[6] ۲- قابلیت نفوذ سلولی را تنظیم کرده، در انتقال مواد از راه غشاء سلولی تأثیر می‌گذارند ۳- منبع اصلی ذخیره انرژی هستند ۴- به‌صورت مواد مومی در حفاظت جاندار مؤثرند ۵- به‌صورت تری‌گلیسریدها در بافت چربی ذخیره می‌شوند و اکسیداسیون آنها تا ۵۰٪ انرژی سلول را تأمین می‌کند ۶- در کنترل متابولیسم سلولی مؤثرند (مثل: استروئیدها که میزان متابولیسم گلوسیدها را کنترل می‌کنند.

اساس ساختمان لیپیدها را اسیدهای چرب و الکل‌ها تشکیل می‌دهند.

اسیدهای چرب[7]: اسیدهای آلی هستند که تعداد اتم‌های کربن در مولکول آنها زوج، زیاد و حداقل ۴ است و به دو دسته تقسیم می‌شوند:

اسیدهای چرب اشباع شده با فرمول کلی $C_nH_{2n}O_2$ مثل اسید پالمیتیک $C_{15}H_{31} - COOH$ یا اسید استئاریک $C_{17}H_{35} - COOH$ و اسیدهای چرب اشباع نشده با فرمول کلی $C_nH(2n-2)O_2$ مثل اسید اولئیک $C_{17}H_{33} - COOH$.

کربن شماره ۱، گروه کربوکسیل می‌باشد، با افزوده شدن تعداد کربن، خواص غیرقطبی و نقطه ذوب اسید چرب

1- Heparin 2- Sinigrosides 3- Lipides 4- Hydrophobe 5- Hydrophile
6- Ganglyosides 7- Faty acides

افزایش می‌یابد.

اسیدهای چرب اشباع نشده دارای اتصال (پیوند) دوگانه به تعداد ۱ یا بیشتر هستند که موقعیت اتصال دوگانه ایزومرهای مختلف «سیس» $\begin{matrix} R & & R \\ | & & | \\ C & = & C \\ | & & | \\ H & & H \end{matrix}$ و «ترانس» $\begin{matrix} H & & R \\ | & & | \\ C & = & C \\ | & & | \\ R & & H \end{matrix}$ را ایجاد می‌کند. با افزایش تعداد اتصال‌های مضاعف امکان حل شدن آنها در آب افزایش می‌یابد، و نقطه ذوب‌شان کم می‌شود.

اسیدهای چرب زیستی (اصلی) به وسیله پستانداران سنتز نمی‌شوند ولی برای آنها ضروری هستند. این اسیدهای چرب شامل اسیدلینولئیک $C_{17}H_{31} - COOH$ دارای دو اتصال مضاعف، اسیدلینولنیک $C_{17}H_{29} - COOH$ با سه اتصال مضاعف و اسید آراشیدونیک $C_{19}H_{31} - COOH$ دارای چهار اتصال مضاعف می‌باشند. این ترکیبات باید از راه جیره غذایی تأمین شوند.

الکل‌ها: ترکیبات آلی هستند که در ساختمانشان لااقل یک عامل الکلی OH − وجود دارد الکل‌هایی که در ترکیب لیپیدها شرکت دارندبه ویژه عبارت‌اند از:

الف - گلیسرین (گلیسرول): یک الکل سه ظرفیتی است به فرمول $\begin{matrix} CH_2OH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OH \end{matrix}$ بنابراین می‌تواند با ۱ تا ۳ مولکول از اسیدهای چرب ترکیب (استری) شود.

ب - کولین: نمونه دیگر الکل‌هایی که در ترکیب لیپیدها وارد است. کولین در حقیقت یک آمینوالکل است که به فراوانی در سلول‌های بدن انسان وجود دارد فرمول آن $CH_2-OH-CH_2-N(CH_3)_3-OH$ است.

ج - استرول‌ها: الکل‌های دارای مولکول‌های حلقوی و پیچیده‌اند مثل کلسترول که در خون وجود دارد، ارگوسترول در سلول‌های گیاهی مثل چاودار و در سلول‌های پوست بدن موجود است و استیگما استرول که در سویا و باقلا یافت می‌شود.

در طبیعت استرول‌ها بیشتر به‌صورت ترکیب با اسیدپالمیتیک یا اسید استئاریک دیده می‌شوند (استرید). استرول‌ها به فراوانی در موجودات زنده به‌صورت مخلوط در هورمون‌های جنسی و ویتامین‌های D وجود دارند.

تقسیم‌بندی لیپیدها

به‌طور معمول لیپیدها را به‌صورت زیر تقسیم‌بندی می‌کنند:

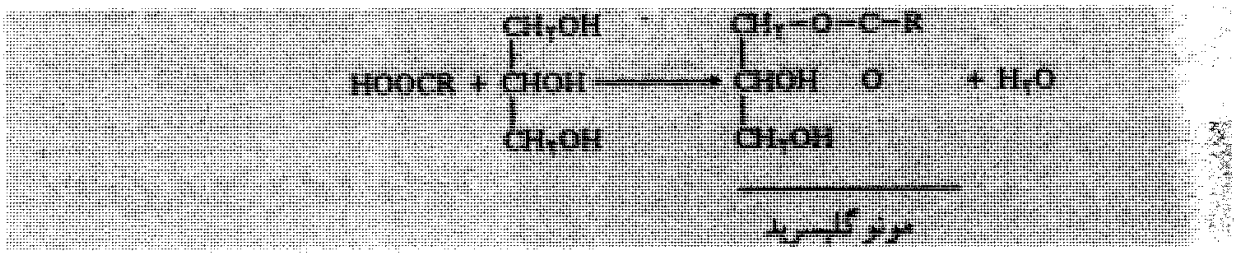
۱- لیپیدهای ساده (در ساختمانشان تنها C، H و O وجود دارد) و عبارت‌اند از: گلیسریدها، سریدها (موم‌ها)، استریدها و اتولیدها[1]

۲- لیپیدهای مرکب (در ساختمانشان علاوه‌بر C، H و O عناصر دیگری به ویژه N، P، S و مانند آن نیز وجود دارند). مهم‌ترین آنها عبارت اند از: فسفولیپیدها، گلیکولیپیدها، لیپوکروم‌ها و سولفوکروم‌ها

گلیسریدها: استرهای اسیدهای چرب با گلیسرین هستند.

$$\text{آب} + \text{گلیسرید} \xrightarrow{\text{استری شدن}} \text{گلیسرین} + \text{اسید چرب}$$

1- Etholides



به همین نحو با استری شدن ظرفیت‌های دیگر گلیسرین با اسیدهای چرب، دی و تری گلیسریدها ایجاد می‌شوند. گلیسریدها در اثر هیدرولیز یک مولکول گلیسرین و یک تا ۳ مولکول از اسیدهای چرب ایجاد می‌کنند.

هر چه تعداد مولکول‌های اسیدهای چرب اشباع شده در ساختمان گلیسریدی بیشتر باشد این گلیسرید در حرارت معمولی به وضع جامد نزدیک‌تر شده نقطه جوش آن بالا می‌رود.

گلیسریدها را به حسب قدرت جذب یُدی مشخص می‌کنند. «اندیس یُد» عبارتست از مقدار یُد ثابت شده توسط ۱۰۰ گرم از گلیسرید در یک محلول کلروفرمی.

استریدها یا موم‌ها[1]

استرهای اسید چرب و الکل‌های یک ظرفیتی با وزن مولکولی زیاد هستند. موم تهیه شده توسط زنبور عسل یا پوشش مومی عده‌ای از سلول‌های گیاهی و به‌خصوص عده‌ای از میکروب‌ها مثل باسیل کخ از این نوع لیپیدها هستند. موم‌ها در حفاظت جانداران در برابر عوامل نامناسب فیزیکی، شیمیایی و زیستی نقش مهمی دارند.

استریدها: استرهای اسیدهای چرب و الکل‌های دارای مولکول‌های پیچیده و حلقوی (استرول‌ها) هستند.

$$\text{آب} + \text{استرید} \xrightarrow{\text{استری شدن}} \text{استرول} + \text{اسید چرب}$$

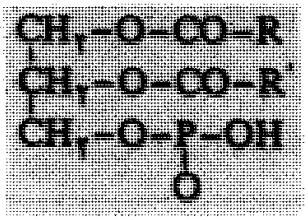
استریدها در ساختمان هورمون‌های جنسی، برخی هورمون‌های غدد فوق کلیوی، ویتامین‌های D، اسیدهای صفراوی وجود دارند و خواص آنها بیشتر مربوط به الکلشان (استرول‌ها) است.

تولیدها: از استری شدن دو «اسید الکل» به‌دست می‌آیند و بیشتر در گیاهان وجود دارند.

فرمول عمومی آنها: $R - CHOH - CH_2 - COO - H_2C - (CH_2)_n - COOH$ است.

لیپیدهای مرکب: همان‌طور که اشاره شد، در ساختمان این مواد علاوه‌بر C، H و O عناصر دیگری مثل N، P، S و مانند آن وجود دارند. در اثر هیدرولیز علاوه‌بر الکل و اسیدهای آلی مواد دیگر نیز تولید می‌کنند. لیپیدهای مرکب را به حسب ماده غیرلیپیدی آنها نامگذاری می‌کنند. اقسام مهم این ترکیبات عبارت‌اند از:

الف - فسفولیپیدها: در ساختمانشان علاوه‌بر الکل و اسید آلی، ترکیبات فسفردار نیز وجود دارد. نمونه مهم فسفولیپیدها، فسفاتیدها[2] هستند که علاوه‌بر الکل و اسید چرب دارای اسید فسفریک نیز می‌باشند.



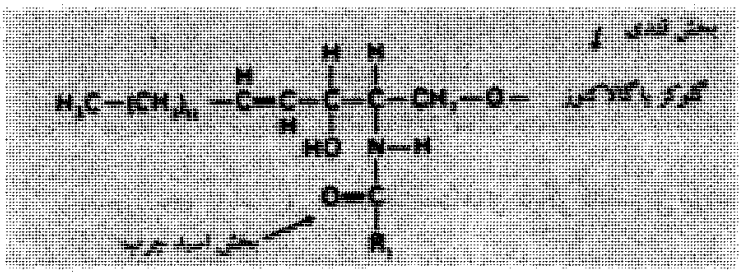
فرمول عمومی فسفاتیدها به‌صورت روبرو است:

فسفاتیدها در ساختمان ترکیبات مهمی مثل لسیتین[3] (در زردهٔ تخم مرغ فراوان است)، سفالین (در غشاء سلولی و در سلول‌های بافت عصبی)، میلین[4] (در سلول‌های عصبی)، فسفاتیدیل‌اینوزیتول در ساختمان غشاء و فسفاتیدیل گلیسرول در غشاء داخلی میتوکندری و در کلروپلاست وجود دارند.

1- Waxes 2- Phosphatides 3- Lecithine 4- Myeline

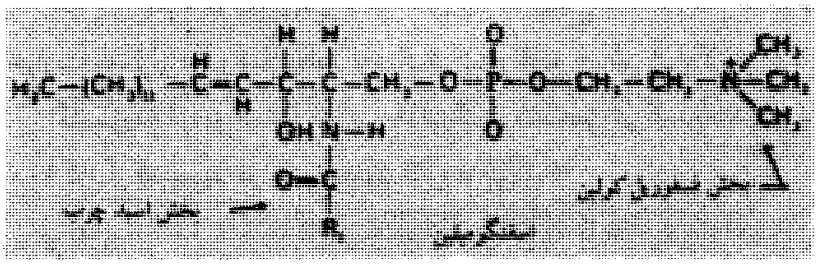
ب - گلیکولیپیدها: در ساختمانشان علاوه‌بر اسیدهای چرب و الکل، مواد قندی نیز وجود دارد. قند موجود در آنها اغلب گالاکتوز است. نمونه مهم گلیکولیپیدها: سربروزیدها[1] (در سلول‌های خونی و اسپرماتوزوئیدها) و گانگلیوزیدها هستند.

فرمول کلی این مواد به شرح زیر است:



گانگلیوزیدها

گانگلیوزیدها از نظر این که در ساختمان غشاء سلول وجود دارند و به احتمال محل اتصال ویروس‌ها به سلول‌ها بوده، در انتقال یون‌ها مؤثرند و اهمیت زیادی دارند.



ج - لیپوکروم‌ها[2] (کاروتنوئیدها): این مواد از لیپیدهای حقیقی نیستند و تنها برخی از خواص شیمیایی لیپیدها را دارند. علت رنگ برخی مواد مثل روغن جانوری (زرد) زرده تخم‌مرغ (زرد مایل به قرمز)، سرم خون (مایل به زرد) به دلیل وجود همین مواد است که قرمز یا نارنجی هستند.

د - سولفولیپیدها: در ساختمانشان علاوه‌بر الکل و اسید چرب، اسیدسولفوریک نیز وجود دارد. در ساختمان برخی غشاءها از جمله غشاءهای کلروپلاستی و ترکیبات مختلف سلولی وجود دارند.

اسیدهای نوکلئیک

اسیدهای نوکلئیک را می‌توان به‌عنوان مهم‌ترین ترکیبات مادهٔ زنده در نظر گرفت، در ساخت مولکولی این اسیدها، عملاً تمام اطلاعات ژنتیکی، یعنی تمام اجزای لازم برای ساخته شدن پروتئین‌های اختصاصی وجود دارند.

انتخاب نامشان بدین مناسبت است که نخستین بار به وسیلهٔ میشر[3] (در سال‌های ۱۸۶۸ - ۱۸۷۱) از شیرهٔ هستهٔ گویچه‌های سفید (حاصل از چرک زخم) جدا شده‌اند.

تا دیر زمانی، تنها اسیدنوکلئیک استخراج شده از مخمرها «اسیدزیمونوکلئیک»[4] و اسید نوکلئیک استخراج شده از تیموس «اسیدتیمونوکلئیک»[5] شناخته شده بودند، سپس چنین پنداشته‌اند که می‌توان به‌صورتی عام فرض کرد که اسیدزیمونوکلئیک خاص گیاهان است در حالی که اسیدتیمونوکلئیک، اسیدنوکلئیک جانوری است. بالاخره، مشخص شد که تمام یاخته‌ها دو نوع اسیدنوکلئیک دارند (یادآور می‌شویم که اغلب ویروس‌ها یکی از دو نوع اسیدهای نوکلئیک را دارند و تنها برخی از آنها مثل انکورناویروس‌ها[6] و پوکس‌ویروس‌ها[7] شامل هر دو نوع آنها هستند). از سوی دیگر، ثابت شد که این دو نوع اسیدنوکلئیک به‌خصوص از نظر قندی که در ساختمانشان وجود دارد متفاوت‌اند: قند اسیدزیمونوکلئیک، ریبوز، و قند اسیدتیمونوکلئیک، دزوکسی ریبوز است.

بنابراین اکنون آنها را به ترتیب اسیدریبونوکلئیک (ARN) و اسیددزوکسی ریبونوکلئیک (ADN) می‌نامند.[8]

1- Cerebrosides 2- Lipochromes 3- Micher 4- a.zymonucleique 5- a.thymonucleique
6- Oncornaviruses 7- Poxviruses

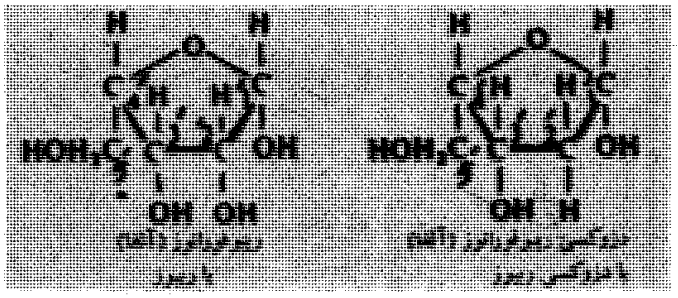
۸- برخی پژوهندگان با استفاده از حروف اول اسامی انگلیسی این اسیدها، آنها را RNA و DNA می‌نامند.

مواد سازنده اسیدهای نوکلئیک

هیدرولیز کامل اسیدهای نوکلئیک نشان می‌دهد که این مواد از اسیداورتوفسفریک، قندها و بازی‌های آلی ازت‌دار (پیریمیدینی و پورینی) ساخته شده‌اند.

قندها: قند اسید زیمونوکلئیک در ۱۹۰۸ به وسیلهٔ لون[1] و جاکوبس[2] در مؤسسه علمی راکفلرنیویورک تفکیک و به همین دلیل ریبوز[3] نامیده شد: این قند آلدوپنتوز[4] است. تفکیک قند از اسید تیمونوکلئیک دشوارتر بود، تااین که به سال ۱۹۲۹، لون و موری[5] نشان دادند که این قند «دزوکسی - ۲ - ریبوز»[6] است.

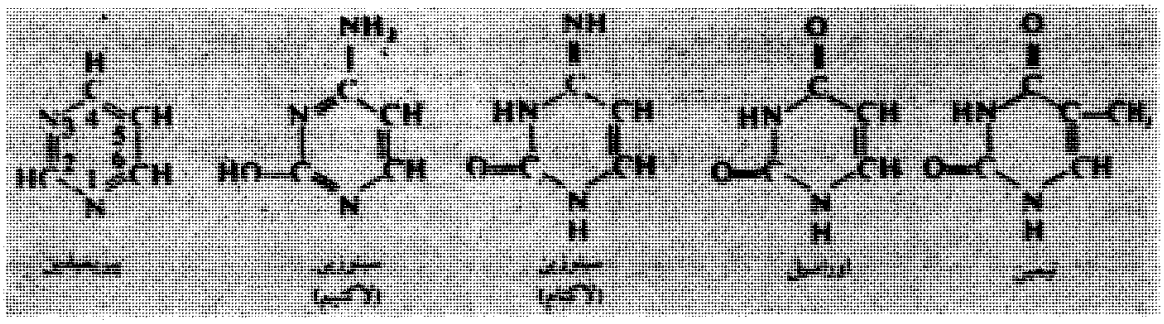
این دو قند به حالت فورانیک[7] هستند؛ ریبوز در RNAها و به‌علاوه در برخی ریبوزیدها (مثلاً کوآنزیم‌های پیریمیدینی) وجود دارد؛ به نظر می‌رسد که دزوکسی ریبوز خاص DNAها باشد. همان‌طور که در فرمول شیمیایی این قندها دیده می‌شود اختلاف آنها در این است که در قند دزوکسی ریبوز روی کربن ′۲ یک اکسیژن کمتر از ریبوز وجود دارد. در این قندها کربن‌ها را برای جلوگیری از اشتباه با شماره‌ها در مولکول‌های بازهای آلی با شماره‌های ′۱، ′۲، ′۳ و مانند آن مشخص می‌کنند.



بازهای پیریمیدینی: سه نمونهٔ اصلی این بازها عبارتند از سیتوزین[8] (در DNA و RNA وجود دارد)، اوراسیل[9] (تنها در RNA موجود است) و تیمین[10] (فقط در DNA به مقداری مختصر در برخی RNAها از جمله tRNAها یافت می‌شود).

سیتوزین، ۲- هیدروکسی، ۶ آمینوپیریمیدین است، اوراسیل، ۲ و ۶ دی‌هیدروکسی پیریمیدین است، و تیمین را می‌توان به‌صورت ۵- متیل اوراسیل در نظر گرفت. این بازها ممکن است به دو شکل مترادف لاکتیم[11] و لاکتام[12] وجود داشته باشند، ذیلاً مثالی برای سیتوزین ذکر شده است. در اسیدهای نوکلئیک، این بازها به‌صورت لاکتام هستند. لاکتام (فرم ستونی) و لاکتیم (فرم انولی) حالت‌های ایزومری وابسته به PH محیط هستند و آن را حالت‌های توتومری نامند.

کاربرد فنون تجزیه‌ای امکان داده است که در برخی DNAها به مقدار خیلی کم ۵- متیل سیتوزین و ۵- هیدروکسیل متیل سیتوزین، و RNAهای ناقل، ۵ و ۶- دی هیدرواوراسیل شناخته شوند.

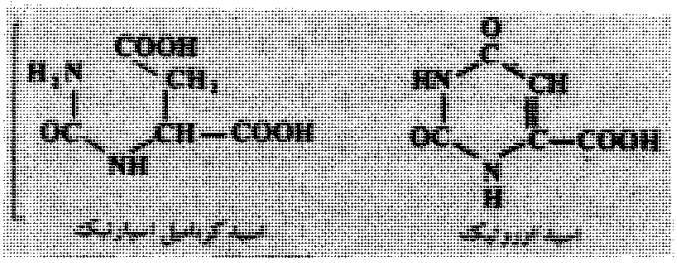


1- Levene 2- Jacobs

۳- ribose از حروف اول کلمات Rockefller Institute of Biochemistry گرفته شده است.

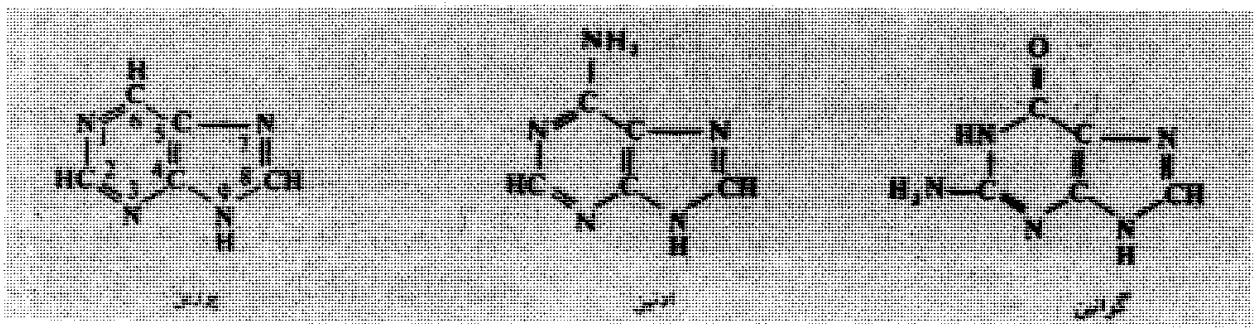
4- Aldopentose 5- Mori 6- desoxy - 2 - ribose 7- furannique

8- cytosine 9- uracile 10- thymine 11- lactime 12- lactame



بیوسنتز هستهٔ پیریمیدین با حلقوی شدن (بسته شدن) «اسیدکربامیل - اسپارتیک»[1] به‌صورت اسیداوروتیک[2] صورت می‌گیرد، که بر روی آن اسیدفسفو - ۵ ریبوزیل پیروفسفریک ثابت می‌شود.

بازهای پورینی: هر دو نوع اسیدهای نوکلئیک دارای دو باز پورینی، یعنی آدنین[3] و گوانین[4] هستند، این بازها از پورین[5] که نتیجهٔ درهم رفتن حلقهٔ پیریمیدین با حلقهٔ ایمیدازول است، مشتق می‌شوند. آدنین، ۶- امینوپورین است و گوانین، ۲- امینو، ۶- هیدروکسی‌پورین.



بازهای پورینی نیز همانند بازهای پیریمیدینی ممکن است به دو شکل لاکتیم و لاکتام موجود باشند. نوع دیگر توتومری که برای بازهای پورینی و پیریمیدینی در نظر گرفته می‌شود حالت ایمینو و آمینو ($NH_2 - NH$) است. این حالت‌های توتومری برمیل ترکیبی، خواص و رفتار بازها و اسیدهای نوکلئیک اثر می‌گذارد.

در RNAهای ناقل، به مقدار خیلی کم هیپوگزانتین[6] (۶- هیدروکسی‌پورین) و همچنین مشتقات متیلهٔ ادنین، گوانین و هیپوگزانتین وجود دارند.

بازهای پورینی از اسیدفسفو- ۵ ریبوزیل پیروفسفریک ساخته می‌شوند، این اسید در نتیجهٔ یک سری واکنش‌های پیچیده و از ترکیباتی متنوع، ابتدا حلقهٔ ایمیدازول را می‌سازد و سپس حلقهٔ پیریمیدین به آن ملحق می‌شود.

بازهای پورین و پیریمیدین موجود در ساختمان اسیدهای نوکلئیک پرتوهای فرابنفش را جذب می‌کنند. حداکثر جذب برای آنها ۲۶۰ = λ نانومتر است. از این خاصیت در تشخیص و اندازه‌گیری بازهای مذکور چه به حالت آزاد و به حالت ترکیب در نوکلئوزیدها، نوکلئوتیدها و اسیدهای نوکلئیک استفاده می‌شود. با استفاده از روش کروماتوگرافی کاغذی و لایه نازک می‌توان بازهای پورین و پیریمیدین را از یکدیگر جدا کرد.

علاوه‌بر بازهای مذکور، بازهای دیگری از مشتقات پیریمیدین‌ها وپورین‌ها در ساختمان اسیدهای نوکلئیک شرکت دارند که آنها را بازهای نادر یا فرعی نامند مثل ۵- متیل سیتوزین، ۵- هیدروکسی متیل سیتوزین و از مشتقات پورین: ۲- متیل آدنین، ۶- متیل آدنین، ۱- متیل گوانین و دی متیل گوانین.

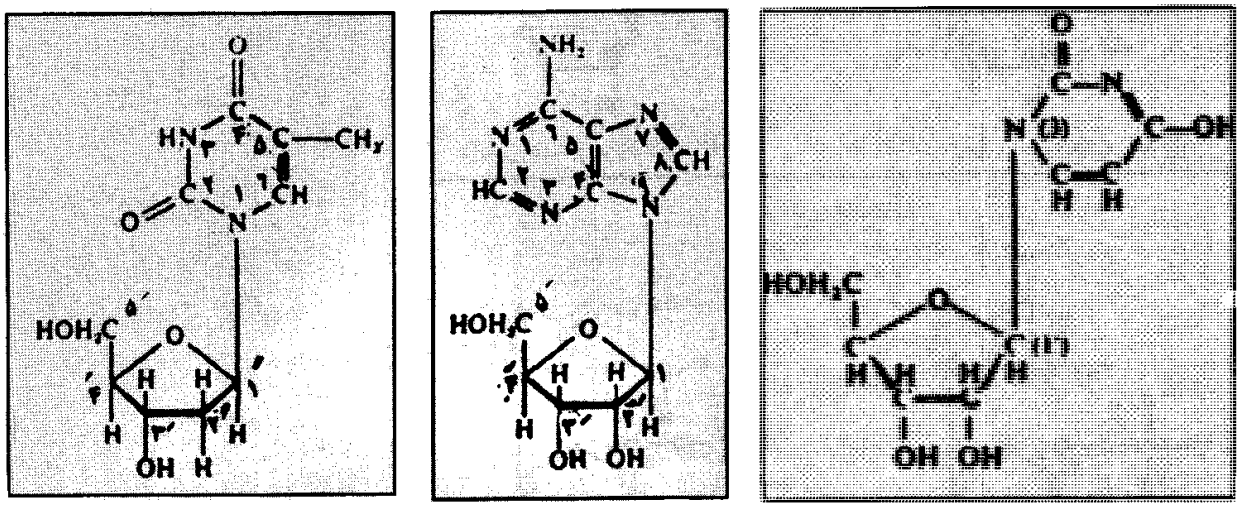
نوکلئوزیدها

ترکیب بین ریبوز یا دزوکسی ریبوز با بازهای آلی پورینی یا پیریمیدینی نوکلئوزیدها را به وجود می‌آورد. اتصال

1- a.carbamyl - aspartique 2- a.orotique 3- adenine 4- guanine
5- purine 6- hypoxanthine

از نوع اوزیدی است و بین کربن ′۱ پنتوز با ازت ۱ از بازهای پیریمیدینی و یا ازت ۹ از بازهای پورینی برقرار می‌شود (شکل ۲-۱۳)[1]، بنابراین نوکلئوزیدها هتروزیدهای خاصی از نوع N -گلوکوزیدی هستند. ریبونوکلئوزیدها عبارتند از تیمیدین، دزوکسی سیتیدین، دزوکسی آدنوزین و دزوکسی گوانوزین.

در RNAهای پیامبر نوکلئوزید دومی از اوراسیل یعنی پسودویوریدین[2] وجود دارد که در آن پیوند هتروزیدی بین کربن ۱ قند و کربن ۵ اوراسیل برقرار است.



اوریدین — آدنوزین (آدنین + ریبوز) — تیمیدین (تیمین + دزوکسی‌ریبوز)

نوکلئوزیدها در آب به خوبی حل می‌شوند و می‌توان آنها را به کمک کروماتوگرافی کاغذی یا لایه نازک از همدیگر جداکرد. نوکلئوزیدها در محیط قلیایی تقریباً پایدارند ولی اگر در محیط اسیدی حرارت داده شوند هیدرولیز شده به اجزای سازنده خود تبدیل می‌شوند. نوکلئوزیدهای مشتق از بازهای پیریمیدین مقاومتر از نوکلووزیدهای مشتق از بازهای پورین هستند و هر دو گروه به وسیله نوکلئوزید از هیدرولیز می‌شوند.

عمده‌ترین نوکلئوزیدهایی که می‌توانند بعد از فسفریله شدن به‌صورت نوکلئوتیدهای سازمان دهنده DNA یا RNA درآیند عبارتند از آدنوزین، دزوکسی آدنوزین، گوانوزین، دزوکسی گوانوزین، اوریدین، تیمیدین و ریبوتیمیدین، سیتیدین و دزوکسی تیمیدین.

نوکلئوتیدها

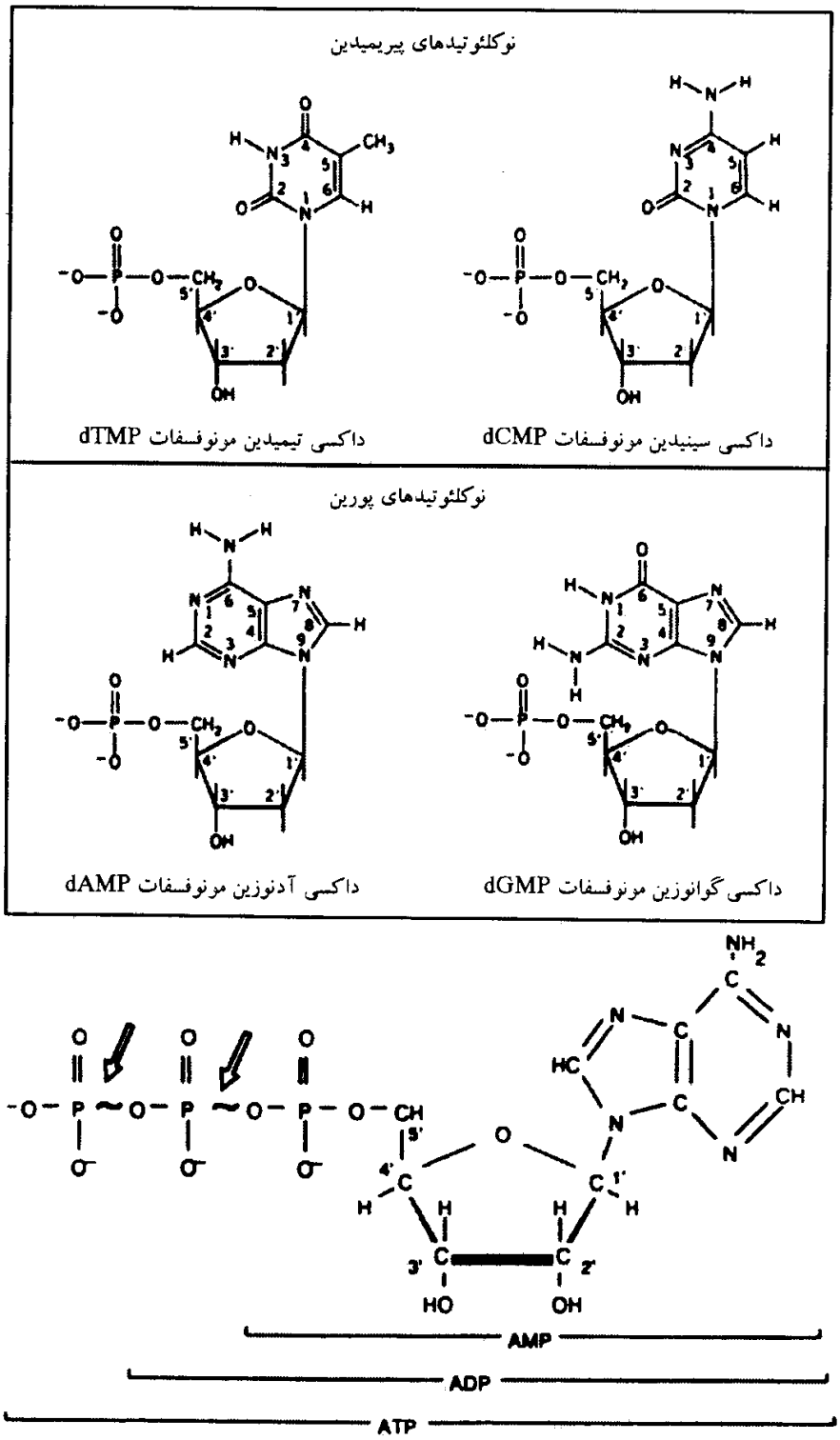
استرهای فسفریک نوکلئوزیدها را نوکلئوتید می‌نامند. به عبارت دیگر از ترکیب یک نوکلئوزید با گروه پیروفسفات، نوکلئوتید به وجود می‌آید. پیوند از نوع فسفواستری و به‌طور معمول روی کربن ۵ قند پنتوز برقرار می‌شود. طرح ساده ساخت یک نوکلئوتید به‌صورت زیر است:

باز آلی ازت‌دار - پنتوز - اسید فسفریک

در شکل ۲-۱۳ چهار دزوکسی ریبونوکلئوتید و چگونگی برقراری پیوند فسفواستری بین یک نوکلئوزید با گروه فسفات مشخص شده است. به‌طور بدیهی اگر به جای دزوکسی‌ریبوز، قندریبوز باشد، ریبونوکلئوتیدها ایجاد می‌شوند. همچنین با افزوده شدن تعداد گروه‌های فسفات، نوکلئوتیدها به حالت، مونو، دی و تری‌فسفات درمی‌آیند.

۱- شماره گذاری سادهٔ ۱، ۲، ۳، ۴ و مانند آن برای اتم‌های باز ازت‌دار و ′۱، ′۲، ′۳، ′۴، ′۵ برای اتم‌های قند در نظر گرفته می‌شوند.

2- pseudo - uridine

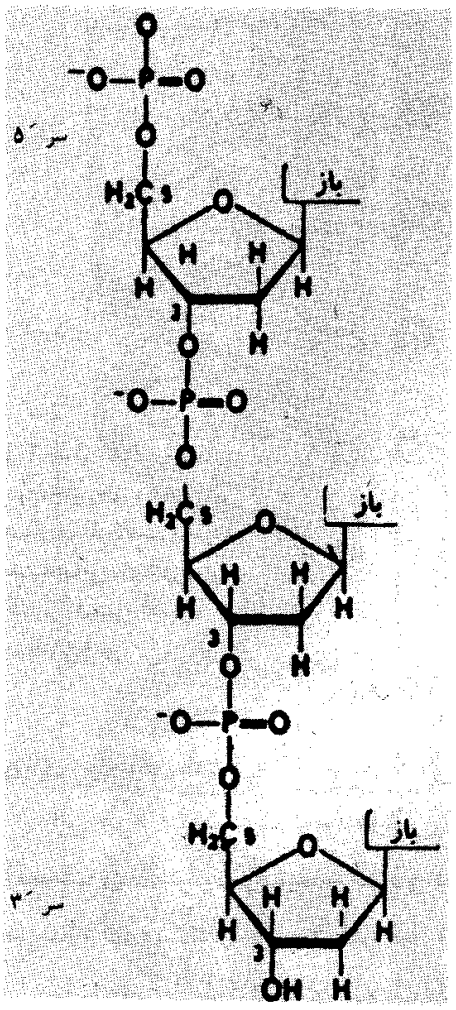


شکل ۲-۱۳. چهار نمونه دزوکسی ریبونوکلئوتید، نام هر کدام زیر شکل نوشته شده است. ساختمان آدنوزین مونوفسفات (AMP)، دی‌فسفات (ADP) و تری‌فسفات (ATP) نیز مشخص شده است.

زنجیره‌های پلی‌نوکلئوتیدی از اتصال نوکلئوتیدها به یکدیگر با دخالت آنزیم‌های اختصاصی (RNA پلیمراز و DNA پلیمراز) ایجاد می‌شوند. این آنزیم‌ها بین نوکلئوتیدها پیوند فسفودی استری برقرار می‌کنند و گروه فسفات موجود بر روی کربن ′۵ یک نوکلئوتید را به گروه هیدروکسیل کربن ′۳ نوکلئوتید دیگر پیوند می‌دهند. شکل ۲-۱۴ بخشی از یک زنجیره پلی‌نوکلئوتیدی را نشان می‌دهد.

همان‌طور که شکل نشان می‌دهد اسکلت اصلی زنجیره پلی‌نوکلئوتیدی از پنتوز و گروه فسفات که به‌طور متناوب تکرار می‌شوند تشکیل شده و بازهای آلی ازت‌دار به سمت داخل این زنجیره امتداد یافته‌اند. در ساختمان

مولکول دو زنجیره‌ای DNA و نیز در بخش‌هایی از مولکول‌های RNAای که دو زنجیره‌ای شده‌اند و به ساختمان دوم رسیده‌اند، بازها با واسطه پیوندهای هیدروژنی به یکدیگر متصل می‌شوند (شکل ۲-۱۵ الف). اتصال بازها بسیار اختصاصی و متناسب با ساختمان و شکل فضایی آنها است به‌طور معمول آدنین با تیمین یا اوراسیل و به وسیله دو پیوند هیدروژنی و گوانین با سیتوزین و به‌وسیله سه پیوند هیدروژنی متصل می‌شوند (شکل ۲-۱۵ ب).

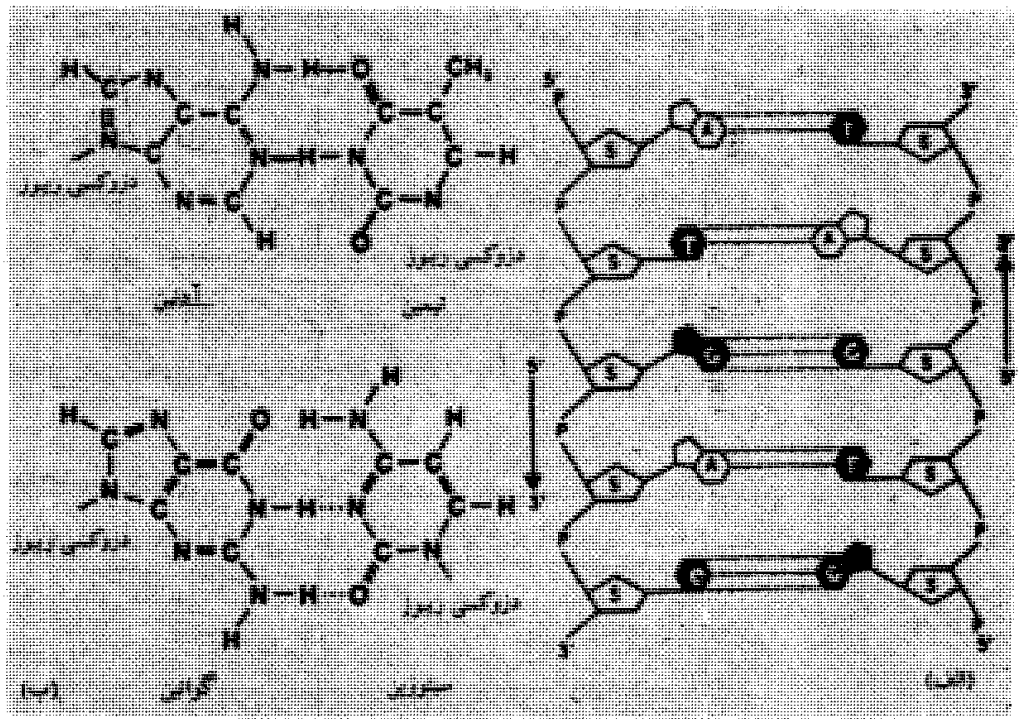


شکل ۲-۱۴. بخشی از یک زنجیره پلی‌نوکلئوتیدی (دارای سه نوکلئوتید)

ساختمان DNA

مولکول DNA از دو زنجیره پلی‌نوکلئوتیدی تشکیل شده است که بازهای مکمل آنها با پیوندهای هیدروژنی به‌هم متصلند و زنجیره‌ها نسبت به‌هم به حالت موازی معکوس[1] قرار گرفته‌اند. تصور گذشته بر این بود که در مولکول DNA بازهای پورین و پیریمیدین به مقدار یکسان وجود دارد. بررسی‌های شارگاف[2] و محققان دیگر در دهه ۱۹۴۰، نادرستی این تصور را نشان داد و مشخص شد که در DNA، نسبت‌های بین بازها از گونه‌ای به گونه دیگر تغییر می‌کند اما در اندام‌های مختلف یک جاندار یا در سویه‌های مختلف گونه از باکتری‌ها، نسبت‌ها به‌طور محسوسی یکسان هستند. شارگاف با مطالعات خود پی‌برد که در DNAهای جانداران مختلف نسبت مولکولی آدنین - تیمین برابر و نسبت مولکولی سیتوزین - گوانین نیز یکسان است و نتیجه گرفت که در مولکول DNA بایستی آدنین با تیمین و گوانین با سیتوزین جفت‌وجور شوند. ویژگی دیگر DNA که به وسیله ویلکینز[3] و همکارش در ۱۹۵۳ روشن شد، وجود طیف انحراف پرتوهای ایکس آن است که معرّف ساختمان مارپیچی مولکول است. واتسن‌وکریک در ۱۹۵۳ با تکیه بر این اختصاصات، چنین تشخیص داده‌اند که مولکول DNA به شکل یک جفت زنجیر مارپیچی است که همانند نردبانی از طناب در حول محوری فرضی پیچیده‌اند. هر یک از دو بخش بالارونده این نردبان از تناوب منظم اسیدفسفریک و دزوکسی ریبوز ساخته شده است در حالی که پله‌های آن از دو باز جفت‌وجور شده تشکیل می‌شوند. ثابت ماندن فاصله‌ای که دو زنجیر جانبی را از هم جدا می‌کند مستلزم جفت‌وجور شدن یک باز پورینی با یک باز پیریمیدینی در هر پله است؛ این بازها بین خود با پیوندهای هیدروژنی که بسیار ناپایدارند مرتبط می‌شوند، و برای این که دو زنجیر جانبی دقیقاً موازی باشند تنها این امکان وجود دارد که بازها به‌صورت ادنین - تیمین (A - T) و گوانین - سیتوزین (G − C) جفت شوند. طرز ردیف شدن بازها در جهت طولی اهمیتی ندارد و یک باز موردنظر در تعیین ماهیت باز مجاور بی‌تأثیر است، بدین‌سان برای هر پله چهار امکان از جفت‌های بازی به‌صورت A − T، T − A، G − C، C − G، وجود دارد. چرخش مارپیچ به سمت راست است، و به ازای هر ده نوکلئوتید، که معادل ۳۴ A° است، یک چرخش کامل دارد، نوکلئوتیدها در هر ۳/۴ A° تکرار می‌شوند؛

1- AntiParallel 2- E.chargaff 3- Wilkins



شکل ۲-۱۵. الف) ساختمان دو زنجیره‌ای و اتصال بازها ب) فرمول شیمیایی سیتوزین، گوانین، تیمین، آدنین، دزوکسی‌ریبوز

پهنای مولکول ۲۵Å یا ۲۰ است (شکل ۲-۱۶).

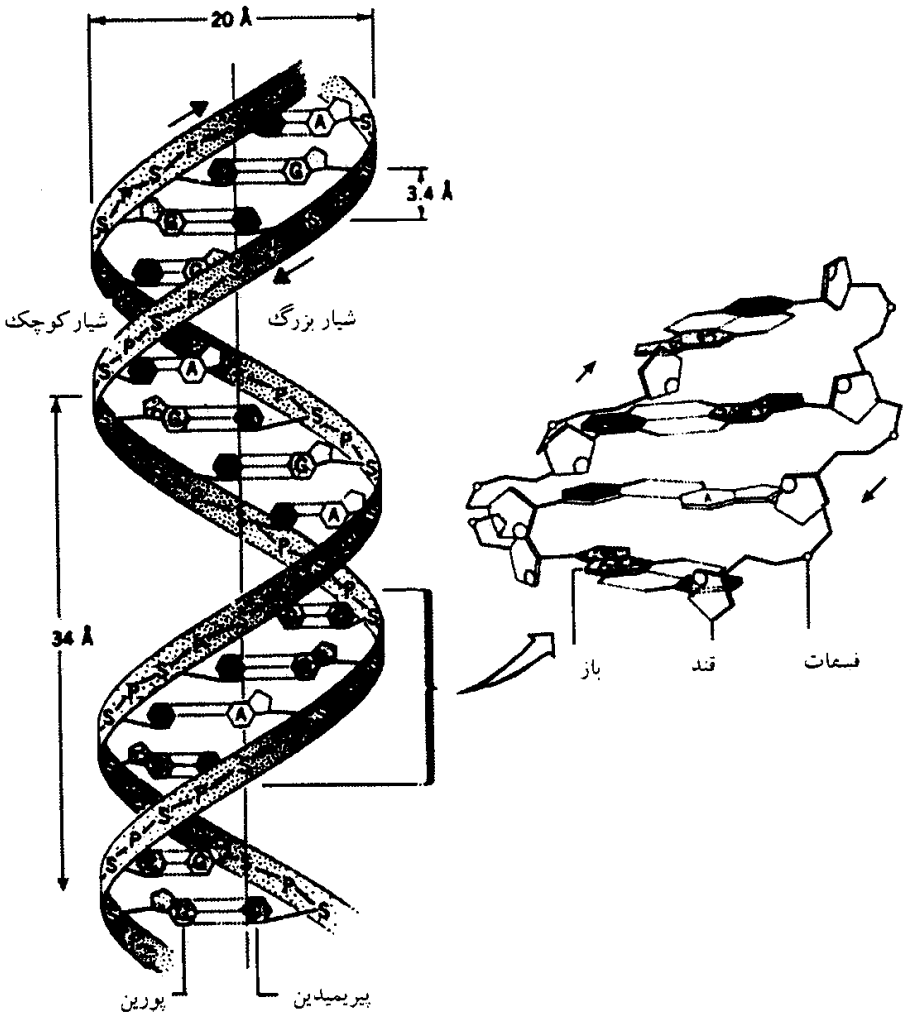
این طرح ساده، درک نحوهٔ دوتایی شدن (همانندسازی) مولکول را امکان‌پذیر می‌سازد: پیوندهای هیدروژن (قسمت وسط نردبان) گسیخته شده و دو زنجیر از هم جدا می‌شوند، سپس هر یک از آن دو، زنجیر مکمل خود را می‌سازد که همانند زنجیر مکملش قبل از جدایی خواهد بود.

دو زنجیر پلی‌نوکلئوتیدی که مولکول DNA را می‌سازند نسبت به یکدیگر به حالت موازی معکوس (غیرهمسو) قرار گرفته‌اند به نحوی که نوکلئوتیدهای پی‌درپی در یکی از زنجیره‌ها به وسیلهٔ پیوندهای فسفودی‌استری ۵′⟵۳′ و در زنجیره دیگر با پیوندهای فسفودی‌استری ۳′⟶۵′ به‌هم متصل شده‌اند (شکل ۲-۱۶).

مدل‌های مختلف B - DNA، Z - DNA و A - DNA

مدل ساختمانی مولکول DNA که بر بنای پیشنهاد واتسون - کریک طراحی شد و موجب شد که آنها در سال ۱۹۵۴ برنده جایزه نوبل شوند را مدل یا فرم B نامند که به‌عنوان شکل متداول یا عادی مولکول در نظر گرفته می‌شود. این مدل حالت راست گرد مولکول است که در آن در هر دور کامل مارپیچ که ۳۴ آنگستروم طول دارد، ۱۰ جفت نوکلئوتید قرار دارد و بنابراین فاصله دو نوکلئوتید در هر زنجیره ۳/۴ آنگستروم است (شکل ۲-۱۶). دو زنجیرهٔ پلی‌نوکلئوتیدی به ترتیبی به دور یکدیگر پیچیده‌اند که دو نوع شیار در مولکول ایجاد می‌شود، شیار بزرگ[1] و شیار کوچک[2]، سطح شیار بزرگ با اتم‌های اکسیژن و ازت بازها پوشیده شده که می‌توانند پیوندهای هیدروژنی را با زنجیره‌های جانبی اسیدهای امینه پروتئین‌هایی که به DNA وابسته هستند، برقرار کنند. این پروتئین‌ها در تنظیم بروز ژن دخالت دارند. در محل شیار کوچک برهم‌کنش متقابل مولکول‌های آب با اتم‌هایی که سطح شیار کوچک را پوشانیده‌اند وجود دارد، عاملی که برای پایداری فرم B می‌باشد.

1- Major groove 2- Minor groove



شکل ۲-۱۶. طرحی از مولکول DNA. در مارپیچ مضاعف مولکول دو زنجیره جانبی پلی‌نوکلئوتیدی به وسیله پیوندهای هیدروژنی بین بازهای مکمل به‌هم متصل شده‌اند. در این شکل ابعاد مختلف مولکول و جایگاه شیار کوچک و بزرگ نشان داده شده است.

هم‌اکنون می‌دانیم علاوه‌بر فرم B (شکل ۲-۱۷ ب)، اشکال دیگری از مولکول DNA نیز در سلول‌ها وجود دارد. در فرم A – DNA بازها به جای آن که به حالت صاف در مولکول قرار گیرند، به‌صورت کج قرار گرفته‌اند در نتیجه تعدادشان در هر دور افزایش می‌یابد و به یازده جفت می‌رسد و هر دور معادل ۲۸ آنگستروم می‌باشد. فرم A قطر بیشتری از فرم B (۲۵ A°) دارد. فرم A ممکن است در دورگه‌های DNA – RNA وجود داشته باشد.

Z – DNA:

تا حدودی ۲۵ سال پس از ارائه مدل واتسون - کریک برای مولکول DNA، تصور می‌شد که همه مولکول‌های DNA راست گرد هستند اما در سال ۱۹۷۹ ریچ[1] مشاهدات قبلی مبنی‌بر وجود فرم چپ‌گرد DNA را تأیید کرد. مدل چپ‌گرد را فرم Z – DNA گویند (شکل ۲-۷ الف). در این مدل اسکلت اصلی قند - فسفات مسیری زیگزاگ مانند را حول محور مرکزی مارپیچ طی می‌کند و به همین دلیل آن را Z – DNA نامند.

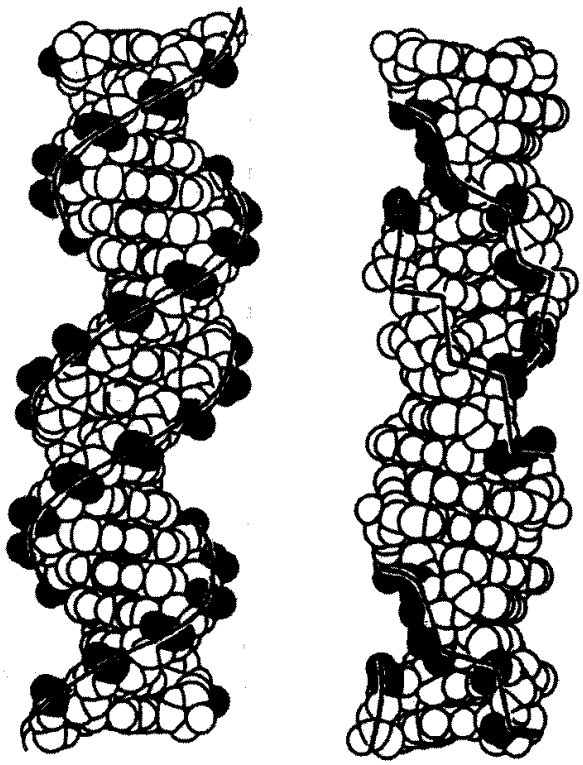
فرم Z تنها دارای یک نوع شیار است؛ باریک‌تر و طویل‌تر است زیرا بازها طوری کج شده‌اند که فاصله آنها در طول محور مارپیچ به ۳/۸ A° می‌رسد. ۱۲ جفت باز در هر دور مارپیچ قرار می‌گیرد و دور مارپیچ ۴۵/۶ A° است.

شواهد زیادی در دست است که Z – DNA به‌طور طبیعی در سلول‌های جانوری - گیاهی و پروکاریوتی وجود دارد. برخلاف B – DNA، به شدت فرمی ایموژنیک است و بنابراین به سهولت می‌توان برعلیه آن پادتن تهیه کرد. واکنش این پادتن‌ها با DNAهایی که از سلول‌های مختلف استخراج شده‌اند دلیلی‌بر وجود فرم Z در انواع مختلف

1- A.Rich

سلول‌ها است. پروتئین‌هایی هم که به‌صورت طبیعی در سلول‌ها به DNA – Z متصل هستند، از سلول‌های مختلف استخراج شده‌اند.

احتمال دارد که فرم Z بتواند به همراه فرم B در یک مولکول DNA وجود داشته باشد. DNA در نواحی غنی از ترتیب‌های با تناوب پورین - پیریمیدین می‌تواند بین فرم‌های Z و B تغییر حالت دهد. به‌نظر می‌رسد این ترتیب‌ها در مناطق ویژه‌ای از DNA وجود داشته باشند و این مطلب این نظریه را که تغییر مارپیچ DNA بین حالت‌های راست‌گرد و چپ‌گرد ممکن است در بروز انتخابی ژن‌ها دخالت داشته باشد را تقویت می‌کند.



(الف) (ب)

a) فرم Z b) فرم B

DNAی تک رشته‌ای

اگرچه تقریباً در همه موارد بررسی شده، مولکول DNA دو زنجیره پلی‌نوکلئوتیدی دارد که به یکدیگر پیچیده‌اند، اما در برخی ویروس‌های باکتریایی مثل فاژهای ۱۷۴ ØX و S_{13}، DNA تنها از یک زنجیره پلی‌نوکلئوتیدی تشکیل شده است. این مسئله زمانی مشخص شد که تجزیه شیمیایی این گونه DNAهای ویروسی مقادیر نابرابری از آدنین و تیمین و نیز گوانین و سیتوزین را به‌دست داد. ضمن تولیدمثل DNAهای تک رشته‌ای (رشته مثبت) به درون باکتری میزبان تزریق می‌شود. این رشته به‌عنوان الگویی برای تولید رشته پلی‌نوکلئوتیدی مکمل خود (رشته منفی) عمل می‌کند. این دو رشته پلی نوکلئوتیدی با یکدیگر ترکیب شده فرم متداول مارپیچ مضاعف را به وجود می‌آورند. از روی این DNA، رشته‌های مثبت دیگری ساخته می‌شود که با پروتئین‌های ویروسی ادغام شده و ویروس‌های جدید را به وجود می‌آورند.

ساختمان RNAها

تا سال‌های اخیر، ساختمان RNAها به خوبی شناخته نشده بود. چه، در حالی که بیش از یک نوع DNA را نمی‌شناختند، دست‌کم سه نوع مشخص RNA با ساختمان متفاوت شناخته شده بود. هم‌اکنون انواع مختلفی از RNA به شرح زیر شناخته شده است:

۱- RNAهای ناقل[1] (RNAهای محلول)، یعنی tRNAها: مولکول‌های کوچکی مرکب از حدود ۶۵ تا ۹۲ نوکلئوتیدند؛ در اصل به‌صورت زنجیر ساده‌ای هستند که به شکل برگ شبدر چین می‌خورند و با برقراری پیوندهای هیدروژن پابرجا می‌مانند؛ در آنها تعداد زیادی بازهای غیرمعمولی وجود دارند که گسیختگی‌هایی را در شاخه‌های دوتایی مولکول ایجاد می‌کنند.

۲- RNAهای ریبوزومی (rRNAها): درشت مولکول‌هایی هستند که قابلیت تغییر شکل دارند و اندازهٔ آنها بیش از

1- Transport RNA

RNAهای ناقل است. RNAهای ریبوزومی کلاف‌هایی با نواحی کوتاه مارپیچی تشکیل می‌دهند که به وسیلهٔ پیوندهای ادنین اوراسیل (AU) و سیتوزین گوانین (CG) پایدار می‌شوند. RNAهای ریبوزومی با داشتن مقادیر زیادی از بازهای سیتوزین گوانین مشخص می‌گردند؛ در آنها بازهای متیله نیز وجود دارند. در بحث ریبوزوم‌ها آگاهی‌های بیشتری در مورد RNAهای ریبوزومی داده شده است.

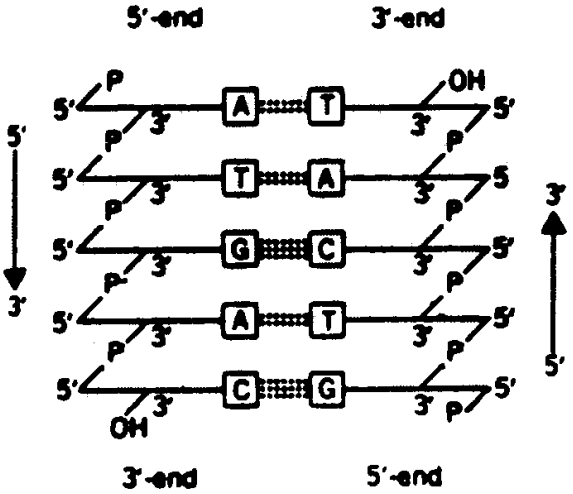
۳- RNAهای پیامبر (mRNAها): دارای پیام لازم برای ساخته شدن پروتئین‌های خاص مختلف‌اند (جاکوب و مونود). ترتیب نوکلئوتیدها، با ساخت و کاری که بعداً مورد بررسی قرار خواهد گرفت، توالی اسیدهای امینه را در مولکول پروتئینی مشخص می‌کند.RNAهای پیامبر ناپایدارند و نرخ تجدید سریعی دارند؛ تنها از یک زنجیر(ساختار یک ردیفی) با درازای متغیر ساخته شده‌اند؛ ترتیب بازهایشان مکمل ترتیب بازهادر برخی قسمت‌های یکی از دو زنجیر مولکول DNA است. این خاصیت تکمیلی در جریان ساخته شدن مارپیچ‌های مضاعف دورگه‌ای که به‌طور موقت یک رشته پلی‌دزوکسی ریبونوکلئوتیدی و یک رشتهٔ ریبونوکلئوتیدی را به‌هم وصل می‌کنند (تکمیل شدن ادنین اوراسیل و گوانین سیتوزین) برقرار می‌شود. چنین مولکول‌های دورگه‌ای را می‌توان با RNA پیامبر و رشته‌های تغییر ماهیت دادهٔ DNA در آزمایشگاه ساخت.

۴- sRNAها[1]: RNAهای کوچک مولکولی هستند که از حدود پانزده سال پیش در سلول‌ها شناخته شدند و به ترتیبی که خواهیم دید (فصل نهم جلد دوم) در پدیده‌های حذف اینترون‌ها که بخشی از پردازش mRNAها است نقش اساسی دارند.

ساختمان اول تا چهارم در اسیدهای نوکلئیک

ساختمان اول: نوع، تعداد و ترتیب نوکلئوتیدها در ساختمان مولکول اسیدنوکلئیک را ساختمان اول آن نامند. پیوندهای شاخص ساختمان اول پیوندهای فسفودی استری موجود بین نوکلئوتیدها است.

ساختمان دوم: وقتی در ساختمان مولکول اسیدنوکلئیک علاوه‌بر پیوندهای فسفودی‌استری، پیوندهای هیدروژنی نیز وجود داشته باشد و به وسیله این پیوندها که بین بازهای نوکلئوتیدها برقرار می‌شود، بخش‌های دو زنجیره‌ای به وجود آید، مولکول دارای ساختمان دوم شده است. برای مثال ساختمان دوم tRNAها شبیه برگ شبدر است و دارای بازوهای مختلف با بخش‌های دو زنجیره‌ای است. طرح دوبعدی مولکول دو زنجیره‌ای DNA نیز به‌عنوان حالتی از ساختمان دوم آن در نظر گرفته می‌شود (شکل ۲-۱۸).



شکل ۲-۱۸. نمایی شماتیک که بر روی قطبیت متضاد رشته‌های مکمل تأکید شده است.

ساختمان سوم: وقتی مولکول اسید نوکلئیک دارای ساختمان سه بعدی و شکل فضایی ویژه می‌شود به ساختمان سوم رسیده است. در ساختمان سوم علاوه‌بر پیوندهای فسفودی‌استری بین نوکلئوتیدها و پیوندهای هیدروژنی بین بازها، انواع دیگری از پیوندها که حاصل برهم‌کنش اجزای سازنده مولکول است مثل پیوندهای الکتروستاتیک، نیروهای واندروالز، نیروهای حاصل از برهم‌کنش بخش‌های غیرقطبی و مانند آن وجود دارد. ساختمان سوم

1- Small RNA

tRNAها شبیه حرف «L» است که شکل عمل‌کننده آن است. در mRNAها نیز ساختمان سوم اهمیت زیادی دارد زیرا این ساختمان است که می‌تواند مورد شناسایی ریبوزوم‌ها برای سنتز پروتئین‌ها قرار گیرد.

از ویژگی‌های ساختمان سوم اسیدهای نوکلئیک پدیده غیرطبیعی شدن آنها است که تحت تأثیر عوامل مختلف فیزیکی از جمله دما و پرتوها یا عوامل مختلف شیمیایی صورت می‌گیرد. غیرطبیعی شدن ممکن است موقت (بازگشت‌پذیر) یا دائمی (بازگشت‌ناپذیر) باشد.

ساختمان چهارم: ساختمان دو زنجیره‌ای و سه بعدی مولکول DNA که ویژگی‌های آن در صفحات قبل شرح داده شد را ساختمان چهارم آن نامند. از ویژگی‌های ساختمان چهارم پدیده خودآرایی است به این مفهوم که اگر دو زنجیره ساختمان چهارم را از هم باز کنیم، در شرایط مناسب، دو زنجیره می‌توانند یکدیگر را بازشناسی کنند و به وضع اول با یکدیگر ترکیب شده ساختمان مولکولی طبیعی را دوباره به‌دست آورند.

تشخیص سیتوشیمیایی اسیدهای نوکلئیک

به منظور بررسی اسیدهای نوکلئیک اغلب از دو آزمون سیتوشیمیایی: واکنش فولگن و آزمون براشه استفاده می‌شود. با این حال روش‌های دیگری نیز وجود دارند که به‌عنوان مثال می‌توان واکنش تورشینی[1]، کاستل[2] و خووان‌کین[3] را ذکر کرد که در آن به کمک فلوئورون‌ها[4]، ریبوز و دزوکسی ریبوز را (پس از هیدرولیز اسیدهای نوکلئیک) به رنگ‌های متفاوتی درمی‌آورند. از سوی دیگر، با توجه به طیف جذبی با اشعهٔ فرابنفش (روش کاسپرسون) نیز می‌توان به بررسی و تشخیص اسیدهای نوکلئیک پرداخت. کاربرد آن در مطالعهٔ اسیدهای نوکلئیک مستلزم بررسی‌های متعدد است.

۱- واکنش فولگن (۱۹۱۴). واکنش هسته‌ای فولگن و روسنبک[5] (که نباید آن را با واکنش دیگری، یعنی با واکنش پلاسمال فولگن، اشتباه کرد) به نحوی بسیار متداول به کار رفته و در همه‌جا به‌صورت واکنشی اختصاصی برای DNA پذیرفته شده است.

این واکنش مبتنی بر این است که پس از هیدرولیز مناسبی، می‌توان از اسید نوکلئیک، الدئیدی به‌دست آورد که، علاوه بر خصوصیات دیگرش، این ویژگی را دارد که می‌تواند رنگ فوشین‌بازی بی‌سولفوره (معرف آلدئیدی شیف) را دوباره بازگرداند. در عمل، پس از تثبیت نمونه‌ها، آنها را به وسیلهٔ اسیدکلریدریک در اتو (۶۰°C) هیدرولیز می‌کنند و بعد معرف شیف را بر آنها اثر می‌دهند که رنگ قرمز مایل به بنفش تندی ایجاد می‌کند؛ پس از آن، به منظور حذف بقایای معرف، نمونه‌ها را با آب گوگردی می‌شویند، می‌توان رنگ‌آمیزی تکمیلی سایر اجزاء یاخته را به وسیلهٔ محلول سبز روشن انجام داد.

برای اندازه‌گیری مقدار DNA به طریق نورسنجی یاخته‌ای نیز واکنش فولگن به کار می‌رود. در حقیقت، این عمل بیشتر ارزشیابی قیاسی نتایجی است که از مقایسه واحدهای انتخابی با نمونه‌های شاهد به‌دست آمده‌اند. بی‌شک، این ارزش‌ها جز در شرایط تجربی کاملاً مشخص معنایی ندارند.

۲- تست براشه (۱۹۴۰). در این تست از رنگ‌آمیزی «اونا - پاپنهایم»[6] به وسیلهٔ مخلوطی از سبز متیل و پیرونین استفاده می‌شود. در اصل، سبز متیل، که رنگ کنندهٔ بازی است، روی DNA ثابت شده آن را به رنگ سبز درمی‌آورد، در حالی که پیرونین، RNA را به رنگ گُلی رنگ می‌کند؛ اما این واکنش‌ها به اندازه کافی حالت

1- Turchini 2- Castel 3- Khau van kien 4- Fluorones 5- Rossenbeck
6- Unna - Pappenheim

اختصاصی ندارند (مقدار رنگ‌های به کار رفته نیز بسیار مهم است). وقتی از آنزیم‌های هیدرولیزکنندهٔ خاص یکی از دو نوع اسیدهای نوکلئیک استفاده شود، تست ارزش بیشتری پیدا می‌کند. برش‌های شاهد، یعنی برش‌هایی که تحت تأثیر ریبونوکلئاز بوده‌اند و آنهایی که دزوکسی ریبونوکلئاز بر آنها اثر داده شده است، برای مقایسه رنگ‌آمیزی می‌شوند. از بین رفتن پیرونین دوستی پس از عمل ریبونوکلئاز دلیلی برای تشخیص محل RNA است، چنان که از بین رفتن رنگ‌پذیری بر اثر سبز متیل پس از عمل دزوکسی ریبونوکلئاز دلیلی برای تشخیص محل DNA خواهد بود.

امتیاز این روش این است که امکان بررسی هم زمان دو نوع اسیدنوکلئیک را فراهم می‌سازد، ولی باید در شرایط دقیق و مشخص صورت گیرد؛ این روش بیشتر برای RNA به کار می‌رود زیرا در مورد DNA واکنش فولگن برتری دارد.

پراکنش اسیدهای نوکلئیک در یاخته

تا چندی پیش پذیرفته بودند که DNA تنها در هسته، در حد کروماتین وجود دارد و در آنجا سازندهٔ اصلی ژن‌هاست. از طرف دیگر، به‌طوری که ث. واندرلی‌ور. واندرلی[1] ثابت کرده‌اند، مقدار DNA یاخته‌های اندام‌های مختلف و افراد مختلف در یک گونهٔ مشخص عملاً ثابت و به تعداد ۲n کروموزوم‌ها بستگی دارد. برعکس، این مقدار در یاخته‌های جنسی هاپلوئید، به نصف کاهش می‌یابد و در یاخته‌های پلی‌پلوئید افزایش حاصل می‌کند. گرچه این نتایج به‌طور کلی هنوز قابل قبول‌اند، اما اکنون مشخص شده است که مقدار کمی DNA در میتوکندری‌ها و پلاست‌ها وجود دارد. ما، این واقعیات را، که ممکن است نتایج ژنتیکی مهمی در برداشته باشند، در فصولی که به این اندامک‌ها اختصاص یافته‌اند بررسی خواهیم کرد. مسئله مورد بحث دیگر، تغییرات ممکن مقدار DNA در رابطه با سوخت و ساز یاخته است؛ در بعضی حالت‌های مربوط به فعالیت شدید آنابولیسمی، برخی بخش‌های DNA به مقدار زیاد ساخته می‌شوند؛ این حالتی است که آن را تشدید برخی از ژن‌ها نامند و این پدیده موجب افزایش شدیدی در سنتز RNAهای پیامبر مربوط می‌گردد. این افزایش موقتی مقدار DNA در همان جایی که حاصل می‌شود قابل توجه است اما نسبت به مقدار کلی DNA هسته‌ای خیلی کم است.

در تماس با DNA، RNAهای مختلفی تشکیل می‌شوند اما بخش اعظم انها در سیتوپلاسم نفوذ می‌کنند؛ در هسته، تنها هستک سرشار از RNA است.

مقدار کلی RNA یاخته پیوسته تحت تأثیر عوامل خارجی و داخلی تغییر می‌کند.

نقش اسیدهای نوکلئیک یاخته‌ای

اسیدهای نوکلئیک امانت‌دار تخصص یاخته‌ای‌اند. سنتز پروتئین‌ها عملاً با دخالت RNAهای مختلف صورت می‌گیرد و نظم به‌هم پیوستن اسیدهای امینه به‌طور مستقیم به نظم ردیف شدن بازها در RNA پیامبر وابسته است. RNAهای مختلف در تماس با DNA ساخته می‌شوند. بالاخره DNA با خاصیت خودزایشی که دارد می‌تواند بدون تغییر و تبدیل به نسل‌های یاخته‌ای پیاپی انتقال یابد. این نقش را بدین شکل می‌توان بیان کرد که اسیدهای نوکلئیک عمل سه گانهٔ همانندسازی (DNA ← DNA)، الگوبرداری، رونویسی یا نسخه‌برداری (RNA ← DNA) و تفسیر یا ترجمه (RNA ← پروتئین‌ها) را انجام می‌دهند.

1- C & R.Venderly

عمل همانندسازی DNA بدین نحو صورت می‌گیرد: دو زنجیر مارپیچ مضاعف باگسیخته شدن پیوندهای هیدروژنی بازهایشان به‌طور موقت از هم جدا می‌شوند؛ هر نیمه نقش قالبی را بازی می‌کند، بازها با طرز عمل مکملی که دارند (ادنین تیمین و گوانین سیتوزین) بازهای لازم را که به‌صورت دزوکسی ریبوزیدتری‌فسفات‌ها فراهم شده‌اند به خود جلب می‌کنند. پیوندهای قند - فسفات را آنزیم DNA - پلیمر از (کورنبرگ[1]، ۱۹۵۷) با از میان برداشتن ۲ فسفات از هر پیوند برقرار می‌کند[2]؛ بدین سان، دو مولکول DNA همانند DNA اولیه ساخته می‌شوند که هر یک نیمی از مولکول اصلی را حفظ کرده است (همانندسازی نیمه حفظ شدنی).

عمل الگوبرداری نیز براساس مشابهی صورت می‌گیرد. پس از جدا شدن موقتی دو زنجیر مولکول DNA، یکی از زنجیرها نقش قالب یا الگو را بازی می‌کند[3]. یک RNA - پلیمراز سبب تشکیل موقتی یک مولکول دورگه DNA - RNA شده سپس RNA جدا می‌شود.

بالاخره ،برای عمل تفسیر، هر اسید امینه‌ای بر روی RNA ناقل خاصی ثابت می‌شود و بدین ترتیب به وسیلهٔ برخی بازهای مشخصی از این RNA شناسایی می‌گردد. RNA پیامبر، ریبوزوم‌ها را به خود جلب می‌کند که آنها نیز به نوبهٔ خود همانند مرکز جذب RNAهای ناقلی عمل خواهند کرد که به اسیدهای امینه متصل شده‌اند، ترتیب قرار گرفتن بازها در RNA پیامبر دلیل ترتیب جذب RNAهای ناقل، و بنابراین دلیل ترتیب اسیدهای امینه خواهد بود. گرچه دخالت RNA ریبوزومی در این عمل مورد تردید نیست، اما چگونگی این دخالت هنوز به‌طور کامل مشخص نشده است.

1- Kornberg

۲- مطالعات جدید پیچیدگی غیرمنتظره‌ای از همانندسازی را آشکار کرده‌اند؛ در همکاری با DNA - پلیمراز آنزیم‌های دیگری مانند آندونوکلئازها و پلی‌نوکلئوتید - لیگازها وارد عمل می‌شوند.

۳- اغلب واژهٔ انگلیسی «ابتدایی: primer» را به کار می‌برند.

۳ آنزیم‌ها، متابولیسم سلولی و بیوانرژتیک

آنزیم‌ها

آنزیم‌ها کاتالیزورهای زیستی (بیوکاتالیزورهایی) هستند که واکنش‌های شیمیایی درون سلول‌ها را تسهیل و تسریع می‌کنند. آنزیم‌ها مولکول‌های پروتئینی هستند که دارای یک یا چندین محل نفوذ سطحی مشخص (جایگاه‌های فعال)اند که سوبسترا، یعنی ماده‌ای که آنزیم بر آن اثر می‌کند به این نواحی متصل می‌شوند. تحت تأثیر آنزیم، سوبسترا (S) تغییر می‌یابد و به یک یا تعدادی مواد حاصل (P) از اثر آنزیم تبدیل می‌شود. چون واکنش اغلب برگشت‌پذیر است می‌توان آن را به‌صورت زیر نشان داد:

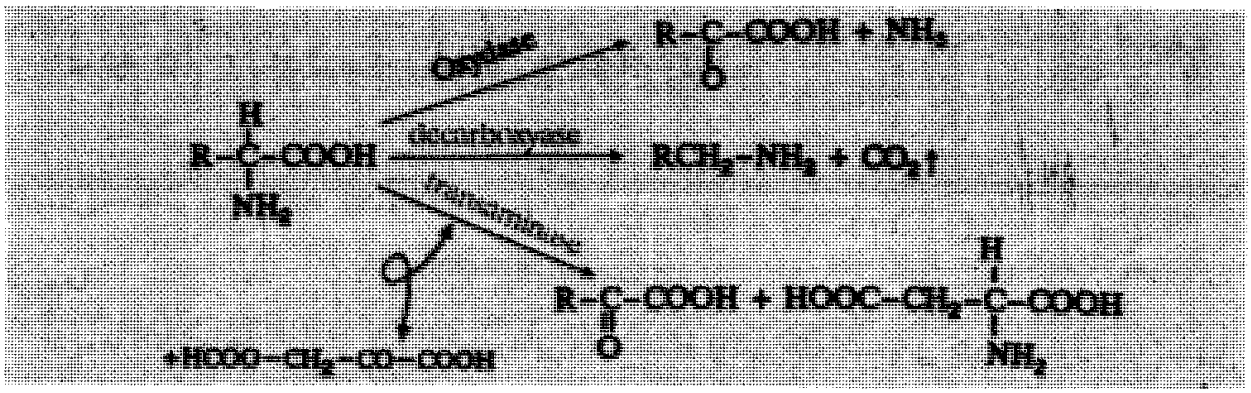
$$S \underset{\longleftarrow}{\overset{\longrightarrow}{\text{آنزیم}}} P$$

جهت واکنش با موازنه ثابتی مشخص می‌شود. آنزیم‌ها واکنش را تا رسیدن به حالت توازن سرعت می‌بخشند.به‌طور کلی آنزیم پروتئینی است که سرعت واکنش شیمیایی را تغییر می‌دهد ولی در ماهیت فراورده‌های نهایی اثری ندارد. یعنی به‌عنوان کاتالیزور در واکنش‌های بدن موجود زنده عمل می‌کند. نباید تصور کرد که آنزیم در واکنش وارد نمی‌شود برای مثال در عمل آنزیم گلیسرآلدئید ۳ فسفات دئیدروژناز، گروه SH– پروتئین به مادهٔ اولیه متصل می‌شود و با پیشرفت واکنش سرانجام آنزیم آزاد می‌گردد.

کاتالیزورها در واکنش‌ها بدون تغییر می‌مانند ولی آنزیم‌ها مانند سایر پروتئین‌ها تحت شرایط مختلف پایدار نمی‌مانند. این مواد در اثر حرارت بالا و اسیدها و قلیاها تغییر می‌کنند. به‌طور معمول کاتالیزورها تأثیری در تعادل واکنش شیمیایی برگشت‌پذیر ندارند بلکه فقط سرعت واکنش را افزایش می‌دهند تا به تعادل برسند. بنابراین نقش حقیقی یک کاتالیزور سرعت دادن به واکنش در هر دو جهت می‌باشد. کاتالیزورهای زیستی در سرعت دادن واکنش‌های شیمیایی اختصاصی عمل می‌کنند. در تفسیر قدرت کاتالیزوری یک آنزیم، بایستی مقدار مواد اولیه‌ای را که در واحد زمان به وسیلهٔ مقدار معینی از آنزیم به فراورده‌ها تبدیل می‌شود بدانیم. این مقدار را عدد برگشتی می‌نامند و به‌صورت تعداد مولکول‌های مادهٔ اولیه که بر حسب یک مولکول آنزیم در هر دقیقه به فراورده‌ها تبدیل گشته محاسبه می‌کنند. آنزیم‌ها در تنظیم و نیز انجام واکنش‌های مقاوم و نیمه‌پایدار اثر شتاب دهنده دارند. همچنین خاصیت انتخاب واکنش را داشته و می‌توانند از چندین واکنش ممکن یکی را انتخاب و کاتالیز نمایند و فقط در مورد واکنش انتخاب شده انرژی فعال را تا آن حد تنزل می‌دهند که تعادل برقرار گردد. این خاصیت آنزیم را خاصیت اختصاصی‌بودن[1] آنزیم می‌نامند. یک آنزیم با عمل اختصاصی تنها یکی از تعداد زیاد تغییرات ترمودینامیکی ممکن یک جسم را می‌تواند کاتالیز نماید. این مسئله برای کاتالیزورهای معدنی که در صنایع شیمیایی مورد استفاده قرار می‌گیرند نیز عمومیت دارد.

آنزیمی با خصوصیت اثر دیگر، کاتالیز واکنش را به نحو دیگری انجام می‌دهد. برای مثال در واکنش‌های زیر عمل اختصاصی برخی آنزیم‌ها مشخص شده است.

1- Reaction specificity



پروآنزیم‌ها یا زیموژن‌ها[1]

برخی از آنزیم‌ها ابتدا به‌صورت پروآنزیم یا زیموژن و یا آنزیم غیرفعال در سلول ساخته شده و برای شرکت در واکنش مربوط و پدیدار ساختن خاصیت کاتالیزوری خود باید به وسیله ماده دیگری به‌صورت فعال درآیند. بعضی از این زیموژن‌ها را در زیر نام می‌بریم:

۱- پپسینوژن آنزیم است که در سلول‌های مخاط معده ساخته می‌شود به وسیله اسیدکلریدریک موجود در شیره معده به‌صورت پپسین یا آنزیم فعال در می‌آید.

۲- تریپسینوژن پانکراس نیز یک نوع زیموژن است که توسط آنتروکیناز روده به‌صورت تریپسین فعال درمی‌آید.

۳- کیموتریپسینوژن نیز زیموژن دیگری است که توسط پانکراس ساخته می‌شود و هنگامی که به داخل روده‌ها ترشح شده و در مجاورت تریپسین قرار می‌گیرد، فعال می‌شود. فعال‌کننده‌های آلی از قبیل آنتروکیناز روده را اغلب کیناز[2] می‌نامند.

ساختمان آنزیم‌ها[3]

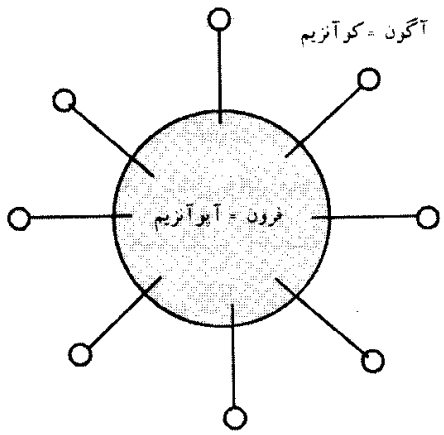
نظریه دو بخشی[4] که در سال ۱۸۹۴ به وسیله برتران[5] ارائه شد اکنون نیز مورد قبول زیست شناسان است. بر بنای این نظر هر سیستم آنزیم مرکب از دو بخش مختلف زیر می‌باشد:

۱- بخش تکیه‌گاه[6] یا حامل که یک سیستم کلوئیدی است و از مولکول‌های درشت یا میسل‌های عموماً پروتئینی تشکیل شده، اختصاصی و نسبت به حرارت حساس می‌باشد.

۲- بخش فعال که به حامل تکیه دارد و به وسیله آن گرفته شده است. این بخش به‌صورت یک لایه تک مولکولی در سطح میسل‌ها قرار دارد و تشکیل قسمت پیشگام (پروستتیک) آنزیم را می‌دهد. این بخش بلوری شکل، قابل تفکیک و در مقابل دما مقاوم می‌باشد. فون‌اولر[7] بخش کلوئیدی را به نام آپوآنزیم یا فرون[8] (گرفته شده از کلمهٔ phero به معنی من حمل می‌کنم) و بخش پیشگام (پروستتیک) را به نام کوآنزیم یا agon (گرفته شده از کلمهٔ ago به معنی من اثر می‌کنم) نامیده است. هم‌اکنون بخش اول و دوم را به ترتیب آپوآنزیم و کوآنزیم می‌نامند (شکل ۱-۳).

1- Zymogenes 2- Kinases 3- Structural of Enzyme 4- Dualite
5- Bertrant 6- Support 7- Fon alaire 8- Pheron

کوآنزیم‌ها و گروه‌های پروستتیک



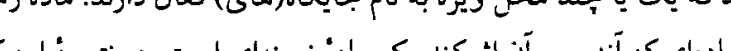
شکل ۱-۳. نمایش ساختمان دو بخشی آنزیم‌ها

پس از این که پروآنزیم یا زیموژن به‌صورت آنزیم فعال درآمد وجود بخش فعّال‌کننده برای ادامه عمل آنزیم ضرورت ندارد. ولی برخی از آنزیم‌ها به تنهایی قادر به انجام نقش متابولیکی خود نیستند و برای فعال شدن به مواد آلی دیگری به نام کوآنزیم نیازمندند. بخش پروتئینی این گونه آنزیم‌ها را آپوآنزیم می‌نامند. ترکیب آپوآنزیم و کوآنزیم‌ها، هولوآنزیم[1] یا آنزیم کامل نامیده می‌شود (آپوآنزیم +کوآنزیم ⟵ هولوآنزیم). حال اگر کوآنزیم را از ترکیب فوق خارج سازیم، آنزیم از فعالیت خود باز می‌ماند. کوآنزیم‌ها پروتئینی نیستند و به همین دلیل برخلاف آپوآنزیم از فعالیت در اثر حرارت تغییر ماهیت نمی‌دهند و غیرفعال نمی‌شوند. نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید (NAD)، فلاوین آدنین دی‌نوکلئوتید (FAD)، فلاوین مونونوکلئوتید (FMN) و سیتوکروم‌ها کوآنزیم‌هایی هستند که برای فعال ساختن آنزیم‌هایی که واکنش‌های اکسایشی و کاهش را کاتالیز می‌کنند به کار رفته و از اجزای ضروری تنفس سلولی می‌باشند. ویتامین B یا کربوکسیلاز کوآنزیمی است که در متابولیسم گلوکز نقش مهمی را عهده‌دار است. اسیدپانتوتنیک از تشکیل دهندهٔ کوآنزیم A به شمار می‌رود. این کوآنزیم نیز نقش عمده‌ای را در متابولیسم چربی‌ها و قندها ایفا کرده و وظیفه انتقال گروه (CH_3-C-) از یک مولکول به مولکول دیگر را به عهده دارد. از آن‌جایی که کوآنزیم‌ها بین آنزیم‌های مختلف واسطاند در متابولیسم اهمیت خاصی دارند. کوآنزیم‌ها در واکنش‌ها تشکیل بخشی را می‌دهند که به وسیلهٔ آنهاتعویض مواد خواه این مواد هیدروژنی، اسید فسفریک و یا گروه آلی باشد، وقتی واقعاً در محیط انجام می‌گیرد که این گروه‌های آنزیمی با پیوند پرانرژی به سوبسترا بپیوندند. از این جهت بوخنر[2] این کوآنزیم‌ها را متابولیت‌های ناقل نامگذاری کرده است.

بسیاری از کوآنزیم‌ها شباهت نزدیکی به ویتامین‌ها دارند. بعضی از مواد که آنها را پرو‌ویتامین می‌نامیم می‌توانند در بدن تبدیل به ویتامین گردند. نقش کاتالیزوری بسیاری از ویتامین‌ها شناخته شده است زیرا بعضی از آنها جزئی از ساختمان کوآنزیم‌ها را تشکیل می‌دهند. NAD و NADP را به علت آن که جزء پیریدینی این کوآنزیم‌ها دارای بار مثبت می‌باشد به‌صورت NAD^+ و $NADP^+$ نمایش می‌دهند. نقش این کوآنزیم‌ها در واکنش‌ها گرفتن و دادن H^+ می‌باشد. وقتی این کوآنزیم‌ها از سوبسترایی هیدروژن می‌گیرند، حلقهٔ پیریدین در مولکول آنها احیاء می‌شود و وقتی هیدروژن را از دست می‌دهند دوباره به وضع اول (اکسید شده) برمی‌گردند.

جایگاه فعال آنزیم‌ها[3]

آنزیم‌ها (E) پروتئین‌هایی هستند که یک یا چند محل ویژه به نام جایگاه(های) فعال دارند. ماده زمینه‌ای (S) به این جایگاه(ها) متصل می‌شود. هر ماده‌ای که آنزیم بر آن اثر کند یک مادهٔ زمینه‌ای است. در نتیجهٔ این کنش متقابل، مادهٔ زمینه‌ای از نظر شیمیایی تغییر پیدا کرده و به یک یا چند محصول (P) تبدیل می‌شود.

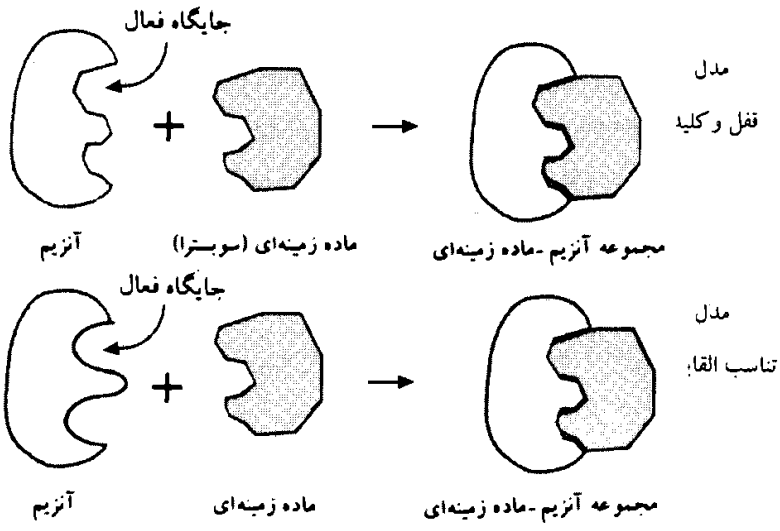


$$E + S \longrightarrow [ES] \longrightarrow E + P$$

در اینجا حد واسط، مجموعهٔ آنزیم - مادهٔ زمینه‌ای است. آنزیم‌ها واکنش را تا رسیدن به حالت تعادل تسریع

1- Holoenzyme 2- Buchner 3- Active site

می‌کنند. آنزیم‌ها آن قدر مؤثرند که ممکن است یک واکنش را 10^{8} تا 10^{11} بار سریع‌تر از حالت غیرکاتالیزی به انجام برسانند. آنزیم‌ها تا حدّ زیادی برای ماده زمینه‌ای خود اختصاصی هستند و اغلب مولکول‌های نزدیک و مشابهی را که تفاوت شکل اندکی دارند نمی‌پذیرند. این حالت را می‌توان با فرض این که آنزیم و مادهٔ زمینه‌ای کنش متقابل حالت قفل و کلید را دارند، بیان کرد. همان‌طور که در شکل صفحه بعد نشان داده شده است. آنزیم جایگاه فعالی دارد که مکمل شکل مادهٔ زمینه‌ای است. اگر مادهٔ زمینه‌ای شکل متفاوتی داشته باشد، نخواهد توانست به آنزیم متصل گردد (شکل ۳-۲).



شکل ۳-۲. مادهٔ زمینه‌ای به نحوی دقیق با جایگاه فعال وارد عمل می‌شود. بعضی از آنزیم‌ها دارای تناسب القایی می‌باشند و شکل جایگاه فعال فقط پس از این که مادهٔ زمینه‌ای به آنزیم متصل شد، کاملاً مکمل آن می‌گردد.

اگرچه می‌توانیم آنزیم‌ها را همانند قفل و کلید تصور کنیم، اما این بدان معنی نیست که جایگاه فعال آنزیم ساختمانی سخت و غیرقابل انعطاف است. در بعضی از آنزیم‌ها جایگاه فعال فقط بعد از این که ماده زمینه‌ای به آن متصل می‌شود، دقیقاً مکمل آن می‌گردد. این پدیده تناسب القایی نامیده می‌شود. همان‌طور که در شکل ملاحظه می‌شود چسبیدن مادهٔ زمینه‌ای تغییری ساختاری در پروتئین به وجود می‌آورد و فقط بعد از آن گروه‌های شیمیایی لازم برای کاتالیز شدن در تماس نزدیک با مادهٔ زمینه‌ای قرار خواهند گرفت. بعضی از آنزیم‌ها ممکن است ترجیحاً به یکی از چندین شکل ممکن مادهٔ زمینه‌ای بچسبند. بدین ترتیب انعطاف‌پذیری آنزیم و مادهٔ زمینه‌ای ممکن است به کاتالیز شدن کمک نماید. چسبیدن مادهٔ زمینه‌ای به جایگاه فعال دربردارندهٔ نیروهایی با طبیعت غیرکووالانسی (پیوندهای یونی، هیدروژنی و نیروهای واندروالز) است که محدودهٔ بسیار کوچکی دارند. این امر روشن می‌سازد که چرا مجموعهٔ آنزیم - مادهٔ زمینه‌ای فقط زمانی می‌تواند تشکیل شود که آنزیم دارای جایگاه فعالی باشد که به‌طور کامل مکمل شکل مادهٔ زمینه‌ای گردد.

ایزوآنزیم‌ها[1]

در گذشته تصور بر این بوده که تنها یک آنزیم می‌تواند روی یک سوبسترای موردنظر عمل کند. اما دقیق شدن روش‌های جدید تهیه نمونه‌ها، به‌خصوص الکتروفورز بر روی ژل آمیدون، امکان شناختن خانواده‌های آنزیمی را به‌دست داده‌اند که همه فعالیت یکسانی دارند اما مولکول هایشان اختلاف‌های کمی را نشان می‌دهند. این آنزیم‌ها را ایزوآنزیم نامند. در حال حاضر به خوبی مشخص شده که این ایزوآنزیم‌ها با تنوع‌های ژنتیکی که موجب اختلافاتی در طرز ردیف شدن اسیدهای امینه می‌شوند، ایجاد نشده‌اند. شبیه این اختلافات در هموگلوبین‌ها وجود دارد. این تنوع‌های ژنتیکی در ژنتیک مولکولی بررسی می‌شوند. بیش از حدود ۱۰۰ آنزیم که می‌توانند به‌صورت ایزوآنزیم‌ها

1- Isoenzyme

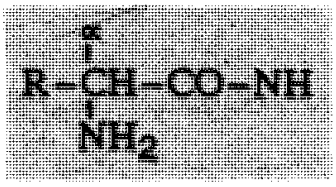
باشند شناخته شده‌اند. مثالی از این مورد که بیشتر معروف است، لاکتیکودئیدروژناز[1] (L.D.H) است که تبدیل پیرووات به لاکتات را هدایت می‌کند. ۵ ایزوآنزیم LDH که از نظر تحرکشان در الکتروفورز و از نظر نقطه ایزوالکتریکشان تفاوت دارند شناخته شده‌اند. مقادیر نسبی این ایزوآنزیم‌ها در هر بافت و برای هر مرحله از تمایز اختصاصی است.

عمل اختصاصی آنزیم‌ها

بر خلاف کاتالیزورهای غیر آلی فعالیت آنزیمی اختصاصی است، یعنی هر آنزیمی می‌تواند بر مادهٔ زمینه‌ای مشخصی اثر کند. در عین حال درجات مختلفی از تخصص وجود دارد. تخصص وقتی مطلق است که آنزیم منحصراً بر روی یک نوع سوبسترا اثر کند (مثل سوکسینیک، دئیدروژناز)، تخصص وقتی استرئوشیمیایی است که عمل آنزیم وابسته به وضعیت فضایی ترکیب شیمیایی باشد، زمانی نسبی است که آنزیم به تمام موادی که گوناگونی‌های ترکیبات یک نوع (تیپ)اند، اثر می‌کند.

عقیدهٔ فون‌اولر اختصاصی بودن آنزیم‌ها به علت وجود آپوآنزیم با ماهیت کلوئیدی است که در تشکیل این آنزیم‌ها شرکت می‌کنند.

علت اختصاصی بودن آنزیم‌ها را باید در ساختمان فضایی آن با سوبسترا جستجو کرد. بعضی از آنزیم‌ها می‌توانند نه تنها بر روی یک سوبسترای معین اثر کنند، بلکه قادرند بر روی تمام موادی که دارای یک عامل شیمیایی هستند نیز مؤثر باشند. در این صورت کلیدی را که فیشر مثال زده بود، می‌توان به شاه‌کلیدی تشبیه کرد که قادر است تمام قفل‌های یک راهرو را که دارای چندین در است باز کند. در چنین حالتی می‌گویند آنزیم دارای خاصیت اختصاصی گروهی یا عاملی است. برای مثال لیپازپانکراس موجب تجزیه تری‌پالمیتین، تری‌استئارین و تعداد فراوانی استرگلیسرول می‌گردد. بنابراین، این آنزیم نه تنها اختصاص به یک استر معین دارد بلکه بر روی هر عامل استری اثر داشته و اثر آن اختصاصی است. با تحقیق خاصیت اختصاصی بودن می‌توان از مکانیسم عمل آنزیم‌ها آگاهی‌هایی را به‌دست آورد. برای مثال آمینوپلی‌پپتیداز، ارتباط پپتیدی را موقعی قطع می‌کند که این ارتباط به یک گروه آمینه در وضع α نسبت به گروه CO متصل باشد.

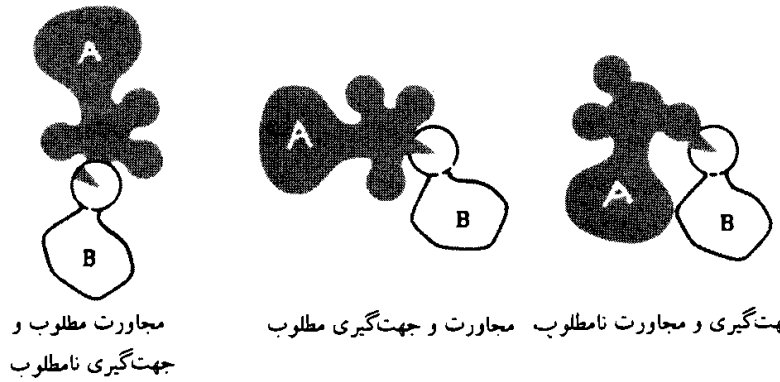


مجاورت و تعیین جهت سوبسترا، چرخش اوربیتالی

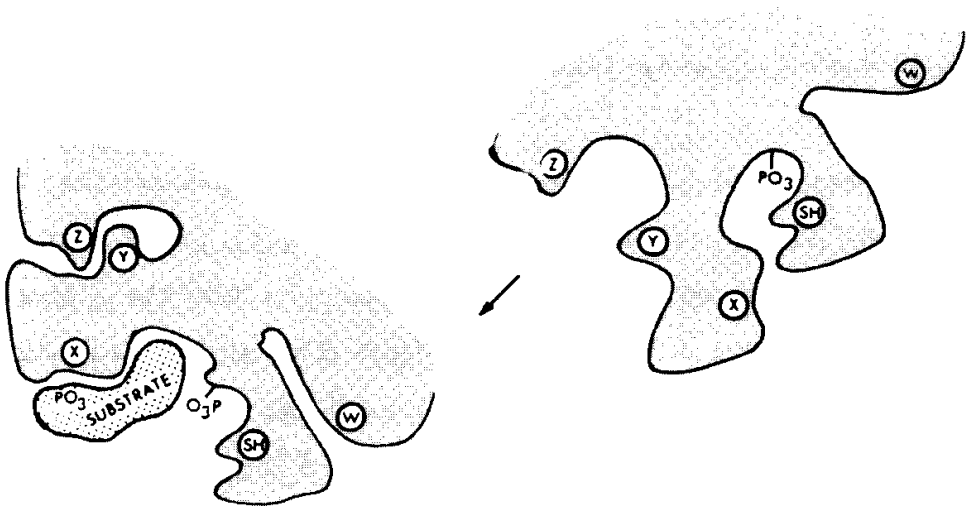
برای یک آنزیم آسان‌ترین روشی که بتواند باعث تسریع سرعت یک واکنش شود، متصل کردن یا تثبیت مولکول سوبسترا در مرکز فعال آنزیم است. با این عمل، آنزیم غلظت مؤثر سوبسترا را در یک حد مشخص افزایش می‌دهد. محاسباتی که در این مواد انجام گرفته نشان داده است که غلظت مؤثر سوبسترا در مرکز فعال آنزیم ممکن است به ۱۰۰ M برسد و به عبارت دیگر 10^5 برابر بیش از غلظت کلی سوبسترا در محلول آنزیم که فقط ۰/۰۰۱ M است باشد. چون سرعت واکنش‌های شیمیایی رابطه مستقیمی با غلظت مواد واکنش‌کننده دارد، انتظار می‌رود در چنین حدی از غلظت زیاد سوبسترا، افزایش سرعت بسیار زیادی‌انجام گیرد. سؤالی که در این جا مطرح می‌شود این است که این نوع ازدیاد سرعت تنها در اثر نزدیکی مولکول‌های واکنش‌کننده است و یا به واسطه جهت‌گیری خاص آنها نسبت به یکدیگر می‌باشد. ستورم و کوشلند[2] پیشنهاد کرده‌اند که یک کاربرد اصلی مرکز فعال آنزیم، ایجاد چرخش اوربیتالی یعنی جهت‌گیری دقیق مولکول سوبسترا و گروه کاتالیزی آنزیم در ارتباط با یکدیگر است. در

1- Lactico dehydrogenase 2- D.E. Koshland

نتیجه اوربیتال‌هایی که در ایجاد پیوند شرکت می‌کنند در رابطه ویژه‌ای مرتب می‌شوند که برای قرار دادن مستقیم مجموعهٔ آنزیم - سوبسترا در حالت‌گذار لازم است. (شکل ۳-۳ و شکل ۳-۴)



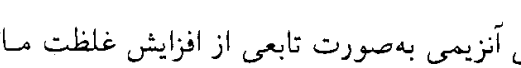
شکل ۳-۳. نمایی از فرضیهٔ چرخش اوربیتالی که پیشنهاد می‌کند سوبسترا و گروه کاتالیزی آنزیم نه تنها باید در مجاور یکدیگر باشند بلکه باید دقیقاً در ردیف یکدیگر نیز باشند به نحوی که اوربیتال‌های مربوط روی هم بیافتند. به این طریق به احتمال زیاد می‌توان به حالت‌گذار رسید.



شکل ۳-۴. طرح نشان دهنده تغییر وضعیت فضایی به هنگام عمل فسفوگلوکوموتاز قسمت بالای تصویر وضع آنزیم را در غیاب سوبسترا نشان می‌دهد.
قسمت پایین تغییرات وضعیت فضایی را که سوبسترا به همراه آورده مشخص می‌سازد.
این تغییرات موجب به خارج رانده شدن SH − و به داخل رفتن X، Y، Z، W می‌شود.
گرفته شده از کوشلند D.E. Koshland

آنزیم‌های آلوستریک یا تنظیم‌کننده

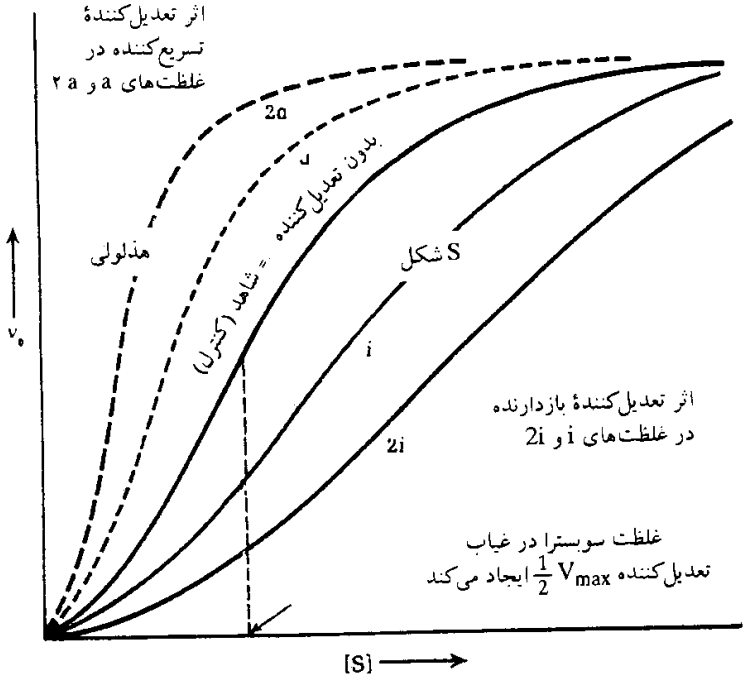
هنگامی که سرعت یک واکنش آنزیمی به‌صورت تابعی از افزایش غلظت ماده زمینه‌ای (سوبسترا) باشد، بسیاری از آنزیم‌ها منحنی هذلولی نشان داده شده در شکل ۳-۵ را نشان می‌دهند با افزایش مادهٔ زمینه‌ای مقدار بیشتری آنزیم به شکل مجموعه ES درآمده و سرعت پیدایش محصول افزایش می‌یابد.



$$E + S \longrightarrow [E.S] \longrightarrow P + E$$

در غلظت‌های زیاد ماده زمینه‌ای، اساساً تمام مولکول‌های آنزیم به شکل مجموعه ES بوده و حداکثر سرعت واکنش حاصل می‌شود. همهٔ آنزیم‌ها منحنی حرکتی هذلولی نداشته، بلکه بعضی دارای منحنی حرکت S شکل می‌باشند (شکل ۵-۳).

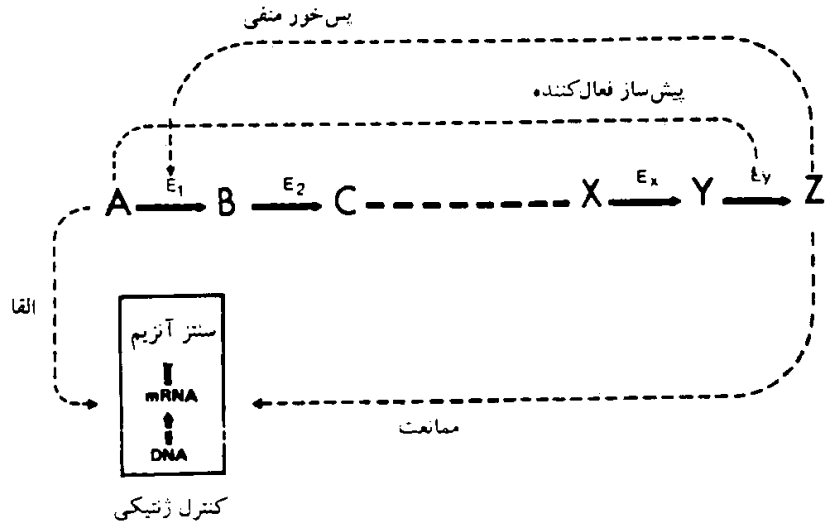
انواع اخیر، آنزیم‌های تنظیم‌کننده یا آلوستریک نامیده می‌شود. این آنزیم‌ها الیگومرها هستند و دارای دو (دیمر)، چهار (تترامر) یا چندین واحد کوچک‌تر بوده که با یکدیگر قادر به کنش متقابل می‌باشند. منحنی S شکل نتیجه این واقعیت است که چسبیدن اولین مولکول مادهٔ زمینه‌ای (سوبسترا) تمایل دومین مولکول برای اتصال به آنزیم را افزایش می‌دهد و این اثر به همین ترتیب ادامه می‌یابد. این تغییر میل ترکیبی به علت تغییر در شکل مولکول آنزیم است. در شکل قبل دیده می‌شود که در منحنی ناحیه‌ای وجود دارد که در آن افزایش جریان غلظت مادهٔ سوبسترا سبب افزایش بسیار زیاد فعالیت آنزیم می‌گردد. آنزیم‌های آلوستریک ارزش تنظیم کنندگی زیادی دارند چون با



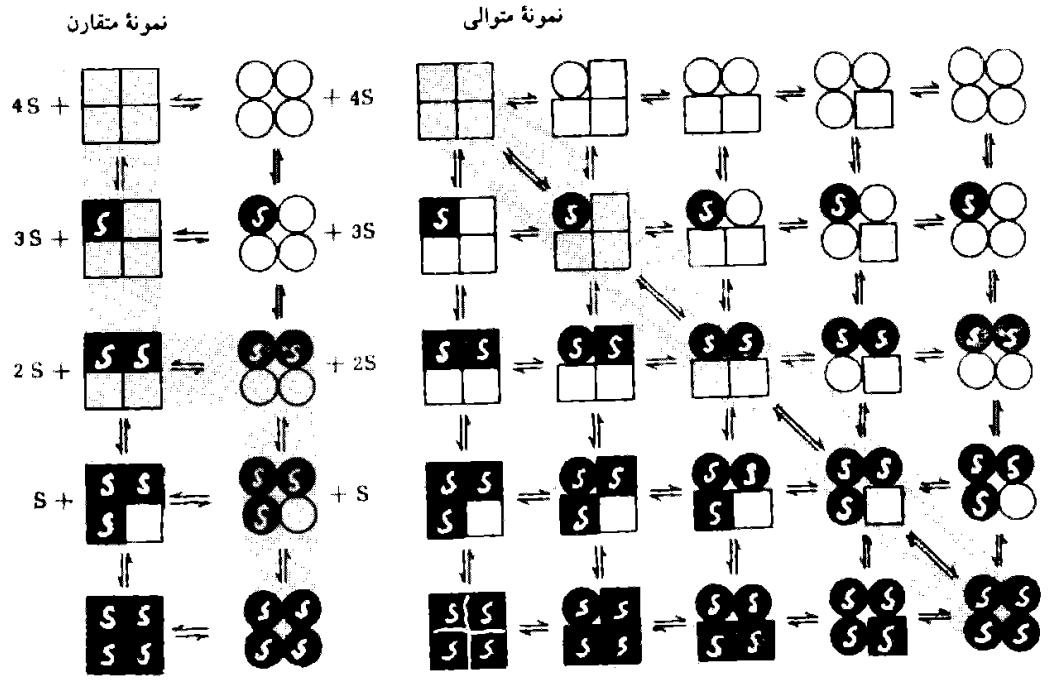
شکل ۳-۵. منحنی S شکل، مشخصه یک آنزیم تنظیم‌کننده با آلوستریک. تفاوت آن را با منحنی هذلولی شکل مشاهده کنید. تحت اثر فعال‌کننده، منحنی بیشتر به حالت هذلولی درمی‌آید، در حالی که ممانعت‌کننده آن را بیشتر S شکل می‌کند.

تغییرات جزئی غلظت S تغییرات زیادی در فعالیت آنها می‌تواند به وجود آید. آنزیم‌های تنظیم‌کننده به موادی که تغییر دهنده‌های آلوستریک نامیده شده و به‌عنوان فعال‌کننده یا ممانعت کننده عمل می‌کنند، حساس می‌باشند. این تغییر دهنده‌ها بیشتر به محلی غیر از جایگاه فعال آنزیم متصل می‌شوند. اتصال تغییردهنده باعث تغییر شکلی در جایگاه فعال می‌شود که در نتیجه تمایل آنزیم به مادهٔ زمینه‌ای افزایش یا کاهش پیدا می‌کند. آنزیم‌های آلوستریک در تنظیم سوخت و ساز سلول دارای اهمیت بیشتری هستند. تعداد بسیار زیاد آنزیم‌های درون سلولی وتنوع فرایندهای لازم برای عمل عادی آنها، مکانیسم‌های تنظیم‌کننده‌ای را ایجاب می‌کنند. برای مثال هورمون‌ها می‌توانند به‌عنوان تنظیم‌کننده متابولیسم سلولی عمل کنند. مثلاً تیروکسین فسفوریلاسیون را از اکسایش جدا می‌کند و بدین ترتیب مقادیر سنتز آدنوزین‌تری‌فسفات در چرخه کربس را کاهش می‌دهد. همزمان با این عمل مقادیر مصرف اکسیژن فزایش می‌یابد. آدرنالین در حضور ATP و یون‌های منیزیم، فسفوریلاز b را که غیرفعال است به یک فسفوریلاز a که فعال است تبدیل کرده و با این عمل تشکیل گلوکز از گلیکوژن را افزایش می‌دهد. انسولین عمل هگزوکیناز، آنزیمی که گلوکز و آدنوزین تری‌فسفات را به گلوکز - ۶ - فسفات و آدنوزین‌دی‌فسفات (ADP) تبدیل می‌کند متوقف می‌سازد (شکل ۳-۶ و شکل ۳-۷).

مربوط به ص ۶۹ شکل ۳-۶



شکل ۳-۶. آنزیم‌ها در سطوح تجزیه‌ای و ژنی (سنتز آنزیم) تنظیم شده‌اند. در پس‌خور منفی، محصول نهایی (Z) زنجیر متابولیکی به‌صورت یک ممانعت کنندهٔ آلوستریک بر روی اولین آنزیم این مسیر عمل می‌کند. در فعال‌کنندگی، پیش ساز اولین متابولیت (A) در این مسیر، فعال کنندهٔ آلوستریک آخرین آنزیم می‌باشد. ساختکارهای کنترل ژنتیکی سنتز آنزیم را برحسب احتیاجات سلولی تنظیم می‌کنند. در القاء (اپرون لاکتوز) حضور مادهٔ زمینه‌ای، سنتز آنزیم‌هایی که آن را تجزیه می‌کنند تحریک می‌نماید، در حالی که در تنظیم منفی (اپرون تریپتوفان)، تجمع محصول نهایی، تولید آنزیم را متوقف می‌کند.



شکل ۳-۷. دو نمونه برای نمایش تبدیل اشکال فعال و غیرفعال آنزیم‌های آلوستریک به یکدیگر. در نمونه متقارن یا نمونهٔ همه یا هیچ فرض می‌شود که همهٔ زیر واحدها دارای ساختمان فضایی یکسان باشند، شکل □ یا ○. اتصال تدریجی لیگاند باعث ایجاد شکل ○ که دارای میل ترکیبی بیشتری است، می‌شود. راه احتمالی با رنگ خاکستری مشخص شده است. در نمونهٔ متوالی هر زیر واحد در پروتئین چند بخشی می‌تواند به شکل □ یا ○ باشد. بنابراین وجود ساختمان‌های فضایی بسیار زیادی امکان‌پذیر است، لیکن راهی که با سایه مشخص شده است و به وسیلهٔ پیکان موزّب نشان داده شده است محتمل‌ترین راه است.

راه‌های سنجش فعالیت آنزیم‌ها

۱- **استفاده‌از روش اسپکتروفتومتری:** برخی از مواد شیمیایی نور را در طول موج‌های به خصوصی جذب می‌کنند. چنانچه در یک فعل و انفعال آنزیمی مادهٔ اولیه و یا ماده حاصل قدرت جذب نور را داشته باشد می‌توان میزان تولید محصول و یا از بین رفتن سوبسترا را با اسپکتروفتومتری تعیین نمود.

۲- **استفاده از رادیوایزوتوپ‌ها:** مواد رادیواکتیو را می‌توان به‌عنوان مواد ردیاب استفاده نمود و چگونگی عمل آنزیم‌ها را بر روی سوبسترا پس از نشان‌دار کردن اتم‌های ویژه‌ای مشخص ساخت. برای مثال چگونگی تبدیل شدن گلوکز به اسیدپیرورویک، اسیدلاکتیک، الکل اتیلیک و گازکربنیک بعد از استفاده از کربن رادیواکتیو (C^{14}).

طبقه‌بندی و نامگذاری آنزیم‌ها

در گذشته اسامی آنزیم‌ها برپایه تخصص آنها یا توان عملشان بر روی یک مادهٔ خاص انتخاب می‌شد. برای مثال آنزیمی که با حضور یک عامل همراه (کوفاکتور) اکسید شده (NAD) و یک مولکول آب، اسیدگلوتامیک را به اسید α - ستوگلوتاریک و آمونیاک تبدیل می‌کند، گلوتامیک دئیدروژناز نامیده می‌شود. آنزیمی که در PH بالا یک مونواستر اُرتوفسفریک را به یک الکل و اُرتوفسفات تجزیه می‌کند، فسفاتاز قلیایی نامیده می‌شود. آنزیم‌هایی که پلی‌پپتیدها (پروتئین‌ها) را به قطعات کوچکی از زنجیره‌های پپتیدی یا به اسیدهای امینه تجزیه می‌کند، به‌طور کلی پروتئیناز[1] نامیده می‌شوند. در حال حاضر نامگذاری‌های جدید آنزیم‌ها به‌طور رسمی بربنای پیشنهادات کنفرانس‌های بین المللی بیوشیمی صورت می‌گیرد. در تقسیم‌بندی جدید آنزیم‌ها را به حسب واکنش‌های شیمیایی

1- Proteinases

که رهبری می‌کنند به ۶ گروه اصلی عمومی تقسیم‌بندی می‌کنند که عبارتند از:

۱- اکسیدوردوکتاز[1]

به‌طور کلی آنزیم‌هایی را که واکنش‌های اکسایشی و کاهشی را کاتالیز می‌کنند، اکسیدوردوکتاز می‌نامند. اغلب این آنزیم‌ها برای انجام عمل خود نیازمند به کوآنزیم می‌باشند. از انواع مهم آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز می‌توان به دئیدروژنازها، اکسیدازها، پراکسیدازها و کاتالازها اشاره نمود.

دئیدروژنازها آنزیم‌هایی هستند که برداشت هیدروژن از یک ماده آلی و انتقال آن به یک ماده آلی دیگر را که به آسانی قابل احیا شدن است کاتالیز می‌نمایند. NAD، FAD، FMN و سیتوکروم‌ها از جمله کوآنزیم‌های مهم و کنش‌های اکسایشی و کاهشی محسوب می‌شوند.

اکسیژنازها: اکسیژن مولکولی را فعال نموده و در نتیجه ترکیب اکسیژن با سوبسترا را تسهیل می‌نمایند.

کاتالازها: آنزیم‌هایی هستند که تجزیه پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن کاتالیز می‌کنند.

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{کاتالاز}} 2H_2O + O_2$$

پراکسیدازها به گروهی از آنزیم‌ها اطلاق می‌شود که علاوه بر آب اکسیژنه قادر به تجزیه پراکسیدهای آلی نیز می‌باشند، ولی فقط در حضور ماده‌ای که به آسانی قابل اکسیدشدن باشد قادر به انجام این عمل خواهند بود.

۲- هیدرولازها[2]

این گروه آنزیمی بیشتر در واکنش‌های هیدرولیزی شرکت می‌کنند. بیشتر واکنش‌هایی که در دستگاه گوارش توسط آنزیم‌های گوارشی کاتالیز می‌شوند از این نوع می‌باشند. در زیر به شرح چند نوع از این آنزیم‌ها می‌پردازیم:

۱) **کربوهیدرازها:** این آنزیم‌ها هیدرولیز پلی‌ساکاریدها و دی‌ساکاریدها را به قندهای ساده کاتالیز می‌نمایند.

الف - آمیلازها هیدرولیز نشاسته و تبدیل آن به دکسترین و مالتوز را کاتالیز می‌کنند. آمیلازها را می‌توان در بزاق دهان، در عصاره مالت و در ترشحات روده یافت.

ب - سوکراز یا انورتاز آنزیم دیگری از این گروه است که شکر را هیدرولیز کرده و آن را به گلوکز و فروکتوز تبدیل می‌نماید. این مخلوط را به نام قند انورت می‌نامند.

پ - مالتاز مالتوز را هیدرولیز و به دو مولکول گلوکز تبدیل می‌نماید. به همین ترتیب لاکتاز، لاکتوز یا قند شیر را به گلوکز و گالاکتوز هیدرولیز می‌کند.

۲) **استرازها:** این گروه از آنزیم‌ها استرها را به الکل و اسید هیدرولیز می‌نمایند.

الف - لیپازها: به آن دسته از آنزیم‌ها اطلاق می‌شود که تجزیه چربی‌های خنثی به اسیدهای چرب و گلیسرول را کاتالیز می‌نمایند. نمونه لیپازها را می‌توان در شیره معده و پانکراس یافت.

ب - فسفاتازها: فسفاتازها را نیز می‌توان در گروه استرازها طبقه‌بندی نمود زیرا هیدرولیز استرهای اسیدفسفریک را به یک الکل و اسید فسفریک کاتالیز می‌نمایند. بدین ترتیب هنگامی که گلیسروفسفات تحت اثر این گروه از آنزیم‌ها قرار گیرد به گلیسرول و اسیدفسفریک تجزیه می‌گردد.

۳) **پروتئازها:** پروتئازها هیدرولیز پروتئین‌های طبیعی و مشتقات آنها را به اسیدهای امینه و پپتیدها کاتالیز

1- Oxydoreductases 2- Hydrolases

می‌کنند. بعضی از انواع پروتئازها عبارتند از:

الف - پپتیدازها آنزیم‌هایی هستند که پلی‌پپتیدها را به اسیدهای امینه تبدیل می‌کنند. محل اثر پپتیداز پیوند پپتیدی است که در مجاورت یک گروه امینه و یا گروه کربوکسیل آزاد قرار داشته باشد و به همین جهت اسیدهای امینه انتهایی زنجیرهای پپتیدی را از آن جدا می‌کنند.

ب - پروتئینازها: هیدرولیز پروتئین‌ها به مشتقات پروتئین را کاتالیز نموده و چون محل اثر آنها پیوندهای پپتیدی داخل پروتئین‌هاست به نام آندوپپتیداز نیز نامیده می‌شوند. پپسین معده پروتئین‌ها را به پپتونها و پپتونها را به پلی‌پپتید تبدیل می‌کند. بالاخره رنین معده نیز کازئین شیر را به پاراکازئین هیدرولیز می‌نماید.

۴) **ترانسفرازها**[1]: شامل چهار دسته‌اند:

C - ترانسفرازها در انتقال ریشه‌های متیل و استیل دخالت می‌کنند که اولی را متیل ترانسفراز و دومی را به نام کولین استیلاز می‌نامند.

N - ترانسفرازها که موجب انتقال ریشه‌های امینه می‌گردند(NH_3).

S - ترانسفرازها که در انتقال عامل SH دخالت می‌نمایند. کوآنزیم این آنزیم‌ها از نوع کوآنزیم‌های استیلاسیون می‌باشند.

P - ترانسفرازها که در انتقال ریشه‌های فسفریل یا فسفات دخالت دارند مانند موتازها که گلوکز ۱- فسفات را به گلوکز ۶- فسفات تبدیل می‌کند.

۵) **ایزومرازها**[2]: این آنزیم‌ها جسمی را به ایزومر خودش تبدیل می‌کنند و در واقع هیدروژن را در داخل مولکول تغییر مکان می‌دهند (مانند فسفوهگزوز - ایزومراز).

۶) **لیگازها یا سنتازها**[3]: این گروه آنزیمی باعث تراکم دو مولکول با جداکردن یک پیوند فسفات می‌گردند. نمونه این آنزیم‌ها تیروزین هیدروگزامات سنتاز است. این آنزیم موجب تراکم تیروزین با هیدروکسیل‌امین شده یک مولکول ATP را به AMP و پیروفسفات (PPi) تبدیل می‌کنند.

۷) **لیازها**[4]: این آنزیم‌ها باعث افزایش یا کاهش گروه‌هایی به پیوندهای مضاعف می‌شوند.

خواص عمومی آنزیم‌ها

الف - وضع ظاهری: آنزیم‌ها اگر به حالت خالص و خشک باشند به‌صورت گرد بی‌شکل سفید و گاهی رنگی می‌باشند. بعضی از آنها را توانسته‌اند به‌صورت متبلور استخراج نمایند مثل: اوره‌آز (۱۹۲۶)، پپسین (۱۹۳۲)، تریپسین (۱۹۳۴)، پپسینوژن (۱۹۳۵) و پاپائین (۱۹۳۷).

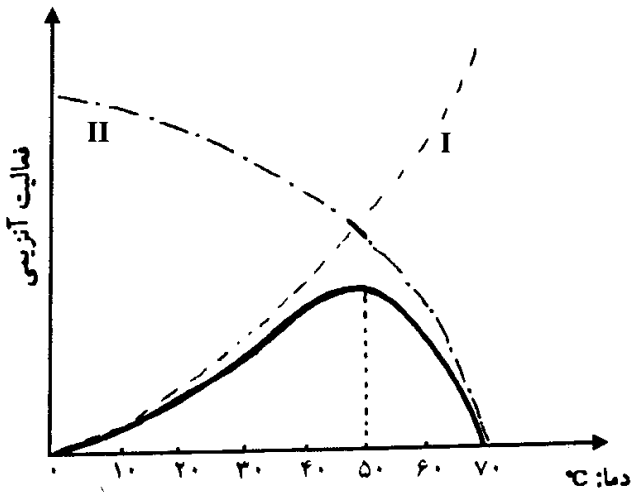
ب - حلالیت: آنزیم‌ها عموماً در آب و گلیسرول محلول هستند ولی در الکل و بعضی از حلال‌های نمکی سولفات آمونیاک، سولفات منیزیم و فسفات‌های قلیایی و مانند آن نامحلولند.

ج - فعالیت: آنزیم‌ها به مقدار خیلی کم، اثر زیادی دارند. برای پی‌بردن به فعالیت آنزیم‌ها تعداد مولکول‌های سوبسترا یعنی ماده‌ای را که آنزیم روی آن اثر می‌کند در واحد زمان و برحسب مقدار جسم مثلاً برحسب میلی‌گرم تعیین می‌کنند و شرایط محیط مانند PH، حرارت، غلظت جسم تجزیه شونده را نیز مشخص می‌سازند. همچنین می‌توان فعالیت مولار را تعیین کرد. فعالیت مولار عبارت از تعداد مولکول‌های تغییر یافته از سوبسترا یا تعداد

1- Transpherases 2- Isomerases 3- Ligases = Synthetases 4- Lyases

مولکول‌های فراورده حاصل در مدت یک دقیقه و به وسیله یک مولکول آنزیم می‌باشد. فعالیت آنزیمی را می‌توان بااندازه‌گیری سرعت واکنش ارزیابی کرد. برای این کار باید مقداری از سوبسترا راکه در زمان معینی در محیط ناپدید می‌شود و یا مقدار جسم تشکیل شده را تعیین کرد. آنزیم‌ها پس از مدتی پراکندگی در محیط به‌تدریج فعالیت خود را از دست می‌دهند و به اصطلاح پیر می‌شوند. این پدیده به ویژه اگر حرارت زیاد باشد رخ می‌دهد. در محیط خشک آنزیم مدتی کوتاه حفظ می‌گردد ولی به زودی از فعالیت می‌افتد.

د- دما: در دمای صفر درجه فعالیت آنزیم‌ها خیلی کم است و از صفر به پائین فعالیت آن دیگر قابل ملاحظه نیست ولی در این درجات، آنزیم‌ها تنها غیرفعال می‌باشند. به عبارت دیگر از بین نرفته‌اند زیرا آنزیم‌ها دمای خیلی پایین را تحمل می‌کنند. معهذا اغلب در هوای مایع و دمای زیاد خراب می‌شوند. فعالیت آنزیمی برحسب نوع آنزیم در دمای بین ۴۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد به حداکثر می‌رسد. بین ۷۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد محفوظ می‌ماند. به‌طور کلی آنزیم‌ها نسبت به حرارت حساس هستند[1]. اگر دما از حد معینی تجاوز کند اثر مخرب داشته و موجب تغییر ماهیت آنزیم‌ها می‌گردد به نحوی که دو منحنی در مورد اثر دما بر روی آنزیم می‌توان به‌دست آورد که یکی معرف فعالیت آنزیم به وسیله دما و دیگری معرف غیرفعال شدن آن به وسیله دما می‌باشد (شکل ۳-۸).



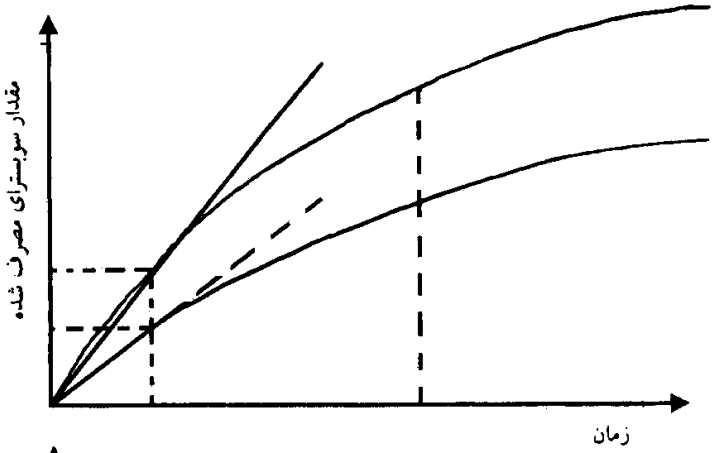
شکل ۳-۸. اثر دما روی فعالیت آنزیمی I فعال شدن واکنش‌های آنزیمی به وسیلهٔ دما II غیرفعال شدن آنزیم

تأثیر غلظت آنزیم و سوبسترا در فعالیت آنزیمی

در این مورد دو حالت را در نظر می‌گیریم که عبارتند از:

۱- **سوبسترا ثابت و آنزیم متغیر:** وقتی که PH و حرارت ثابت باشند و مقدار زیادی سوبسترا در محیط وجود داشته باشد، سرعت واکنش که بعد از مدت کوتاهی اندازه گرفته می‌شود، به‌طور مستقیم به مقدار آنزیم بستگی دارد و نتیجه به‌دست آمده خط مستقیم می‌باشد. وقتی که غلظت سوبسترا خیلی زیاد باشد، سطح فعال آنزیم به‌طور دائم به وسیله سوبسترا اشباع می‌شود و دوباره بازده حداکثر است و تنها از مقدار آنزیم موجود پیروی می‌کند، ضمناً سرعت اولیه واکنش به تعداد مولکول‌های آنزیم بستگی دارد و این موضوع در صورتی ارزش دارد که اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی پس از مدت زمان کوتاهی انجام شده باشد به نحوی که سرعت واکنش برابر سرعت اولیه یعنی V_0 باشد و دیگر این که مقدار سوبسترای تغییر شکل یافته زیاد نباشد. فعالیت آنزیمی برحسب زمان برای دو مقدار مختلف آنزیم E_1 و E_2 که در آن $E_2 = 2E_1$ است با توجه به مقدار سوبسترا در شکل ۳-۹ به وسیله دو منحنی نشان داده شده است. پس از زمان کوتاه t_1 مقدار سوبسترای تغییر یافته به نسبت ۱ و ۲ می‌باشد. برعکس اگر مقدار سوبسترا به یک حد مطلوب نرسد و اندازه‌گیری بعد از زمان طولانی انجام گیرد سرعت واکنش مستقل از غلظت آنزیم بوده و مقدار ثابتی خواهد بود به نحوی که آنزیم به‌تدریج زیاد می‌گردد.

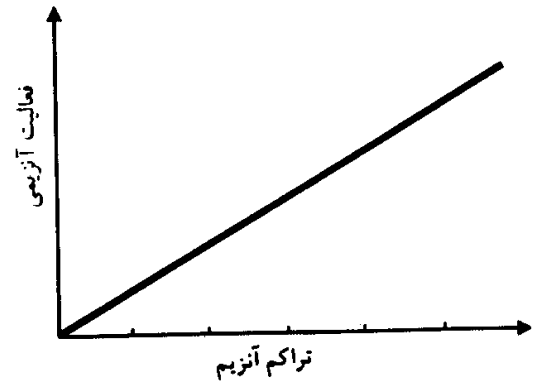
1- Thermolabile



شکل ۳-۹. سرعت واکنش آنزیمی برحسب مقدار آنزیم در محیط. منحنی‌ها مربوط به مقادیر مختلف دو آنزیم یعنی E_1 و E_2 است که در آن $E_2 = 2E_1$ است.

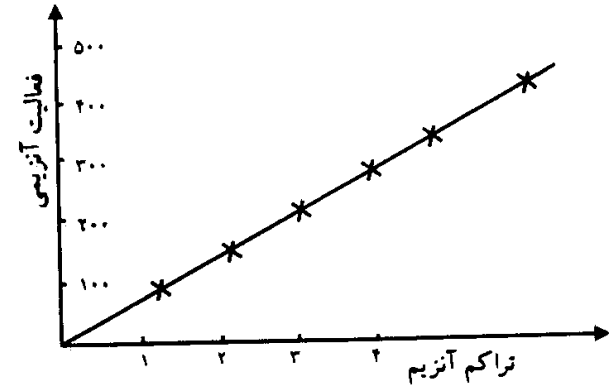
در زمان t نسبت درصد غلظت آنزیم دیگر بررسی نشده است (شکل ۳-۱۰).

۲- **آنزیم ثابت و سوبسترا متغییر است:** اگر مقدار ثابتی از آنزیم را روی مقادیری از سوبسترا که به‌تدریج زیاد می‌شود بریزیم، ملاحظه می‌شود که اگر غلظت سوبسترا خیلی کم باشد (در غلظت‌های کم، آنزیم اثر نمی‌کند) سرعت واکنش بستگی به مقداری از سوبسترا دارد که از حد معینی S_1 کمتر است ولی اگر غلظت سوبسترا از حد S_1 تجاوز کند، سرعت واکنش، مستقل از آن می‌گردد. تا وقتی که غلظت سوبسترا پایین است کلیه مولکول‌های آنزیم با آن وارد عمل نمی‌شوند و به همین دلیل است که فعالیت آنها به حداکثر نمی‌رسد (شکل ۳-۱۱).



شکل ۳-۱۰. تأثیر تراکم آنزیم بر روی فعالیت آنزیم‌ها. اگر مقدار سوبسترا نسبت به مقدار آنزیم کافی باشد، سرعت واکنش آنزیمی به نسبت مقدار آنزیم می‌باشد.

فعالیت حداکثر وقتی بروز می‌کند که غلظت سوبسترا به حد کافی باشد. در این صورت می‌گوییم که آنزیم به وسیله سوبسترا اشباع شده است. از این پس افزودن هر مقدار دیگر از سوبسترا در سرعت واکنش بی‌تأثیر است و در این شرایط سرعت ثابت باقی می‌ماند.



شکل ۳-۱۱. تأثیر تراکم آنزیم در فعالیت ساکاراز. محور افقی مقدار آنزیم، محور عمودی مقدار گلوکز را برحسب mg نشان می‌دهد.

بنابراین تا غلظت مورد بحث S_1، سرعت واکنش از قانون واکنش‌های یک مولکولی ویلهلمی پیروی می‌کند و ضریب واکنش با فرمول ویلهلمی تعیین می‌گردد:

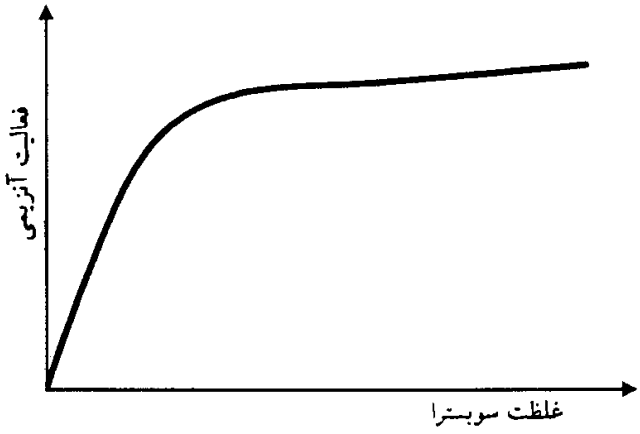
$$K = \frac{1}{t'} - \frac{t \log S}{S - S'}$$

که در آن K ضریب سرعت و S و S′ غلظت‌های سوبسترا در زمان‌های t و t′ هستند. از غلظت S′ به بعد، سرعت ثابت می‌شود یعنی مستقل از غلظت سوبسترا می‌گردد بنابراین دیگر موضوع واکنش یک مولکولی مطرح نیست. با

توجه به آنچه که شرح داده شد می‌توان نظریه ویکتورهانری راکه در سال ۱۹۰۳ در مورد ترکیب E و S ارائه شد و در سال ۱۹۱۳ به وسیله میکائیلیس تکمیل گردید مورد تفسیر قرار داد:

$$E + S \longrightarrow ES$$

وقتی که تمام آنزیم به‌صورت ترکیب درآمده باشد افزودن سوبسترا موجب افزایش سرعت نمی‌گردد (شکل ۳-۱۲).



شکل ۳-۱۲. سرعت واکنش آنزیمی برحسب غلظت سوبسترا

سینتیک آنزیمی

همان‌طور که شرح داده شد، فعالیت آنزیمی به برخی عوامل خارجی مثل دما، تراکم، یون‌های هیدروژن و مانند آن بستگی دارد. به منظور بررسی سینتیک آنزیمی بایستی این عوامل را ثابت نگاه داشت. در چنین شرایطی و با حضور مقدار کافی از سوبسترا، واکنش هدایت شونده به وسیله آنزیم سرعتی متناسب با غلظت آنزیم دارد. به‌طور خلاصه در نظر بگیریم که تشکیل ترکیب پیچیده یا مختلط (ES) مطرح باشد:

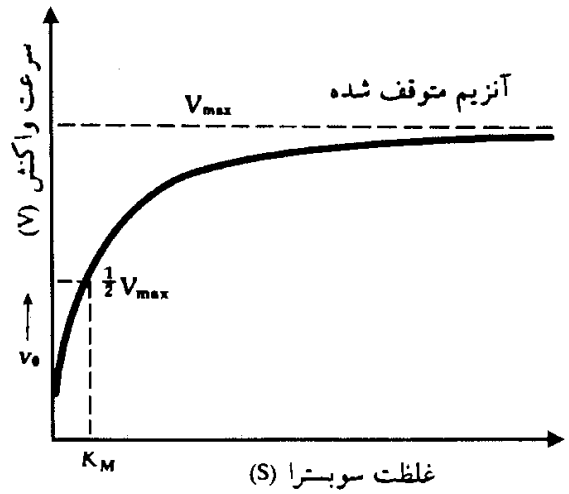
(مجموعه) ترکیب پیچیده ⟵ سوبسترا + آنزیم

$$E + S \longrightarrow (E.S) \qquad (۱)$$

K_1 عبارت است از ثابت اشتراک برای تشکیل مجموعه و $K + 1$ ثابت تفکیک می‌باشد. در مرحلهٔ بعدی، مجموعه E.S محصولات واکنش را به دست داده و آنزیم آزاد می‌گردد.

$$ES \qquad E + P_1 + P_2 \qquad (۲)$$

همان‌طور که در منحنی زیر مشاهده می‌شود سرعت واکنش آنزیمی (V) وابسته به غلظت سوبسترا (S) است. سرعت اولیه سریعاً افزایش می‌یابد و واکنش از نوع اول دنبال می‌شود یعنی مقادیر ترکیب مختلط آنزیم - سوبسترای تشکیل شده متناسب (تابعی) از تراکم سوبسترا است.

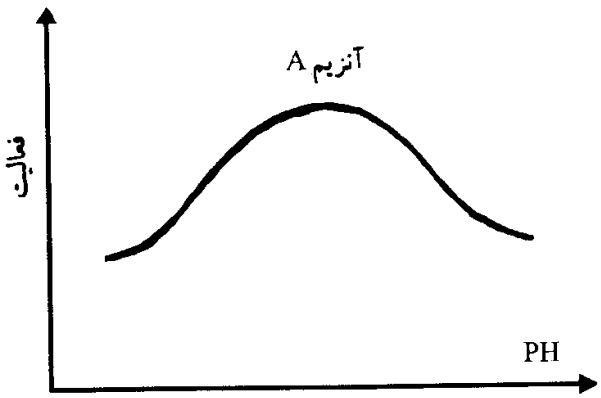


شکل ۳-۱۳. سینتیک آنزیمی، اثر غلظت سوبسترا و سرعت واکنش

وقتی سرعت حداکثر (V_{max}) حاصل شد، افزایش سوبسترا هیچ تأثیری بر سرعت واکنش ندارد و منحنی به‌صورت افقی می‌ماند (شکل ۳-۱۳). نقطه $\frac{V_{max}}{2}$ در هر وضعیت نصف سرعت حداکثر به‌دست آمده و تصویر آن K_S، ثابت میکائیلیس را نشان می‌دهد. به عبارت دیگر، ثابت میکائیلیس تراکمی از سوبستراست که برای حصول نصف سرعت حداکثر لازم است. K_S بر بنای مولکول‌گرم در لیتر سوبسترا مشخص می‌شود و هرچه این مقدار کمتر باشد، تناسب (ارتباط) آنزیم و سوبسترا بیشتر است. یک آنزیم می‌تواند بسیار اختصاصی باشد یعنی تنها بر یک سوبسترا اثر کند، یا بر سوبستراهای مختلفی با قطع یک ریشهٔ خاص از مولکول تأثیر نماید. برای مثال الکل

دئیدروژناز بر الکل‌های مختلف اثر می‌کند و آنها را به آلدئیدهایشان تبدیل می‌نماید. تناسب یک آنزیم برای همهٔ سوبستراها یکسان نیست، این اصل را می‌توان از ثابت میکائیلیس نتیجه گرفت.

غلظت اشباع از آنزیمی به آنزیمی دیگر و برای هر آنزیم از یک سوبسترا به سوبسترای دیگر متفاوت است. تراکم یون‌های هیدروژن نیز اثر قابل توجهی در سینتیک آنزیمی دارد. اگر فعالیت آنزیمی را به حسب درجات افزایش PH، از سوی PH اسیدی مشخص کنیم، منحنی به شکل زنگ به‌دست می‌آید قسمت برجسته (قلّه) منحنی نشان‌دهنده PH مناسب است که در آن فعالیت آنزیم به حداکثر می‌رسد (شکل ۳-۱۴). در محیطی که به شدت قلیایی یا به شدت اسیدی باشد، ممکن است بخش پروتئینی آنزیم از حالت طبیعی خارج شود و آنزیم به وضعی غیرقابل برگشت، غیرفعال شود. با این وجود برخی از آنزیم‌ها در محیط‌های بسیار اسیدی (مثلاً پپسین در PH = ۲) و برخی در محیط خیلی قلیایی (فسفاتازهای قلیایی در ۱۰ تا PH = ۸/۵) فعالیت حداکثر خود را پیدا می‌کنند.



شکل ۳-۱۴. اثر pH بر فعالیت آنزیم.

دما یکی دیگر از عواملی است که بر سینتیک واکنش‌های آنزیمی تأثیر می‌گذارد. چنانچه دما به‌تدریج افزایش یابد، فعالیت آنزیم نیز به‌تدریج ابتدا حد مناسبی پیدا کرده و به دنبال آن فعالیت کم شده و در نهایت متوقف می‌گردد. این کاهش فعالیت نتیجه خارج شدن تدریجی بخش پروتئینی آنزیم از حالت طبیعی است عدهٔ کمی از آنزیم‌ها مثل آدنیل کیناز در گرمای ۱۰۰° هنوز فعالند. همانند تمام واکنش‌های شیمیایی سرعت فعالیت آنزیمی نیز از قانون وانت‌هوف[1] پیروی می‌کند یعنی: به ازای ۱۰ درجه‌سانتی‌گراد افزایش دما سرعت، واکنش دو برابر می‌شود.

راه‌های جلوگیری از فعالیت آنزیم‌ها

بعضی از ترکیبات شیمیایی می‌توانند با عوامل شیمیایی موجود در جایگاه فعال آنزیم یا با یون‌های فعال‌کننده آنزیم ترکیب شوند و بدین ترتیب سدی در مقابل فعالیت کاتالیزوری آنزیم ایجاد نمایند (ترکیبات مهارکننده آنزیم) در سلول ترکیباتی وجود دارند که باعث تنظیم سرعت واکنش‌های شیمیایی آن می‌گردند. این ترکیبات را به دو دسته تقسیم می‌کنند:

۱- آنهایی که عمل برگشت‌پذیر دارند:

الف - مهارکننده‌های رقابتی[2]

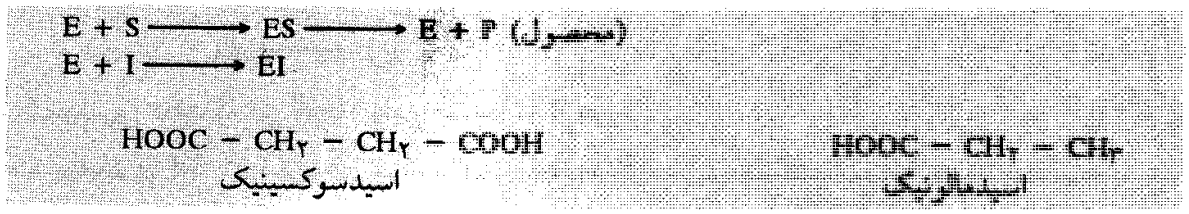
ب - مهارکننده‌های غیررقابتی[3]

۲- آنهایی که عمل برگشت‌ناپذیر دارند:

الف - مهارکننده‌های رقابتی: از نظر ساختمان شیمیایی شبیه سوبسترا هستند به این دلیل به جای مولکول سوبسترا در جایگاه فعال آنزیم جای می‌گیرند. این مواد دارای دو خاصیت مهم هستند که عبارتند از: اول این که با افزایش غلظت سوبسترای حقیقی می‌توان به‌تدریج آنزیم را از مهارکننده آزاد نمود. زیرا در این حالت مهارکننده و

1- Vant Thoff 2- Competitive inhibitor 3- Noncompetitive inhibitor

سوبسترای حقیقی برای ترکیب شدن با جایگاه فعال آنزیم با هم رقابت می‌کنند و دیگر این که ترکیبات به‌طور اختصاصی بر روی یک آنزیم اثر می‌کنند و فقط بر آنزیمی اثر دارند که با سوبسترای آن آنزیم مشابهت ساختمانی داشته باشند برای مثال اسیدمالونیک به علت شباهت ساختمانی که با اسیدسوکسینیک دارد، مهارکننده برای آنزیم اسیدسوکسینیک دئیدروژناز محسوب می‌گردد. در اثر ترکیب این مهارکننده‌ها با آنزیم که مانع ترکیب سوبسترای حقیقی با آنزیم می‌شود دو نوع مجموعه تشکیل می‌شود:



در مهار رقابتی تناسب سوبسترای اختصاصی با محل فعال آنزیم خیلی بیشتر از تناسب بازدارنده است، بنابراین با افزایش تراکم سوبسترا می‌توان بازدارنده را از محل فعال آنزیم جابه‌جا کرد. برپایه این نظریات سه نکته قابل توجه در مورد وقفه عمل رقابتی عبارتند از: (۱) عدم وجود اختصاصی مطلق آنزیم در مقابل سوبسترا (۲) تشابه ساختمان سوبسترا و بازدارنده (۳) آنزیم تناسب کمتری برای بازدارنده دارد تا برای سوبسترا (۴) مقدار Ks برای مجموعه (EI) بیشتر از مجموعه [ES] است. این مطلب اختلاف درجه تناسب را نشان می‌دهد. در حالی که سرعت ماکزیمم واکنش در هر دو حال یکی می‌باشد.

ب - مهارکننده‌های غیررقابتی: جایگاه پیوند این ترکیبات با آنزیم در محلی غیر از جایگاه فعال آنزیم می‌باشد و در طول زنجیره پروتئینی آنزیم به جهت دیگری متصل می‌شوند. به عبارت دیگر این مهارکننده‌ها محلی را که سوبسترا اشغال می‌کند، اشغال نمی‌کنند. این مهارکننده‌ها دارای ویژگی‌هایی می‌باشند:

(۱) افزایش غلظت سوبسترا سبب آزاد شدن آنزیم نمی‌گردد. (۲) هیچگونه رقابتی بین مهارکننده و سوبسترا وجود ندارد. (۳) اتصال مهارکننده با آنزیم سبب تغییر ساختمان شیمیایی آنزیم شده و از فعالیت آنزیم کاسته می‌شود.

مهم‌ترین ترکیبات این گروه آنهایی هستند که می‌توانند به‌صورت برگشت‌پذیر با عوامل (SH − سولفیدریل) از اسید امینه سیستئین ترکیب شوند و عبارتند از:

A − فلزات سنگین (Ag^+ , Hg^+ , Ca^{+2}) و مشتقات آنها که با عوامل SH ترکیب شده و ایجاد (مرکاپتیدها) را می‌نمایند.

$$E - SH + Ag^+ \longrightarrow E - S - Ag + H^+$$

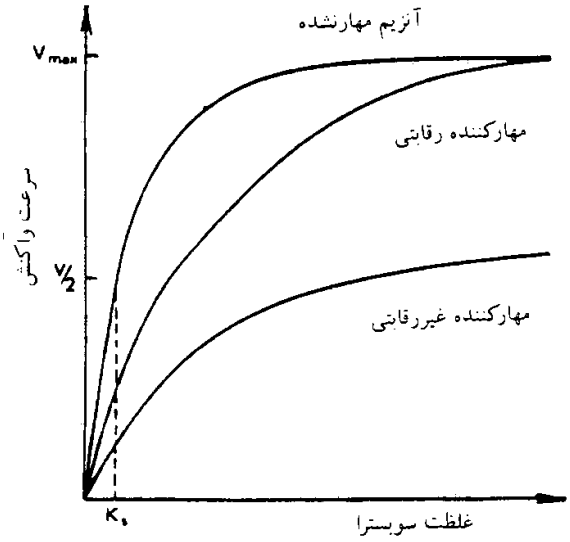
B − برخی از این مهارکننده‌ها با یون‌های فلزی که نقش کوفاکتور را برای آنزیم‌ها به عهده دارند ترکیب می‌شوند. مثل سیانورها که با یون‌های Fe^{+2} و Fe^{+3} ترکیب می‌شوند و یا مثل EDTA (اتیلین دی‌آمین‌تترااستیک) که با یون‌های فلزی دو ظرفیتی مانند Mg^{+2} و Ca^{+2} ترکیب می‌شوند.

در مهار غیررقابتی سرعت ماکزیمم واکنش خیلی کمتر از مهار رقابتی است. همچنین سرعت بستگی به ثابت اشتراک برای مجموعه (EI) دارد امّا، مستقل از تراکم سوبستراست. این نوع بازدارندگی را نمی‌توان با افزودن مقادیر سوبسترا از بین برد زیرا بازدارنده نه تنها با گروهی در محل فعال آنزیم ترکیب شده بلکه می‌تواند با بخش‌های دیگری از مولکول آنزیم نیز وارد عمل شود. به خلاف مهارکننده رقابتی، مهارکننده، شباهتی با سوبسترا ندارد (شکل ۳-۱۵).

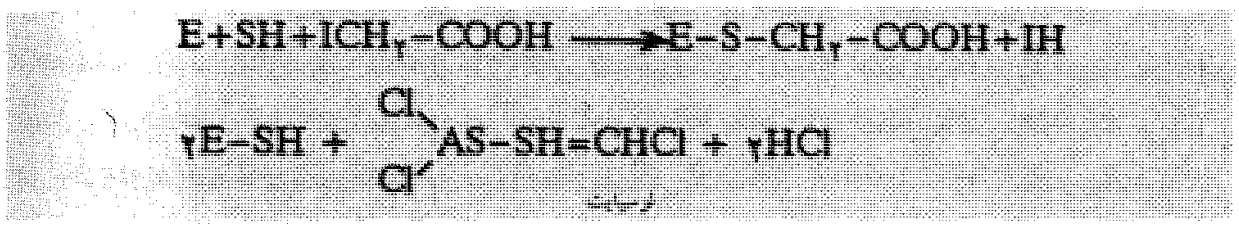
مهارکننده‌هایی که عمل برگشت‌ناپذیر دارند: این مهارکننده‌ها به علت پیوند کووالانسی که با آنزیم دارند مجموعه آنزیم و مهارکننده EI را تشکیل می‌دهند که به علت وجود این پیوندهای محکم این مجموعه غیرقابل تجزیه است. این مهارکننده‌ها می‌توانند سموم بسیار خطرناکی برای بدن به حساب آیند.

$$E + I \longrightarrow EI$$

مهم‌ترین ترکیبات این گروه آنهایی هستند که با عوامل سولفیدریل SH − آنزیم‌ها ترکیب می‌شوند مثل اسیدیدواستیک، گاز جنگی لوسیایت، داروهای ارسنیکی



شکل ۳-۱۵. نمایشی از واکنش آنزیمی در وابستگی به غلظت سوبسترا و اثر مهارکننده رقابتی و غیررقابتی (طرح از I.W.Sizer).



اغلب داروهایی که دارای خاصیت ضد آنزیمی هستند جزء ترکیبات مهارکننده رقابتی می‌باشند. آمینو (پارا) بنزوئیک اسید نیز از این جمله می‌باشد. این اسید از عوامل رشد باکتری‌هاست. بیشتر باکتری‌ها دارای سیستم آنزیمی لازم برای بیوسنتز اسید فولیک می‌باشند و اسید پاراآمینوبنزوئیک از ترکیبات ضروری برای این عمل بیوسنتز است. سولفامیدها به علت شباهت ساختمانی که با اسید پاراآمینوبنزوئیک دارند باعث بی‌اثر شدن سیستم آنزیمی مذکور و در نتیجه جلوگیری از بیوسنتز اسیدفولیک می‌شوند. فقدان اسیدفولیک موجب توقف رشد و تقسیم پاره‌ای از باکتری‌ها می‌شود پس سولفامیدها دارای خاصیت ضدمیکروبی‌هستند.

فعال‌کننده‌های آنزیمی: آنزیم‌های سلولی همواره فعال نیستند زیرا به علت ترکیب با مواد دیگر فعالیت آنزیمی آنها ظاهر نمی‌گردد و غیرفعال می‌مانند. این قبیل مواد را پیش آنزیم نامند. اگر پیش آنزیم تجزیه شود در واقع پوشش آنزیم برداشته می‌شود و در نتیجه آنزیم آزاد و فعال می‌گردد. پپسینوژن در این مورد مثال خوبی می‌باشد. این آنزیم به‌صورت پپسینوژن غیرفعال است ولی در محیط اسیدی و در PH پایین‌تر از ۶ به‌صورت پپسین فعال درمی‌آید. این قبیل آنزیم‌ها را به نام پرودیاستاز یا پروآنزیم و یازیموژن نیز می‌گویند.

فعال‌کننده‌ها در صورتی که آنزیم باشند به نام کیناز نامیده می‌شوند. برخی از فعال‌کننده‌ها عبارتند از:

۱- یون‌های Ca^{+2} و ترومبوکیناز که برای تبدیل ترومبوژن به ترومبین ضروری می‌باشند.

۲- انتروکیناز آنزیمی است که از شیره مخاط روده بر روی پروکیناز لوزالمعده ترشح می‌شود و برای تبدیل تریپسینوژن غیرفعال شیرهٔ لوزالمعده به تریپسین فعال ضروری می‌باشد.

۳- یون‌های Cl^- که برای عمل آمیلازهای بزاق و پانکراس ضروری می‌باشند. حداکثر اثر آمیلازهای لوزالمعده وقتی ظاهر می‌گردد که غلظت Na کلرورسدیم مساوی M ۰/۰۰۵ در لیتر باشد.

۴- یون‌های Mg^{++} که دارای اثر مساعد بر روی فسفاتازها می‌باشند.
۵- یدورها، کلرورها، سولفورسیانورها که دارای اثر مساعد روی بتاگلوکز یداز و فسفاتازها هستند.
۶- آرسنوبنزول، اسیدسیانیدریک که بر روی پاپائیناز و اوره‌آز اثر می‌کنند.

فعال‌کننده‌ها را می‌توان مانند هاپتوآنزیم‌ها دانست. هاپتوآنزیم‌ها پروتئین‌هایی هستند که آنزیم را در مقابل عواملی که موجب تغییر ماهیت آنها می‌شوند، حفظ می‌کنند. مانند هاپتوگلوبین، گلوبین که موجب نگهداری قدرت پراکسیدازی هموگلوبین می‌شود.

چرخه انرژی

برای موجودات زنده در کره زمین منبع اصلی انرژی خورشید است. انرژیی که به وسیلهٔ فوتون‌های نور انتقال می‌یابد به وسیلهٔ کلروفیل رنگیزه موجود در کلروپلاست‌های گیاهان سبز به دام افتاده و به‌صورت انرژی شیمیایی در مواد غذایی مختلف جمع می‌شود.

بدون خورشید حیات روی کره زمین امکان ندارد. در عین حال جالب است خاطرنشان کنیم که تمام حیات روی زمین تنها حدود ۰/۲۴٪ از کل انرژی که به سطح زمین می‌رسد را نیاز دارد.

تمام سلول‌ها یا تمام جانداران را می‌توان به حسب چگونگی تأمین انرژی لازم برای حیات خود به دو گروه تقسیم کرد. موجودات اتوتروف[1] یعنی گیاهان سبز و عدّهٔ کمی از باکتری‌ها (سیتوشیمیوتروف‌ها و باکتری‌های فتوسنتزکننده) که گروه اول را تشکیل می‌دهند. این گروه اغلب از فتوسنتز به منظور تبدیل CO_2 و H_2O به یک مولکول ماده آلی غذایی یعنی گلوکز استفاده می‌کنند که از آن مولکول‌های خیلی پیچیده‌تری را می‌سازند.

گروه دوم جانداران هتروتروف‌اند[2] یعنی سلول‌های جانوری و گیاهان بدون کلروفیل که انرژی لازم را از غذاهای مختلفی (قندها، لیپیدها، پروتئین‌ها) که به وسیلهٔ اتوتروف‌ها ساخته شده کسب می‌کنند. انرژی موجود در این مولکول‌های آلی به‌خصوص از راه سوختن این مواد با حضور اکسیژن جوّی (فرآیند اکسایش) و ضمن فرآیندی که آن را تنفس هوازی[3] نامند آزاد می‌شود. آزاد شدن CO_2 و H_2O به وسیلهٔ جاندار هتروتروف این دور انرژی را تکمیل می‌کند.

طرح مشخص شده در شکل ۳-۱۶ نشان می‌دهد که سلول‌های گیاهی نیز می‌توانند انرژی را از سوزاندن مواد غذایی که در پلاست‌های خودشان ساخته‌اند کسب نمایند. گیاهان می‌توانند از هر دو پدیده اتوتروفی و هتروتروفی استفاده کنند.

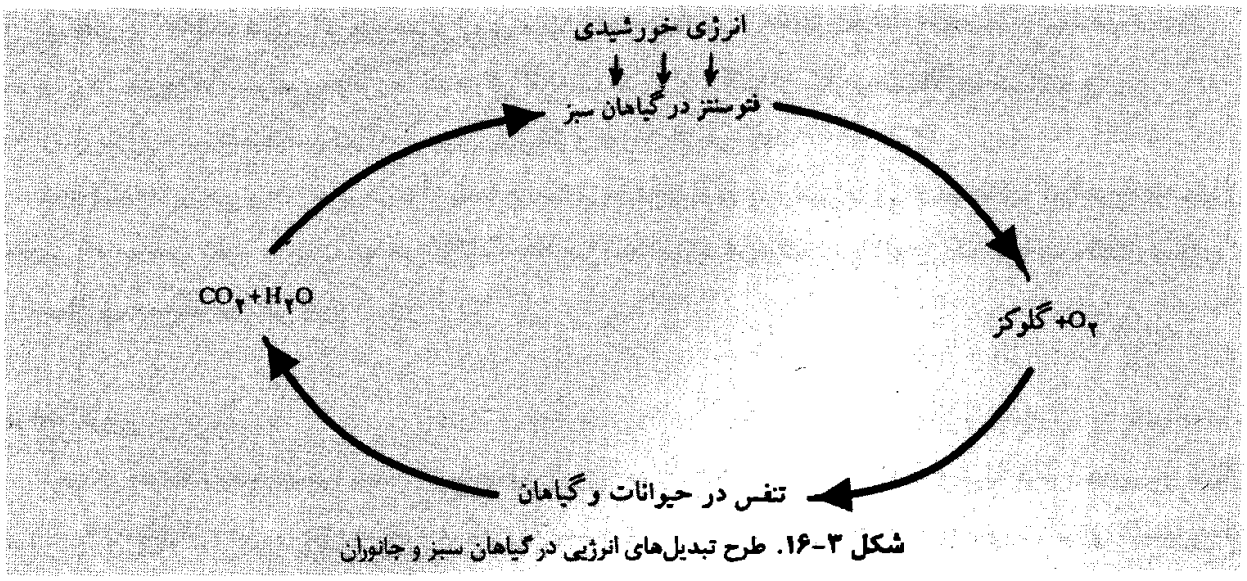
گروه کوچکی از باکتری‌ها قادرند انرژی را از مولکول‌های غیرآلی و طی فرآیندی که آن را شیمیوسنتز[4] نامند به‌دست آورند. به‌عنوان مثال باکتری‌های گروه نیتروباکتر[5] نیتریت‌ها را به نیترات اکسید می‌کنند($NO_2^- \xrightarrow{+\frac{1}{2}O_2} NO_3$).

عده دیگری از باکتری‌ها اکسیدفرو را به اکسیدفرّیک و بالاخره گروهی از آنها SH_2 را به سولفات اکسید می‌کنند.

تغییر وتبدیل انرژی

انرژی شیمیایی یا انرژی مواد غذایی در پیوندهای کووالانسی موجود بین اتم‌های یک مولکول نهفته است. به‌عنوان مثال هنگام هیدرولیز یک پیوند شیمیایی (پیوند پپتیدی یا استری)، آزاد شدن حدود ۳۰۰۰ کالری از هر مولکول‌گرم صورت می‌گیرد. در گلوکز بین اتم‌های C، H، O انرژی پتانسیلی معادل حدود ۶۸۶۰۰۰ کالری به ازای

1- Autotrophes 2- Heterotrophes 3- Respiration Aerobic
4- Chemiosynthese 5- Nitrobacter



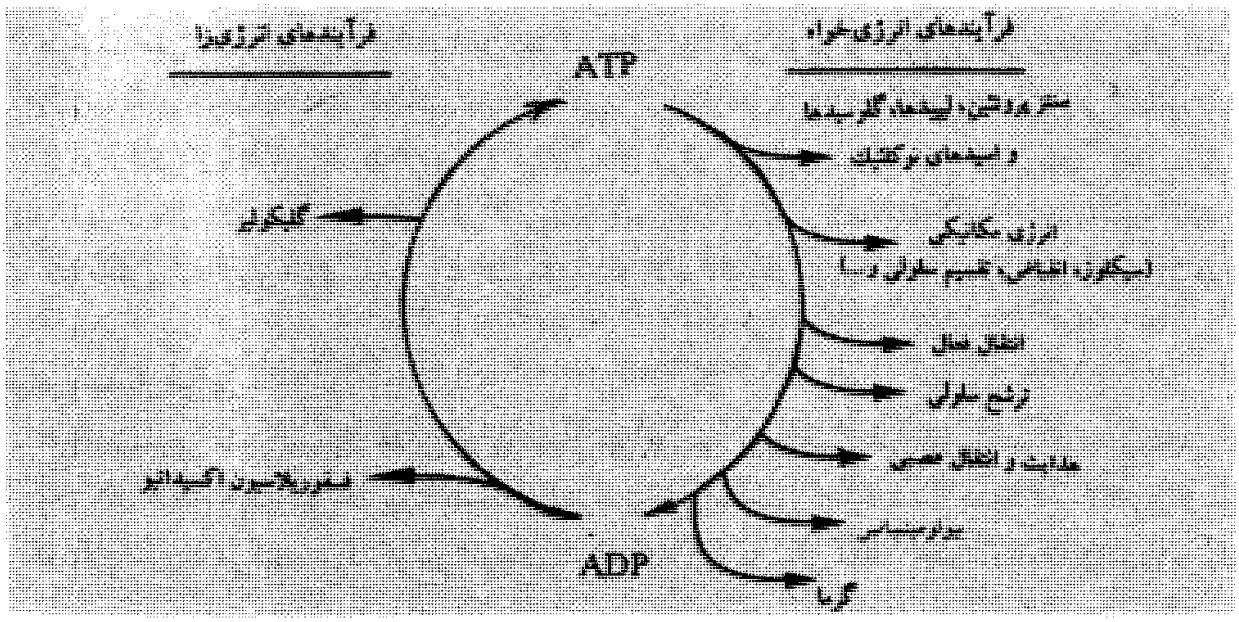
شکل ۳-۱۶. طرح تبدیل‌های انرژیی در گیاهان سبز و جانوران

هر مولکول‌گرم (۱۸۰ گرم گلوکز) وجود دارد که می‌تواند ضمن سوختن بر بنای واکنش زیر آزاد گردد:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6H_2O + 6CO_2 + 686000 \text{ کالری}$$

در سلول زنده این مقدار زیاد انرژی به یکباره همانند سوختن با آتش آزاد نمی‌شود بلکه آزاد شدن انرژی طی مراحلی و به صورتی کنترل شده انجام می‌شود. این عمل به ۱۲ آنزیم اکسیدکننده که ماده قابل سوختن را به CO_2 و H_2O تبدیل می‌کنند نیاز دارد.

در موتور یک ماشین، دما تغییرات زیادی دارد، در سلول چنین تغییرات عمده‌ای نبایستی صورت گیرند. از این رو تنها بخشی ازانرژی آزاد شده از مواد غذایی به‌صورت حرارت تلف می‌شود، بقیه انرژی به منظور ایجاد شکل جدیدی از انرژی شیمیایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. انرژی که ضمن واکنش‌های انرژی‌زا در جریان اکسایش مواد غذایی آزاد می‌شود در اعمال مختلف سلولی مورد استفاده واقع می‌شود. همان‌طور که در شکل ۳-۱۷ دیده می‌شود انرژی می‌تواند به‌صورت‌های زیر مورد استفاده قرار گیرد: (a) برای ساخته شدن مولکول‌های جدید (یعنی



شکل ۳-۱۷. چرخه انرژی بالدوین Baldwin که فرآیندهای انرژی‌زا و انرژی‌خواه را با دخالت ATP نشان می‌دهد.

پروتئین‌ها، گلوسیدها، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدها) با انجام واکنش‌های انرژی خواه. این مولکول‌ها می‌توانند جایگزین مولکول‌های دیگری شده یا صرف رشد طبیعی سلول شوند؛ (b) برای انجام یک کار مکانیکی مثل تقسیم سلولی، سیکلوز (جریان سیتوپلاسمی)، یا انقباض عضلانی؛ (C) برای جذب از راه انتقال فعال در مقابل معیارهای اسمزی و یونی؛ (d) برای حصول پتانسیل غشایی نظیر آنچه در انتقال و هدایت عصبی یا برای ایجاد تخلیه‌های الکتریکی (همانند آنچه که در ماهی‌های الکتریکی صورت می‌گیرد)؛ (e) در ترشح سلولی؛ (f) برای ایجاد انرژی پرتوی نظیر بیولومینسانس. تنها در واکنش‌های نوع (a) انرژی حاصل از مواد غذایی به انرژی شیمیایی تبدیل می‌شود. در تمام واکنش‌های دیگر انرژی شیمیایی به اشکال دیگر انرژی تبدیل می‌شود.

پیوندهای پرانرژی

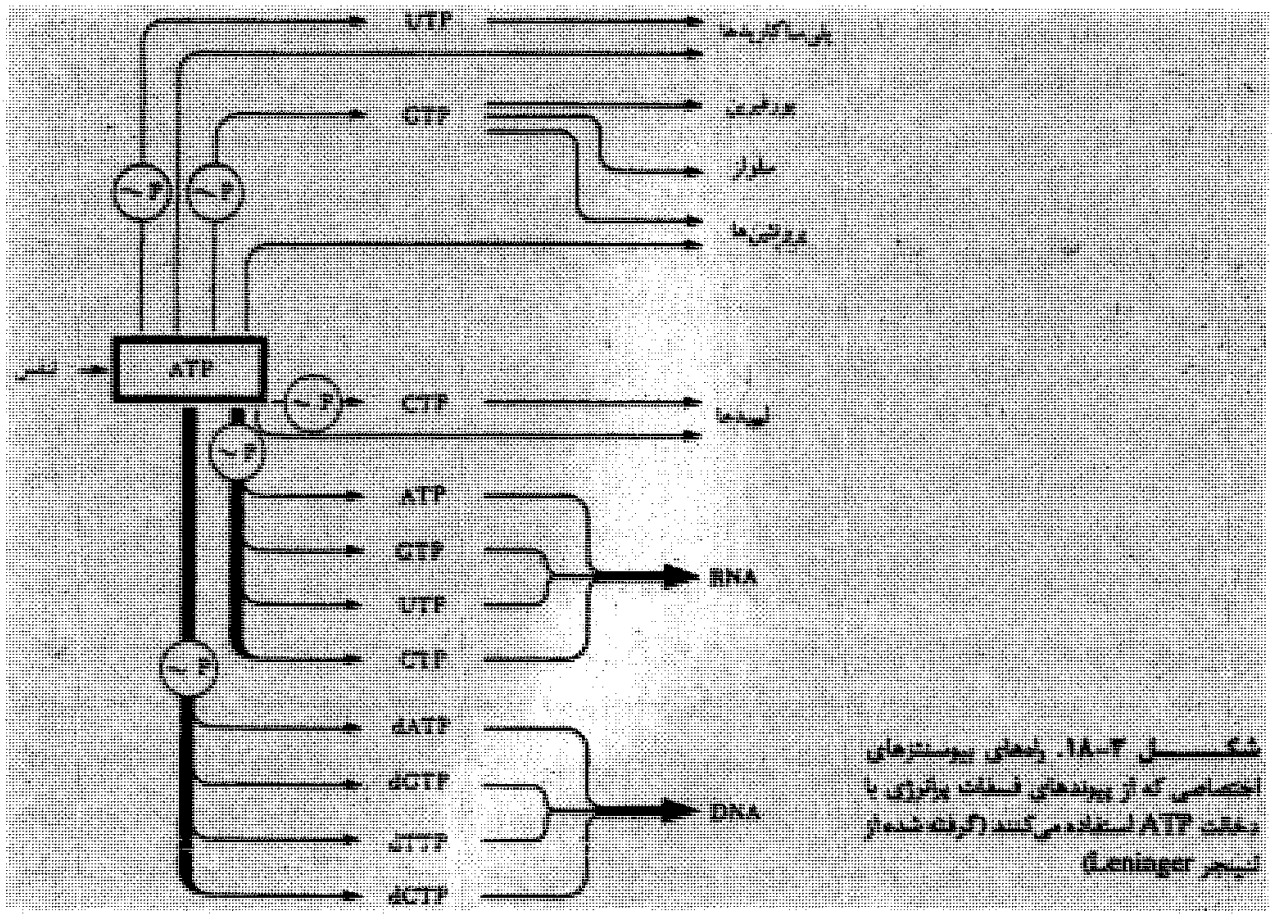
شکل ۳-۱۷ نشان می‌دهد که مولکول آدنوزین‌تری‌فسفات (ATP)، محل اشتراک تمام تغییر و تبدیلات انرژی در سلول می‌باشد. این ترکیب در تمام سلول‌ها وجود دارد. اختصاص اصلی این مولکول در این است که دو پیوند انتهایی آن انرژی پتانسیلی خیلی بیشتر از تمام پیوندهای شیمیایی دیگر آن دارند. مولکول ATP دارای یک بازپوریک یعنی آدنین، ریبوز و سه مولکول اسیدفسفریک است. آدنین با ریبوز تشکیل یک نوکلئوزید می‌دهد که آن را آدنوزین نامند، آدنوزین با اولین فسفات، آدنوزین‌مونوفسفات یا اسیدآدنیلیک را می‌دهد. در تغییر و تبدیل‌های انرژیی، ترکیباتی که اهمیت بیشتری دارند یعنی آدنوزین‌دی‌فسفات (ADP) و آدنوزین‌تری‌فسفات (ATP) .واردند. اگر آدنوزین را با A و فسفات را با P مشخص کنیم، فرمول ساده ATP و تغییر و تبدیلش به ADP به‌صورت زیر نوشته می‌شود:

$$A - P \sim P \sim P \longrightarrow A - P \sim P + Pi + ۷۰۰۰ \text{ کالری}$$

این واکنش نشان می‌دهد که آزاد شدن فسفات انتهایی ATP به جای ۳۰۰۰ کالری انرژیی که در پیوندهای شیمیایی معمولی وجود دارد، ۷۰۰۰ کاری انرژی آزاد می‌کند. در شکل ۳-۱۵ واکنش $ATP \longrightarrow ADP$ در بین فرآیندهای انرژی‌زا که انرژی را آزاد می‌کنند و فرآیندهایی که انرژی را انبار کرده یا آن را به اعمال مختلف سلولی تبدیل می‌کنند نقش مرکزی را بازی می‌کند.

پیوند پرانرژی P~ به سلول امکان می‌دهد که مقدار بسیار زیادی انرژی را در فضایی بسیار کوچک جمع کرده و آن را تا زمانی که به آن نیاز باشد حفظ نماید. حضور ATP بیانگر این است که چرا برخی فعالیت‌های سلولی پراهمیت مثل هدایت عصبی، می‌توانند حتی با توقف کامل تنفس تا مدتی ادامه یابند. به تازگی مشخص شده که نوکلئوزیدهای دیگری که دارای پیوندهای پرانرژی هستند مثل سیتوزین‌تری‌فسفات (CTP)، اوریدین‌تری‌فسفات (UTP) و گوانوزین‌تری‌فسفات (GTP)، در واکنش‌های بیوسنتزی به کار گرفته می‌شوند. در عین حال منبع انرژی این نوکلئوزیدهای‌تری‌فسفاته در نهایت از ATP است، گروهی از آنزیم‌ها که آنها را نوکلئوزیدتری‌فسفوکیناز نامند موجب سهولت این پدیده می‌شوند. انرژی حاصل از انتقال فسفات انتهایی در سنتزهای مختلف به وسیلهٔ تری‌فسفات‌اوریدین، گوانوزین و سیتوزین به جریان می‌افتد.

شکل ۳-۱۸ نوکلئوزیدهای‌تری‌فسفات تیپ‌ریبوز و تیپ‌دزوکسی‌ریبوز (همانند (dATP) که به‌عنوان منبع پرانرژی در سنتز ترکیبات در فسفوکراتین، استیل فسفات و اسیدفسفوانول پیروویک نیز وجود دارند را نشان می‌دهد.



شکل ۳-۱۸. زنجیره‌ی بیوسنتزهای اختصاصی که از پیوندهای فسفات پرانرژی با رعایت ATP استفاده می‌کنند (گرفته شده از لنینجر Lenigger)

ATP که یک پلی‌الکترولیت دارای ۴ بار منفی است، معمولاً به کاتیون‌های دو ظرفیتی مثل Ca^{++}، Mg^{++}، Mn^{++} وابسته شده است. پیوند فسفات انتهایی به وسیلهٔ آدنوزین‌تری‌فسفاتاز (ATPase) آزاد می‌شود. به‌عنوان مثال میوزین ماهیچه‌ای دارای عمل آدنوزین‌تری‌فسفاتازی است و می‌تواند Pi را از ATP آزاد سازد. تغییر و تبدیل مکانیکی شیمیایی عضله به‌صورت فرمول زیر نشان داده می‌شود:

ATP + تار عضلانی ⟶ ADP ~ تار عضلانی + Pi
(در حال انبساط) (منقبض شده)

ADP ~ تار عضلانی + H_2O ⟶ تار عضلانی + ADP
(منقبض شده) (در حال انبساط)

$ATP + H_2O \longrightarrow ADP + Pi$

این مثال جالبی است که روشن می‌کند چگونه ساختمان و عمل می‌توانند در حد مولکولی مشترک شوند.

بیوانرژتیک

در صفحات گذشته از دورها (چرخه‌ها) و تبدیل‌های انرژی در سلول بحث کردیم و دیدیم که انرژی موجود در سلول ابتدا به‌صورت انرژی شیمیایی نهفته در پیوندهای پرانرژی است. سلول تنها بخشی از کل انرژی (H) موجود در یک ترکیب شیمیایی را مورد استفاده قرار می‌دهد که آن را آنتالپی[1] نیز می‌نامند. این بخش از کل انرژی یا انرژی آزاد (F)

1- enthalpie

به‌صورت گرما تلف می‌شود و به‌طور خلاصه در تبدیل‌های انرژی وارد می‌گردد:

این معادله $\Delta H = \Delta F + T\Delta S$ نشان می‌دهد که تغییرات انرژی کل (ΔH) برابر است با تغییرات انرژی آزاد یا موجود (ΔF) به اضافه انرژی تلف شده ($T\Delta s$) که به‌صورت گرما تلف می‌شود. (در این معادله T حرارت به حسب درجه کلوین[1] و S آنتروپی دستگاه یا مجموعه است).

نظر آنتروپی

جالب است نظر روشنی در مورد نقش آنتروپی در مجموعه‌های زیستی داشته باشیم. همان‌طور که قبلاً یادآور شدیم، آنتروپی بخشی از کل انرژی که تلف شده (یا در مجموعه موجود نیست) را مشخص می‌سازد.

درمعادله $\Delta H = \Delta F + T\Delta S$، ΔS یکی از مقادیر بازگشت‌پذیر یک واکنش است. وقتی آنتروپی زیاد می‌شود، انرژیِ بیشتری ($T\Delta S$) تلف می‌شود و فرآیند کمتر قابل برگشت است. بنا به قانون دوم ترمودینامیک آنتروپی یک دستگاهِ منفک از واکنش‌ها (دستگاه بسته) تمایل به افزایش تا رسیدن به حداکثر را دارد. در چنین نقطه‌ای توازن برقرار شده و واکنش متوقف می‌شود. نظر آنتروپی با نظریات «نظم» و «اتفاق» در ارتباط است. وقتی در یک مولکول، اتم‌ها به حالتی منظم قرار گرفته‌اند، آنتروپی کاهش می‌یابد. از نظر ترمودینامیک، کاملاً مشخص است که موج انرژی از سطح پر انرژی به سوی سطح کم‌انرژی است و این پدیده‌ای است که با افزایش آنتروپی همراه است. به‌عنوان مثال، در یک دستگاه سرد (انرژی ضعیف است) مولکول‌ها به کندی حرکت می‌کنند و از نظر آماری در یک جهت نظم و سازمان بهتری دارند. وقتی گرما از دستگاه گرمتری برسد و دستگاه سرد (یا دارای انرژی کم) را گرم کند مولکول‌ها با سرعت بیشتری شروع به جابه‌جایی می‌کنند و بی‌نظمی دستگاه افزایش می‌یابد. برای این که مسئله آنتروپی کاملاً روشن شود مثال ساختن و تخریب یک خانه را در نظر بگیریم. برای ساختن یک خانه مقدار زیادی انرژی (نیروی کارگران، انرژی گرمایی، الکتریکی و مانند آن) در تمام مدت ساختن خانه لازم است. برای تخریب این خانه مقدار خیلی کمتری انرژی لازم است. اختلاف بین مقدار زیاد انرژی لازم برای ساختن و مقدار خیلی کمتر انرژی که برای تخریب لازم است نشان می‌دهد که مقدار قابل توجهی انرژی تلف شده است. این انرژی تلف شده آنتروپی است.

درمولکول‌های پروتئینی طرز ردیف شدن اسیدهای امینه به‌صورت کاملاً دقیقی مشخص شده است. بنابراین مولکول نظم زیادی دارد و آنتروپی آن کم است. سنتز چنین مولکول‌هایی، از اسیدهای امینه مستقل مقادیر قابل توجهی انرژی یا «کار» (واکنش انرژی‌خواه) لازم دارد. پس این واکنش سنتز خیلی بازگشت‌پذیر است. از طرف دیگر تجزیه پروتئین‌های اختصاصی به اسیدهای امینه به CO_2 و H_2O فرآیندی بسیار بازگشت‌ناپذیر است که مقدار زیادی انرژی ایجاد می‌کند (واکنش انرژی‌زا).

وقتی انرژی را در جهتی عکس (از سطح کم‌انرژی به سطحی پرانرژی) به جریان اندازیم، آنتروپی کاهش می‌یابد. از نظر ترمودینامیک چنین فرآیندهایی دست‌کم تا وقتی با مجموعهٔ دیگری همراه نشوند که در آن افزایش آنتروپی وجود دارد و در نتیجه می‌تواند خرجِ کاهش سیستم اول را جبران کند، امکان‌پذیر نیستند. در سلول گیاهی سنتز گلوکز از CO_2 و آب با انبار شدن همزمان انرژی خورشید در مولکول و کاهش قابل ملاحظه آنتروپی همراه است. این مجموعه با اکسایش گلوکز در سلول جانوری، یعنی فرآیندی که در جریان آن آنتروپی به مقدار قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد بشدت بستگی دارد. به این ترتیب عمل متقابل دو مجموعه، قانون دوم ترمودینامیک که

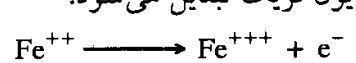
1- Kelvin

براساس آن آنتروپی بایستی همیشه افزایش یابد را تأیید می‌کند.

این نظریات در سیستم‌های زنده اهمیت زیادی دارند چه سلول‌ها با درجه بالایی از نظم در ساختمان مولکولی و پایین‌تر از حد سلولی خود[1] مشخص می‌شوند. وقتی سلول می‌میرد، در هم ریختن این نظم شروع می‌شود و آنتروپی افزایش می‌یابد.

اکسایش و کاهش

مطالعه اکسایش زیستی از ۱۷۸۰ که لاووازیه نشان داده جانوران از اکسیژن هوا استفاده کرده و گازکربنیک ایجاد می‌کنند آغاز شده است. اکسایش به‌صورت فرآیندی در نظر گرفته می‌شد که ضمن آن اکسیژن با ماده‌ای ترکیب می‌شود، کاهش پدیده عکس آن یعنی از دست دادن اکسیژن بوده است. بعدها کلمه اکسایش به فرآیندی که ضمن آن هیدروژن از یک سوبسترا گرفته می‌شود و کلمه کاهش به فرآیندی که ضمن آن هیدروژن دریافت می‌گردد نیز اطلاق شد. در نهایت این کلمات را به واکنش‌هایی که در آن‌ها انتقال الکترون‌ها وجود دارد نیز تعمیم دادند، با این دید یک یون فرّو با از دست دادن یک الکترون به یون فرّیک تبدیل می‌شود:



$$Fe^{++} \longrightarrow Fe^{+++} + e^{-}$$

در حال حاضر از دست دادن الکترون‌ها به‌عنوان پدیده بسیار پراهمیت در اکسایش در نظر گرفته می‌شود. این از دست‌دادن الکترون می‌تواند با کسب اکسیژن یا از دست دادن هیدروژن همراه باشد یا نباشد.

واکنش‌های اکسایش به وسیلهٔ آنزیم‌هایی به نام اکسیدازها[2] هدایت می‌شوند. واکنش‌هایی که در آن الکترون‌ها انتقال داده می‌شوند (به فراوانی در اکسایش‌های زیستی) به وسیلهٔ دئیدروژناز[3] یعنی آنزیم‌هایی که هیدروژن را از سوبسترایی برمی‌دارند هدایت می‌شود.

اکسیدازها و دئیدروژنازها می‌توانند در میتوکندری‌ها جایگزین شده و با کارهای خاص خود مراحل مختلف زنجیر تنفسی را به انجام رسانند.

دئیدروژنازها

این آنزیم‌ها هیدروژن سوبستراها را با واسطه کوآنزیم‌هایی که همگی گیرنده هیدروژن هستند مثل: NAD، NADP، فلاوین یا نوکلئوتید فلاوینیک‌ها جدا می‌کنند. فعالیت دئیدروژناز را به کمک اسپکتروفتومتر و با نظر به این که نوکلئوتیدهای احیا شده یک اوج جذب حدود ۳۴۰A° دارند می‌توان بررسی کرد. بدین ترتیب احیای دئیدروژنازی NAD و NADP با اندازه‌گیری افزایش جذب و اکسایش با اندازه‌گیری کاهش آن (جذب) دنبال می‌شود.

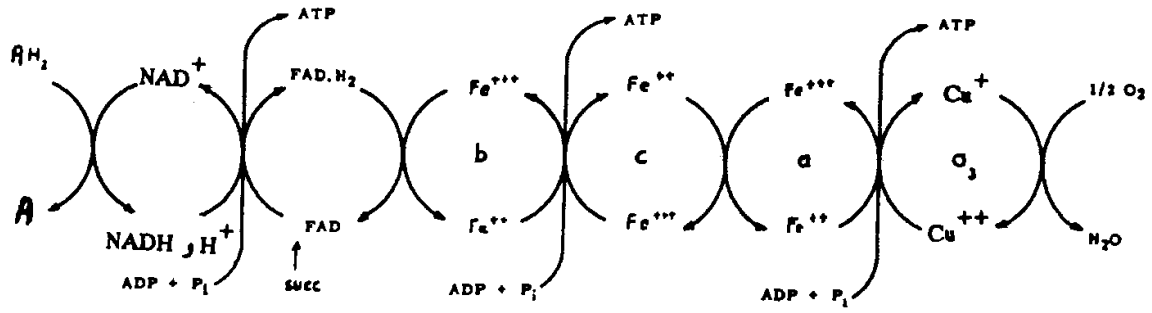
دئیدروژنازهایی که حضور NAD و NADP را لازم دارند معمولاً فلاوپروتئین‌ها (آنزیم‌های زرد رنگ)اند که دارای ریبوفلاوین به‌صورت گروه پروستتیک‌اند. فلاوپروتئین‌ها به‌صورت ناقل هیدروژن برای یک گیرنده آن عمل می‌کنند. دئیدروژنازها برای فعالیت خود نیازی به اکسیژن ندارند و هیدروژن را به‌طور مستقیم از یک سوبسترا به اکسیژن انتقال نمی‌دهند. این قسمت از زنجیر اکسایش حضور سیستم‌های آنزیمی دیگری را لازم دارد که می‌توانند با اکسیژن مولکولی اشتراک پیدا کنند.

1- Subcellular 2- Oxydases 3- Deshyrogenases

سیتوکروم‌ها[1]

انتقال هیدروژن از یک سوبسترا به اکسیژن مولکولی به وسیلهٔ سیتوکروم‌ها که هِموپروتئین‌های دارای آهن‌اند صورت می‌گیرد. این آنزیم‌ها در طبیعت گسترش زیادی دارند. کیلن[2] نشان داده است که در سلول زنده می‌توان سیتوکروم‌های a، b، c، را به وسیلهٔ باندهای جذب متفاوتی که دارند مشخص کرد. این باندهای جذب سوبسترا را به حالت اکسید شده یا احیاء شده نشان می‌دهند. سیتوکروم a۳ با سیتوکروم اکسیداز که از مدت‌ها قبل به دلیل تشکیل آبی‌ایندوفنل در حضور معرف نادی[3] (α - نفتل و پارافنیلن‌دی‌آمین) شناخته شده یکسان است.

شکل ۳-۱۹ امکان می‌دهد مشخص کنیم که زنجیر تنفسی برپایه انتقال الکترون‌ها در سیتوکروم‌های دنبال هم با تبدیل فروسیتوکروم (Fe^{++}) احیاء شده به فرّی سیتوکروم (Fe^{+++}) اکسید شده استوار است.



شکل ۳-۱۹. طرح زنجیر تنفسی سوبسترای AAH_2 سوبسترای اکسید شده، FAD، فلاو - آنزیم، b، c، a، سری سیتوکروم‌ها با a۳ سیتوکروم اکسیداز.

اکثر سوبستراها به وسیلهٔ دئیدروژنازهای وابسته به NAD^+ یا $NADP^+$ دئیدروژنه می‌شوند.

یادآوری می‌شود که سوکسینات با واسطه دئیدروژناز به‌طور مستقیم به سیتوکروم می‌رسد. شکل در طول زنجیر سه ناحیه را نشان می‌دهد که در آنها احتمالاً فسفوریلاسیون صورت گرفته، ATP تشکیل می‌شود. زنجیر تنفسی کامل از سمت چپ با چرخه کربس مشترک می‌شود و با واسطه دئیدروژنازهای اختصاصی، +H و الکترون‌هایی که در این چرخه ایجاد شده‌اند را دریافت می‌کند (شرح مفصل این مطالب در بحث مربوط به میتوکندری‌ها آورده شده است).

تنفس سلولی[4]

اکنون بهتر می‌توان واکنش‌های انرژی‌زا را مجسم کرد که به سلول زنده امکان می‌دهند مواد آلی را اکسید کرده و انرژی شیمیایی آنها را آزاد کنند. تمام این واکنش‌ها با عنوان تنفس سلولی نامگذاری می‌شوند. برای تجزیه یک مولکول آلی سلول‌ها مخصوصاً متحمل دئیدروژناسیون‌هایی می‌شوند که می‌توانند باحضور اکسیژن هوا یا در غیاب آن انجام شوند بدین ترتیب دو نوع تنفس وجود دارد: هوازی[5]، بی‌هوازی[6]. جدول ۳-۱ تعدادی از اختلافات این دو نوع تنفس را مشخص می‌سازد:

تنفس بی‌هوازی

این نام به واکنش‌های انرژی‌زایی داده می‌شود که موجب تجزیه مولکول‌های پیچیده بدون استفاده از اکسیژن

1- Cytochromes 2- Keilin 3- Nadi 4- Respiration cellular
5- aerobic 6- anaerobic

جدول ۳-۱. مقایسه تنفس هوازی و بی‌هوازی

تنفس هوازی (فسفوریلاسیون اکسیداتیو)	تنفس بی‌هوازی
با حضور اکسیژن مولکولی انجام می‌شود	از O_2 استفاده نمی‌کند
گلوکز را به CO_2 و H_2O تجزیه می‌کند	گلوکز را به الکل و ترکیبات مختلف دیگر تبدیل می‌کند
انرژی زا	انرژی زا
حدود ۵۰٪ انرژی شیمیایی بدست می‌آید	انرژی شیمیایی کمتری بدست می‌آید
در اکثر جانداران وجود دارد	در عضلاتی از میکروارگانیسم‌ها وجود دارد و در سلول‌های جنینی و سرطانی قابل توجه است
آنزیم‌ها در میتوکندری‌ها وجود دارند	آنزیم‌ها در ماتریس سیتوپلاسمی جای دارند

مولکولی می‌شوند. مثال معروف آنها تجزیه گلوکز است که آن را گلیکولیز بی‌هوازی[1] نیز می‌نامند. کلمه تخمیر اغلب وقتی به کار می‌رود که از میکروارگانیسم‌ها و از گیاهان بحث می‌شود.

گلیکولیز تجزیه زنجیر کربنی گلوکز به مولکول‌های کوچک‌تر را ممکن می‌سازد. مثلاً در ماهیچه‌ها، هر مولکول گلوکز به دو مولکول اسید لاکتیک تبدیل می‌شود.

در مخمرها براساس واکنش زیر که آن را تخمیر الکلی نامند گلوکز به اتانول و انیدریدکربنیک تبدیل می‌شود:

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow C_2H_5OH + 2CO_2 + \text{انرژی}$$

در میکروارگانیسم‌های مختلف دیگر محصول تخمیر می‌تواند بوتانل، استون، اسیداستیک و مواد دیگر باشد. در ۱۸۶۱، پاستور نشان داد که مخمر می‌تواند در غیاب کامل اکسیژن موجب ایجاد الکل شود. او چنین نتیجه گرفت که سلول‌های زنده می‌توانند انرژی را خواه با حضور اکسیژن (روش هوازی) یا با پدیده‌های تخمیر (روش بی‌هوازی) به‌دست آورند.

در عضلات واکنش معمولی گلیکولیز عبارتست از:

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_3H_6O_3 + 58000 \text{ کالری}$$

(اسیدلاکتیک)

این واکنش نشان می‌دهد که هگزوز به دو تریوز تجزیه شده است. این پدیده با آزاد شدن کمتر از ۱۰٪ انرژی موجود در گلوکز (که معادل ۶۸۶۰۰۰ کالری است) همراه است. محصول کلیدی در گلیکولیز اسیدپیرورویک است که در شرایط بی‌هوازی به اسیدلاکتیک تبدیل می‌شود اما با حضور اکسیژن اسیدپیرورویک در چرخه کربس وارد می‌شود.

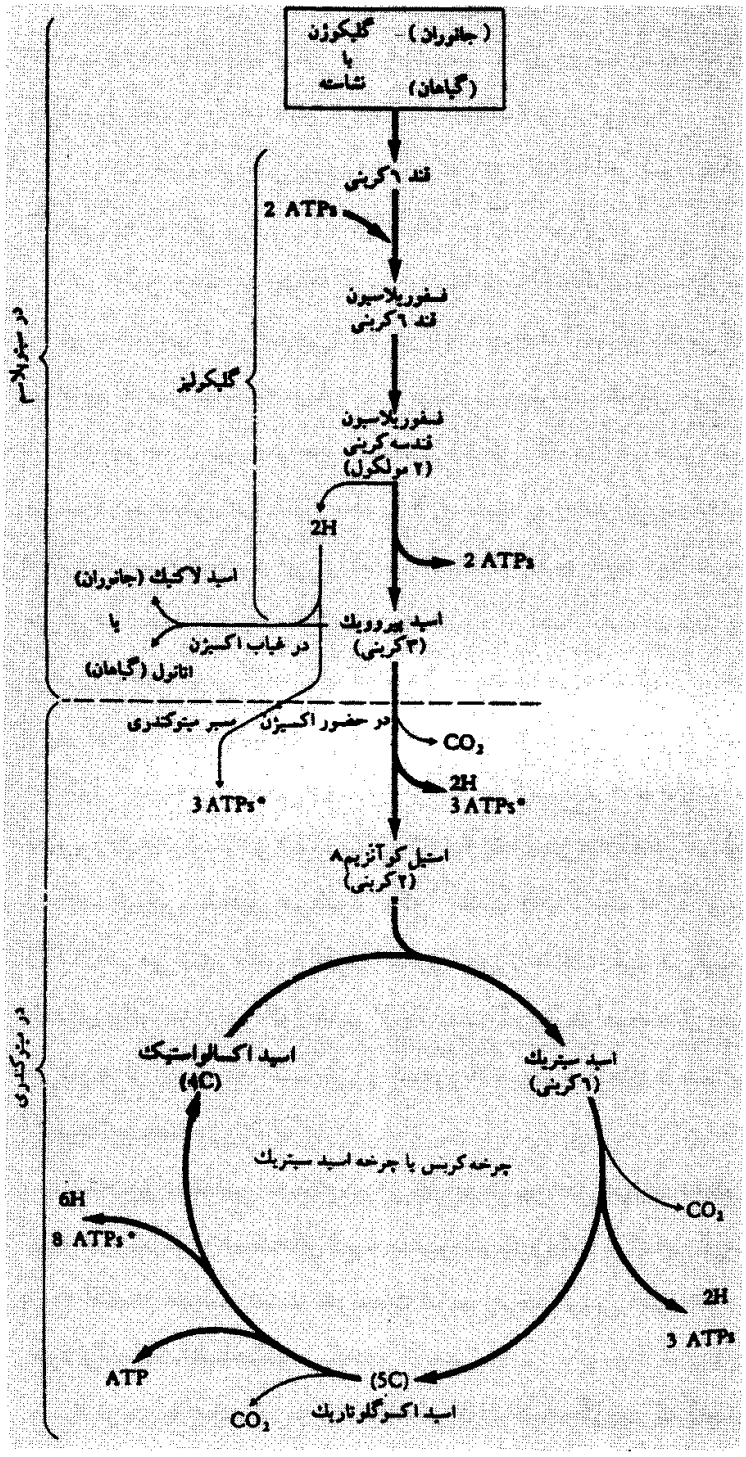
در گلیکولیز (مسیر ایمبدن - میرهرف)[2] مولکول گلوکز به استرهای فسفریک فسفریله می‌شود که به دو مولکول تریوز تجزیه می‌شوند. مولکول‌های تریوز در نهایت پیرووات را به وجود می‌آورند. این عمل یک مجموعه (سیستم) چند آنزیمی[3] واقعی است. محصولات یک چرخه آنزیمی سوبسترای مرحله بعد زنجیر هستند.

طرح خلاصه شده در شکل ۳-۱۸ نشان می‌دهد که مولکول ۶ کربنی گلوکز ابتدا فسفریله می‌شود. ATP فسفات لازم را تأمین می‌کند. در تجزیه مولکول گلوکز، چهار مولکول ATP تشکیل شده است. از آن جا که دو مولکول ATP

1- glycocayliz anaerobic 2- Embden - Meyerhof 3- multienzymatique

مورد استفاده قرار گرفته است، تراز خالص نتیجه نهایی دو مولکول ATP خواهد بود. در شکل ۳-۱۸ ترتیب مراحل شیمیایی و آنزیم‌های وارد در عمل گلیکولیز نشان داده شده است. تشکیل پیرووات از گلوکز یا از گلیکوژن به حضور اکسیژن بستگی ندارد. در تنفس بی‌هوازی، از نوع تخمیر پیرووات تبدیل به لاکتات می‌شود در حالی که در تنفس هوازی، پیرووات در فرایند دکربوکسیلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری، و با دخالت کوآنزیم A، استیل کوآنزیم A را تشکیل می‌دهد. استیل کوآنزیم A وارد چرخه کربس می‌شود و به CO_2، H_2O اکسید می‌گردد (شکل ۳-۲۰).

اگر گلیکوژن، قندِ اولیه گلیکولیز باشد، چرخه با دپلیمریزاسیون مولکول و با تداخل مستقیم فسفات در مونومرها آغاز شده، و بدین ترتیب گلوکز - ۱ - فسفات ساخته می‌شود که به گلوکز - ۶ - فسفات تبدیل می‌گردد. از این مرحله به بعد روش کار با آنچه بر گلوکز می‌گذرد یکی است. تمام آنزیم‌های مسیر گلیکولیز در بخش محلول سیتوپلاسم جای دارند.



شکل ۳-۲۰. طرح عمومی گلیکولیز، تخمیر و چرخه کربس

اغلب تصور می‌شود که از نظر فیلّوژنی تنفس بی‌هوازی روش ابتدایی تأمین انرژی است، این فکر بر پایه نظریه‌های جدید در مورد ترکیب جوّ در نخستین دوره‌های حیاتی روی زمین استوار است. از نظر تأمین انرژی تنفس هوازی مسیری بسیار اقتصادی‌تر از تنفس بی‌هوازی است. این مسیر با افزایش اکسیژن جوّی گسترش یافته است. در عین حال تنفس بی‌هوازی هنوز روش اساسی انرژی‌زا برای عدهٔ زیادی از میکروارگانیسم‌ها و برای مراحل ابتدایی رشد جنینی و سلول‌های سرطان‌زا می‌باشد.

چرخه کربس و فسفوریلاسیون اکسیداتیو

تنفس هوازی، مجموعه واکنش‌هایی است که به وسیلهٔ آنها مواد آلی با حضور اکسیژن مولکولی به CO_2 و H_2O

تجزیه می‌شوند. این مرحله نهایی در میتوکندری‌ها صورت می‌گیرد و به خوبی با ساختمان مولکولی این اندامک‌ها تناسب دارد. ماده کلیدی در تجزیه گلوسیدها پیرووات است که با حضور اکسیژن در چرخه کربس (چرخه اسیدسیتریک یا چرخه اسیدتری‌کربوکسیلیک) وارد می‌شود.

در این حال سوختن پیرووات خودبه‌خود انجام نمی‌شود بلکه به وسیلهٔ یک سری از حد واسط‌ها و همزمان با تشکیل پیوندهای پرانرژی (سنتز ATP) صورت می‌گیرد.

در اولین وهله از چرخه کربس، استات با اُکسالواستات (ترکیب دارای ۴ کربن) به منظور تشکیل سیترات (ترکیب ۶کربنی) متراکم می‌شود. در پایان چرخه، اُکسالواستاتی که از مالات به‌دست آمده با استات حاصل از استیل کوآنزیم A متراکم شده دوباره یک مولکول سیترات تشکیل می‌شود و چرخه از نو آغاز می‌گردد.

در چرخه کربس، مراحل اکسایش (شکل ۳-۲۰) مراحلی هستند که ضمن آنها از فسفات غیرآلی ATP سنتز می‌شود. به منظور درک این مطلب لازم است به خاطر آوریم که یونی شدن یک اتم هیدروژن با از دست دادن یک الکترون همراه است و این واکنشی است که بنا به آنچه قبلاً شرح داده شد، در سری واکنش‌های اکسایش جای می‌گیرد (استفاده از یک الکترون یک درجه از احیا شدن است). یکی از اتم‌های هیدروژن NAD^+ را احیا می‌کند و هیدروژن دوم یونی شده یک الکترون از دست می‌دهد که از زنجیر تنفسی با واسطه یک فلاوپروتئین، کوآنزیم Q (اوبی‌کینُن[1])، سیتوکروم‌های b، c_1، c، a، a_3 گذشته و در نهایت با یک اکسیژن مولکولی ترکیب می‌شود و یک مولکول آب به وجود می‌آورد. در مرحله سوکسینات - فومارات هیدروژن NAD^+ را احیا نمی‌کند بلکه مستقیماً با فلاوپروتئین ترکیب می‌شود. شکل ۳-۲۰ نشان می‌هد که در هر چرخه زنجیر تنفسی، سه مولکول ATP، از ADP و فسفات غیرآلی تشکیل می‌شود. اوکوآ[2] نشان داده است که به ازای هر سه فسفات غیرآلی که به‌صورت فسفات آلی (ATP) در می‌آیند، یک مولکول اکسیژن مورد استفاده قرار می‌گیرد و این همان نسبت P/O است. این نسبت یکی از راه‌های بیان تعداد مولکول‌های ATP است که در هر مرحله از چرخه کربس همراه با سنتز فسفات پرانرژی تشکیل می‌شود. از آن جا که اکسایش و فسفوریلاسیون همزمان با هم صورت می‌گیرند، این پدیده را فسفوریلاسیون اکسیداتیو نامند.

تمام مواد غذایی در نهایت در چرخه کربس می‌سوزند. به‌طوری که در عمل میتوکندری‌ها خواهیم دید، اسیدهای چرب و اسیدهای امینه به‌صورت پیرووات تا استیل کوآنزیم A می‌رسند. این یکی از مثال‌های معمول در مورد اقتصاد طبیعت است: هر هفت آنزیم چرخهٔ کربس عمل خود را در مورد هر ماده غذایی که سلول زنده بتواند به خود وارد کند، هماهنگ می‌کنند.

با توجه به آنچه شرح داده شد، می‌توان نتیجه گرفت که گلیکولیز اولین سری واکنش‌ها در تنفس کلیهٔ سلول‌ها است که در سیتوپلاسم صورت می‌گیرد و نتیجه آن تبدیل گلوکز به اسید پیرویک است. برای امکان شروع گلیکولیز، فعال شدن مولکول گلوکز لازم است. این عمل با انتقال مقداری انرژی ATP حاصل از تنفس قبلی سلول، به مولکول گلوکز انجام می‌گیرد. ضمن این عمل آنزیمی، گلوکز فسفات تشکیل می‌شود و به‌صورت گلوکزِ فعال شده برای مراحل بعد (شکل ۳-۲۰) آماده می‌گردد.

گلیکولیز می‌تواند در حضور یا غیاب اکسیژن انجام گیرد ولی اکسیژن مصرف نمی‌کند. ضمن گلیکولیز، اکسیداسیون بابرداشت هیدروژن (دئیدروژناسیون) به جای افزایش اکسیژن انجام می‌شود. اتم‌های هیدروژن برداشته شده از گلیسرآلدئیدها به وسیلهٔ مولکول پذیرنده هیدروژن یعنی نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید یا NAD جذب

1- Ubiquinon 2- Ochoa

می‌شود. اکسیداسیون گلیسرآلدئیدها در پایان گلیکولیز موجب تشکیل دو مولکول اسید پیرورویک می‌شود. در نتیجه واکنش‌های گلیکولیز، مولکول‌های کم‌وبیش بی‌تفاوت گلوکز به مولکول فعال تغییر یافته و حدود ۵ درصد انرژی گلوکز به‌صورت ATP به‌دست می‌آید. از باقیمانده انرژی، در حدود ۸۰ درصد در اسیدپیرورویک باقی مانده است و ۲۰ درصد با پذیرندهٔ هیدروژنِ احیا شده $NADH_2$ انتقال می‌یابد. بخش عمده این انرژی باقیمانده سپس در تنفس هوازی آزاد می‌شود و خرج سنتز مولکول‌های جدید ATP می‌شود.

انواع تنفس سلولی

به حسب روش مصرف هیدروژنی که ضمن گلیکولیز و مراحل مختلف آن جدا شده تنفس را به انواع زیر تقسیم‌بندی می‌کنند:

۱- هرگاه هیدروژن‌ها دوباره با اسیدپیرورویک یا برخی ترکیب‌های آلی مشتق از آن ترکیب شوند فرایند راتخمیر[1] نامند. به حسب نوع مخمر و آنزیم‌هایی که فرایند را به انجام می‌رسانند و نیز نوع مواد حاصل از تخمیر، انواع مختلفی از تخمیر مثل تخمیر اتیلیک، تخمیر لاکتیک، تخمیر استیک، تخمیربوتیریک و مانند آن شناخته می‌شود.

برای مثال در تخمیر اتیلیک (نوعی تخمیر الکلی) واکنش کلی به‌صورت زیر است:

$$2CH_3COCOOH + 2NADH_2 \xrightarrow[\text{مخمر نان در شرایط بی‌هوازی}]{\text{زیماز}} 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 2H_2O + 2NAD$$

در تخمیر لاکتیک، محصول اسید لاکتیک است.

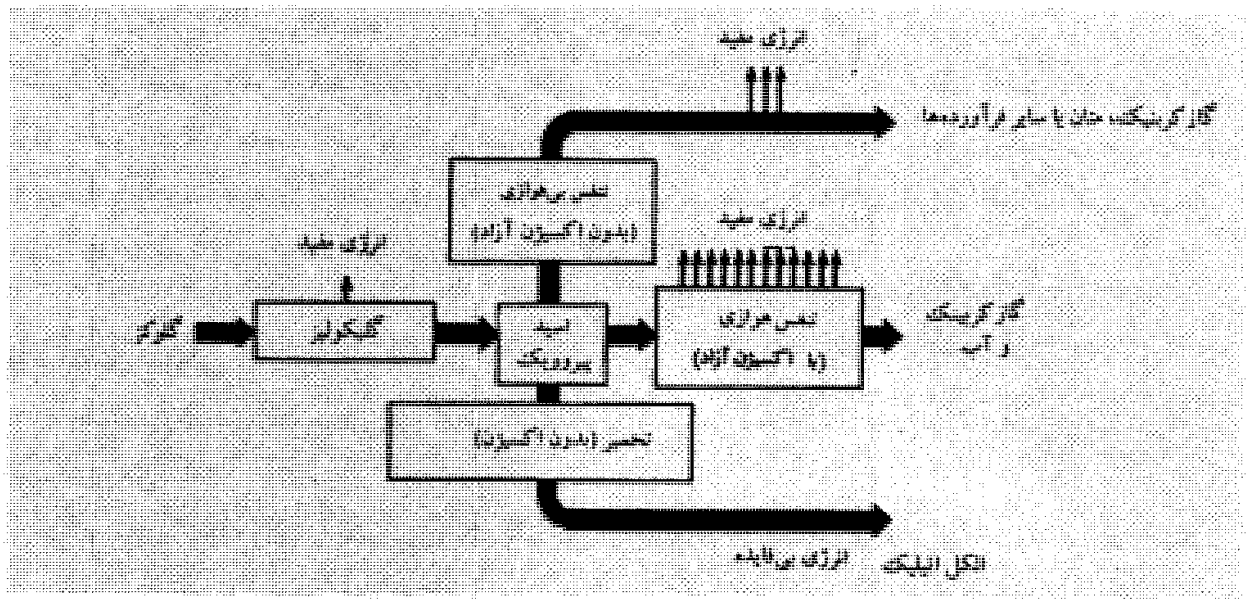
$$2CH_3COCOOH + 2NADH_2 \xrightarrow{\text{تخمیر لاکتیک}} 2CH_3CHOHCOOH + 2NAD$$

این مراحل نهایی که پس از گلیکولیز انجام می‌شوند، انرژی تولید نمی‌کنند. فرایند گلیکولیز و سپس تخمیر از نظر تولید انرژی، بازدهی زیادی ندارد و فراورده یا فراورده‌های نهایی آن برای سلول‌های تخمیرکننده سمی است و اگر این فراورده‌ها در سلول متراکم شوند، فعالیت سلول‌ها را متوقف می‌کنند و ممکن است موجب مرگ سلول شوند.

۲- اگر هیدروژن‌های جدا شده در مراحل گلیکولیز با اکسیژن برخی مواد معدنی مثل نیترات (NO_3) یا انیدریدکربنیک (CO_2) ترکیب شود فرایند را تنفس بی‌هوازی[2] نامند. این تنفس تنها در برخی باکتری‌ها انجام می‌گیرد.

۳- اگر هیدروژن‌ها سرانجام با اکسیژن مولکولی (اکسیژن آزاد هوا) ترکیب شوند، فرایند تنفس هوازی[3] نامیده می‌شود که در بیشتر سلول‌ها انجام می‌گیرد. شکل ۳-۲۱ نمای عمومی سه نوع تنفس را نشان می‌دهد.

1- Fermentation 2- Anaerobic Respiration 3- Aerobic Respiration



شکل ۳-۲۱. نمایش کلی واکنش‌ها در انواع مختلف تنفس. گلیکولیز در همه انواع تنفس مشترک است. انرژی نسبی حاصل از هر فرایند نیز مشخص شده است.

۴ ابزارها و روش‌های مطالعه سلول

برای شناخت دقیق ساختمان و طرز کار سلول‌ها لازم است، اصول و روش‌های تجربی بررسی آنها را مورد مطالعه قرار دهیم. در این فصل به‌طور خلاصه مهم‌ترین روش‌های متداول در زیست‌شناسی سلولی و مولکولی را بررسی کرده، اصول مربوط به آنها و دلایل استفاده از هر کدام را توضیح می‌دهیم.

در فصل‌های آینده به بسیاری از این روش‌ها رجوع خواهد شد و در مواردی نیز این روش‌ها با جزئیات بیشتری مورد بحث قرار خواهد گرفت.

مشاهده ساختمان‌های زیستی به دلیل کوچک بودن و شفاف بودن سلول‌ها، با نور مرئی دشوار است. ابداع و دقیق شدن ابزارهای جدید نتیجه تلاش‌های ممتدی است که در جهت مشخص کردن هرچه بهتر ساختمان‌های سلولی و حتی رسیدن به حد مولکولی صورت گرفته است. این کوشش‌ها به منظور افزایش توان تفکیک[1] ابزارها، افزایش تضاد[2] اجزاء سازنده سلول، تفکیک اندامک‌های سلولی، جدا کردن بخش‌های مختلف هر اندامک و نیز کسب اطلاعات کافی از سازمان مولکولی سلول، طرز عمل اندامک‌ها و حتی رفتار مولکول‌ها و چگونگی بیوسنتز آنها در سلول بوده است.

میکروسکوپ[3]

چون اکثر سلول‌ها کوچکند و با چشم غیرمسلح قابل رؤیت نیستند، برای مطالعه آنها از ابزار خاصی به نام میکروسکوپ استفاه می‌شود. میکروسکوپ از نظر لغوی از دو بخش میکرو[4] به معنی کوچک و سکوپ به معنی رؤیت (مشاهده) تشکیل شده است. بنابراین میکروسکوپ در واقع ابزار مشاهده ساختمان‌های کوچک می‌باشد (ریزبین).

اساس ساختمانی میکروسکوپ

بررسی ساختمان دقیق میکروسکوپ اساساً مربوط به فیزیک نور می‌باشد. به همین جهت در این فصل بیشتر به معرفی ساختمان کلی میکروسکوپ و نحوه کاربرد صحیح آن برای مطالعه سلول‌ها توجه شده است.

هر میکروسکوپ از دو بخش مکانیکی[5] و نوری[6] تشکیل شده است.

۱- **بخش مکانیکی:** در واقع قسمت‌هایی است که مستقیماً در عبور و تشکیل تصویر نقش اصلی را به عهده ندارند و شامل کلیه بخش‌های نگاهدارنده، حرکت دهنده و ثابت‌کننده یک میکروسکوپ می‌باشند. مانند پایه[7]، دسته[8]، صفحه پلاتین[9]، شاریو[10]، صفحه گردان[11]، پیچ‌های تنظیم[12]: (سریع و دقیق)، گیره‌ها[13] و لوله میکروسکوپ[14].

- **پایه میکروسکوپ:** به اشکال نعلی، مدور، مکعب مستطیلی و مانند آن ساخته می‌شود. جنس پایه معمولاً از

1- Resolution 2- Contrast 3- Microscope 4- Micro 5- Mechanical Part
6- Optical Part 7- Base 8- Arm 9- Stage 10- Chariot
11- mRevolver = Revolving nose piece 12- Macrometer (Coars) & Micrometer (fine)
13- Clips 14- Tube

فولاد سنگین انتخاب می‌گردد تا در زمان مطالعه میکروسکوپی و عکس‌برداری از هر گونه لغزشی جلوگیری شود.

- **دسته میکروسکوپ:** برای جابه‌جایی میکروسکوپ به کار می‌رود. دارای اندازه‌ها و شکل‌های مختلفی است. معمولاً دسته داسی یا هلالی شکل است.

- **پیچ‌های تنظیم:** بر روی دسته میکروسکوپ قرار دارند. شامل پیچ میزان سریع یا ماکرومتر و پیچ میزان دقیق یا میکرومتر می‌باشد. در بعضی میکروسکوپ‌ها، این پیچ‌ها بر روی یکدیگر قرار دارند و در برخی جدا از هم هستند. عمل آنها جابه‌جا کردن لوله میکروسکوپ (در میکروسکوپ‌های قدیمی) در جهت بالا و پایین و بالعکس می‌باشد. در میکروسکوپ‌های جدید این پیچ‌ها معمولاً صفحه پلاتین را در جهت بالا به پایین و بالعکس جابه‌جا می‌کنند. با پیچ بزرگ، لوله میکروسکوپ یا پلاتین با سرعت بیشتری بالا و پایین برده می‌شود. بر روی پیچ‌ها در جه‌بندی‌هایی وجود دارد که به کمک آنها می‌توان میزان جابه‌جایی لوله میکروسکوپ یا صفحه پلاتین را مشخص کرد.

- **صفحه پلاتین:** صفحه‌ای است فلزی یا کائوچویی که محل قرار دادن جسم مورد مطالعه می‌باشد. از سوراخ وسط صفحه پلاتین نور عبور کرده و به جسم مورد مطالعه می‌تابد. در میکروسکوپ‌های ساده جسم به وسیلهٔ دو گیره بر روی صفحه پلاتین ثابت می‌شود. و در میکروسکوپ‌های جدیدتر، برای سهولت جابه‌جایی جسم و یا امکان جابه‌جایی توأم پلاتین و جسم روی آن سیستمی به نام شاریو (ارابه‌کش) پیش بینی شده است. شاریو دارای دو بخش تیغه‌ای برای نگهداری نمونه است و نیز پیچ‌هایی در زیر پلاتین دارد که با چرخاندن آنها می‌توان نمونه را بر روی پلاتین، و یا مجموعهٔ نمونه و پلاتین را به چپ و راست یا به جلو و عقب حرکت داد.

- **سیستم ورنیه:** در بیشتر میکروسکوپ‌های کنونی، در دو بعد عمود بر هم پلاتین، دو سیستم ورنیه‌ای پیش بینی شده است، که به کمک آنها می‌توان میزان جابه‌جایی جسم در جهات مختلف و بازیابی منطقه‌ای خاص از جسم مورد مشاهده را انجام داد و نیز در مورد ابعاد جسم یا بخش‌هایی از آن، محاسباتی را تا حدود یک دهم میلیمتر به عمل آورد.

- **صفحه گردان:** قطعه‌ای فلزی است، تقریباً به شکل مخروط ناقص که در سطح پایین آن تعدادی سوراخ تعبیه شده است. به هر یک از این سوراخ‌ها، یک لوله عدسی شیئی پیچ می‌شود. با چرخاندن صفحه گردان، عدسی شیئی موردنیاز در میدان دید قرار می‌گیرد. تعداد سوراخ‌ها متفاوت و تا ۶ عدد می‌رسد. صفحه‌گردان در بالا به لوله میکروسکوپ متصل می‌گردد.

- **لوله میکروسکوپ:** لوله‌ای یک و یا در بالا، دو قسمتی (در میکروسکوپ‌های جدید) است، که در قسمت بالای آن اکولر[1] (لوله عدسی چشمی) و در بخش پایین آن صفحه‌گردان قرار دارد. در بیشتر موارد طول لوله میکروسکوپ ۱۶ سانتیمتر یا ۱۶۰ میلیمتر است. لوله‌های میکروسکوپ با طولی بلندتر از این میزان، بزرگنمایی را افزایش می‌دهند ولی ساختن آنها مشکلات فنی زیادی دارد. هم‌اکنون طول لوله برخی از میکروسکوپ‌ها به ۲۴۰ میلیمتر می‌رسد.

۲- بخش نوری: شامل سه بخش اساسی است: دستگاه روشنایی + ابژکتیف[2] + اکولر

- **دستگاه روشنایی:** از دو بخش تشکیل شده است.

1- Ocular 2- Objectife

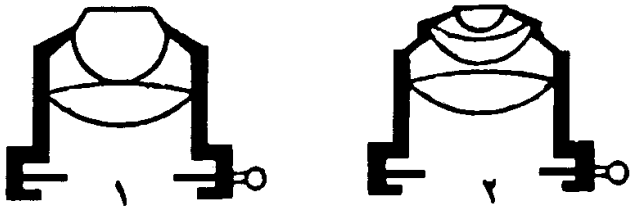
الف) منبع نور[1] به‌طور معمول لامپ کوچک ۶ تا ۱۰ ولت است که اغلب در زیر پایه میکروسکوپ قرار دارد و پرتوها را به دیافراگم زمینه می‌تاباند. در برخی از میکروسکوپ‌های قدیمی، نور لازم با استفاده از آینهٔ ضمیمه به میکروسکوپ و چراغ رومیزی تأمین می‌گردد. در این حال از سطح آینه برای تابیدن نور به سوی جسم استفاده می‌شود. لامپ رومیزی را بایستی در فاصله ۲۵ تا ۳۰ سانتیمتری میکروسکوپ طوری قرار داد که نور به زیر صفحه میکروسکوپ بتابد. تابیدن مستقیم نور لامپ رومیزی به جسم از کیفیت رؤیت می‌کاهد. آینه معمولاً دارای یک طرف کاو و یک طرف صاف می‌باشد. از طرف صاف آن، هنگامی که نور محیط کافی باشد و از سطح کاو آن، در نور کم استفاده می‌شود.

ب) کوندانسور[2]: کوندانسور از مجموعه‌ای از عدسی‌های محدب (کوژ) یا محدب الطرفین ساخته شده که عمل آنها همگرا کردن پرتوهای نوری حاصل از منبع نور و تابانیدن آنها بر روی جسم است تا نور کافی برای مشاهده جسم تأمین گردد.

انواع کوندانسور

۱-کوندانسور آبه[3]: از مجموعه دو عدسی محدب (محدب الطرفین) ساخته شده است. این کوندانسور را می‌توان توسط پیچی تنظیم کرد. این کوندانسور به تقریب ارزان قیمت است، اما انحرافات کروی[4] و رنگی (نوری[5]) را تصحیح نمی‌کند. (در صفحات بعد از انحرافات کروی و رنگی بحث خواهد شد). در اکثر میکروسکوپ‌های متداول، کوندانسور مورد استفاده از نوع آبه است. این کوندانسور در فاصله بین منبع روشنایی تا جسم، و به‌طور معمول در زیر صفحه پلاتین قرار دارد.

۲-کوندانسور آپلاناتیک[6]: این نوع کوندانسور دارای یک عدسی محدب بینابینی اضافی می‌باشد. کار این عدسی اضافی، اصلاح انحرافات کروی است. با این نوع کوندانسورها، انحرافات رنگی اصلاح نمی‌شود و برای اصلاح آن بایستی از نور تک‌رنگ[7] استفاده کرد. کوندانسورهای نوع آپلاناتیک دقیق‌تر و برای کار میکروسکوپی مناسب‌تر می‌باشند.



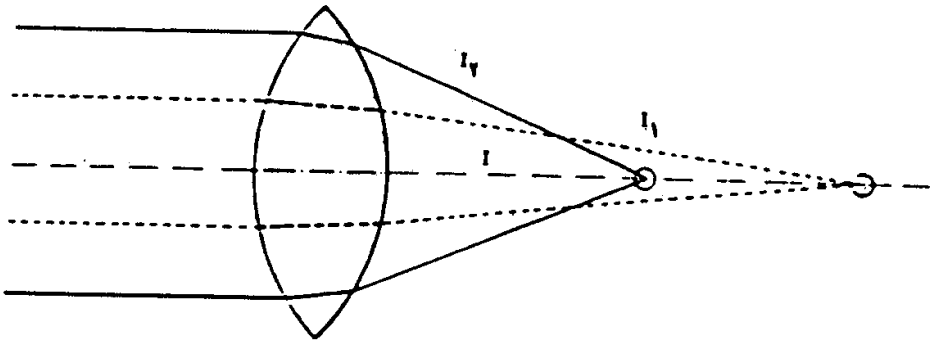
۱- کوندانسور آبه ON = ۱,۲۰
۲- نوعی کوندانسور آپلاتیک ON = ۱,۳۰

شکل ۴-۱. برش دو نوع کوندانسور

انحرافات کروی این گونه انحرافات ناشی از تحدب و کرویت عدسی‌ها می‌باشد. اگر یک دسته پرتوهای نوری موازی

1- Illumination Source 2- Condensor 3- Abbe Conndensor
4- Spherical abberations 5- Chromatic abberations = optic abberations
6- Aplanatic 7- Monochrome

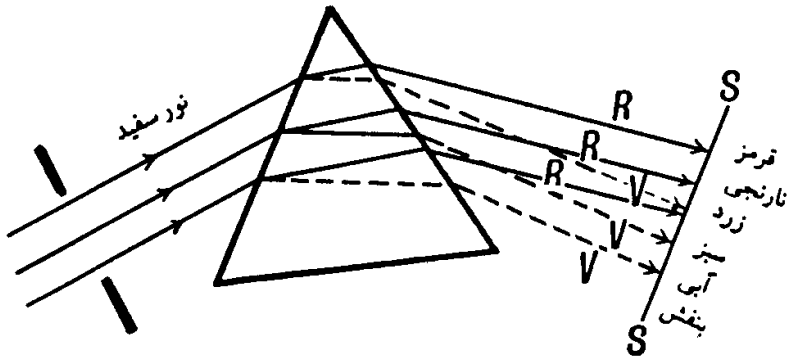
به یک سطح کروی (مثلاً یک عدسی محدب) برخورد کند، همه به یک میزان پراش نمی‌یابد. پرتوهایی که از مرکز می‌گذرند، بدون شکست پیش می‌روند. حال آن که پرتوهایی که به محیط و کنارهٔ عدسی برخورد کنند پراش بیشتری دارند. به این ترتیب هر چه شعاع نورانی به مرکز سطح کروی نزدیک‌تر باشند، شکست کمتری دارند و هرچقدر از مرکز آن دور شوند، شکست بیشتری می‌یابند. پراش نابرابر همه پرتوهای نورانیِ موازی را که به یک سطح کروی می‌رسند، انحرافات کروی[1] نامند (شکل ۴-۲).



شکل ۴-۲. انحرافات کروی - I_2 پرتوهای نوری کناری که در برخورد با عدسی شکست بیشتری پیدا کرده‌اند و I_1 پرتوهای نوری نزدیک به مرکز را که شکست کمتری دارند، نشان می‌دهد. I پرتوهایی که از مرکز عدسی می‌گذرند شکست پیدا نمی‌کنند.

اِشکال عمدهٔ ناشی از انحرافات کروی در مشاهدات میکروسکوپی آن است که تمام کانون کوندانسور که محل قرار گرفتن جسم است به‌طور یکنواخت روشن نمی‌شود. بخش‌های مرکزی کانون روشن‌تر و بخش‌های کناری آن روشنایی کمتری دارند برای رفع این اشکال از کوندانسورهای آپلاناتیک استفاده می‌شود. کوندانسورهای آپلاناتیک با عدسی‌های محدب اضافی که دارند موجب همگرایی بیشتر پرتوها (کوچک شدن منطقه کانون) و در نتیجه یکنواختی بیشتر شدت روشنایی روی جسم می‌شوند (اصلاح نسبی انحرافات کروی).

انحرافات رنگی: هر طول موجی از نور به حسب انرژی خود، هنگامی که به یک منشور برسد با زاویهٔ مخصوصی می‌شکند. وقتی نور به یک عدسی بتابد، همانند تابیدن آن به منشور، تجزیه می‌شود و طیف‌های (رنگ‌ها یا طول موج‌های) مختلف آن با زوایای متفاوتی شکست پیدا کرده و از هم تفکیک می‌شوند. پرتوهای آبی‌شکست بیشتری نسبت به پرتوهای قرمز پیدا می‌کنند و در فاصله کمتری نسبت به عدسی متمرکز می‌گردند. تفکیک طیف‌های سازنده هر نور مرکب[2] در برخورد با یک عدسی وشکست متفاوت آنها را اصطلاحاً انحرافات رنگی نامند. این انحرافات از وضوح تصویر می‌کاهد و برای اصلاح آن از نور تک‌رنگ که فقط دارای یک طول موج خاص می‌باشد، استفاده می‌شود. شکل ۴-۳ مفهوم ساده‌ای از انحرافات رنگی را نشان می‌دهد.



شکل ۴-۳. پرتوهای نوری دارای طول موج‌های مختلف در برخورد با یک سطح شفاف پراش دهنده با زاویه‌های مختلفی شکست پیدا می‌کنند و تفکیک می‌شوند.

پرتوهای نوری که عبور می‌کنند

1- Spherical Aberration 2- Polychrome

نور تک‌رنگ را می‌توان با استفاده از فیلترهای[1] رنگی به‌دست آورد. به‌عنوان مثال اگر فیلتر قرمز باشد، فقط طیف قرمز را عبور می‌دهد. با استفاده از فیلترهای آبی‌رنگ، قدرت تفکیک میکروسکوپ را تا حدی می‌توان بهبود بخشید.

فیلترها (صافی‌های نور): فیلترها صفحات شیشه‌ای رنگین، تیره‌رنگ یا مشبّکی هستند که از آنها برای ایجاد روشنایی یکنواخت، پراکندگی نور و بالا بردن تضاد[2] استفاده می‌شود. از آنجا که هر فیلتری طیف همرنگ خود را عبور می‌دهد و برعکس از عبور طیف‌های مکمل رنگ خود جلوگیری می‌کند، با استفاده از فیلترهای رنگی می‌توان تک‌رنگ دلخواه و مناسب برای هر مشاهدهٔ میکروسکوپی را فراهم ساخت و برای افزایش تضاد به هنگام عکسبرداری میکروسکوپی از فیلتر مناسبی استفاده کرد. هنگام مشاهده میکروسکوپی با میکروسکوپ‌های فاز متضاد[3] و زمینه تاریک[4] که نمونه‌های مورد بررسی رنگ نشده‌اند، به کارگیری یک فیلتر سبزرنگ موجب سهولت مشاهده می‌شود. فیلترهای جذب‌کننده مادون قرمز، تحت‌عنوان فیلترهای حرارتی جهت جلوگیری از رسیدن حرارت زیاد به نمونه زنده به کارگرفته می‌شود.

رنگ‌ها در نمونه‌های میکروسکوپی مقداری از نور را جذب می‌کنند. اگر فیلتر جذب کنندهٔ رنگ به کارگرفته شود، تضاد افزایش خواهد یافت. با استفاده از فیلترهای پلاریزان در زیر لام و بر روی عدسی چشمی می‌توان نور پلاریزه به‌دست آورد که در مطالعه دانه‌های نشاسته و مواد بلوری در سلول‌های جانوری و گیاهی، کوتیکول‌های گیاهی، مو و پشم و سایر فیبرهای طبیعی، دندان و استخوان بدون کلسیم‌شده[5] و فیبرهای عضلانی کاربرد بسیار دارد.

دیافراگم[6]

دیافراگم وسیله تنظیم شدت نور میکروسکوپ است. هر میکروسکوپ به‌طور معمول دارای دیافراگم زمینه[7] دیافراگم کوندانسور و دیافراگم اکولر است. دیافراگم زمینه میزان نوری را که از منبع روشنایی به کوندانسور می‌رسد تنظیم می‌کند و معمولاً در بالای منبع روشنایی قرار دارد. دیافراگم کوندانسور، شدت نوری را که از کوندانسور گذشته و به جسم می‌رسد تنظیم می‌کند و اغلب در زیر کوندانسور قرار دارد.

دیافراگم اکولر برحسب نوع اکولرها، در داخل لولهٔ اکولری (اکولرهای منفی) و یا قبل از عدسی جبهه‌ای[8] اکولر قرار دارد (اکولر مثبت). در برخی میکروسکوپ‌ها برای لوله ابژکتیف نیز دیافراگم تعبیه شده که شدت نوری را که از ابژکتیف به اکولر می‌رسد تنظیم می‌کند.

دیافراگم زمینه و دیافراگم کوندانسور دارای اقسام مختلفی به شرح زیرند:

الف) دیافراگم ساده[9]: صفحه‌ای فلزی یا کائوچویی دارای چند سوراخ با قطرهای متفاوت است (شکل ۴-۴ الف). با افزایش میزان در شتنمایی ابژکتیف، سوراخ وسیع‌تر دیافراگم در مسیر نور قرار می‌گیرد، تا نور مورد نیاز تأمین گردد. با قرار دادن فیلترهای رنگی و یا مشبک در هر یک از سوراخ‌های دیافراگم ساده می‌توان تک‌رنگ موردنظر را به‌دست آورد و یا نور را همگن کرد.

ب) دیافراگم آیریس[10]: این دیافراگم همانند مردمک چشم امکان تنگ و گشاد شدن را دارد و از تعداد نسبتاً زیادی صفحات نازک انعطاف‌پذیر و قابل لغزش بر روی هم ساخته شده است (شکل ۴-۴ ب). انطباق صفحات نازک

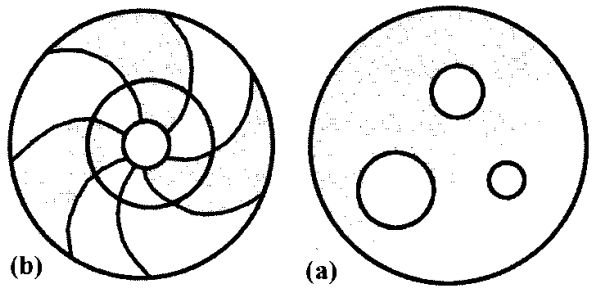
1- Filter 2- Contrast 3- Phase Contrast 4- Dark field 5- Decalcification

۶- دیافراگم‌ها را به‌طور معمول جزء بخش مکانیکی میکروسکوپ‌ها به حساب می‌آورند. از آن جا که در میکروسکوپ‌های جدید دیافراگم به عدسی‌هایی مجهز شده و بیشترین وابستگی آنها به کوندانسور است، در این بحث آنها را به دنبال شرح کوندانسور آورده‌ایم.

7- Diaphragme = Diaphragme de champs 8- Frontal lens 9- Simple diaphragme

10- Iris diephragme

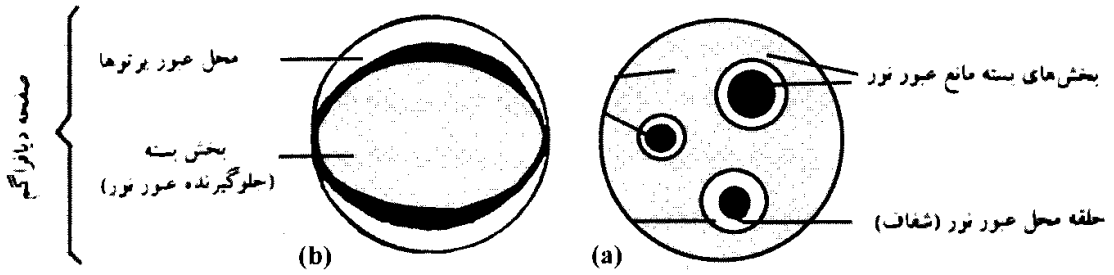
بر روی هم با باز شدن سوراخ میانی آنها و عبور نور بیشتری همراه است. گسترش صفحات نازک موجب تنگ‌شدن سوراخ میانی آنها و عبور نور کمتری خواهد بود.



شکل ۴-۴. a) نمایی از سه دیافراگم ساده با قطرهای متفاوت b) نمایی از دیافراگم آیریس

ج) دیافراگم حلقوی[1]: این دیافراگم دارای حلقه‌هایی با قطر متفاوت برای عبور نور است. همان‌طور که شکل ۴-۵ نشان می‌دهد، ساختمان آن به نحوی است که از عبور پرتوهای نوری مرکزی جلوگیری می‌کند و پرتوهای محیطی را که پراش بیشتری پیدا می‌کنند به جسم می‌تاباند. از این نوع دیافراگم، در میکروسکوپ فاز متضاد استفاده می‌شود. قطر حلقه‌ها با درشت‌نمایی ابژکتیف مورد استفاده، نسبت مستقیم دارد. چنانچه نور بیشتری نیاز باشد، دیافراگم با حلقه وسیع‌تر در مسیر نور قرار می‌گیرد.

د) دیافراگم زمینه تاریک[2] **(هلالی)**: این نوع دیافراگم از عبور پرتوهای نوری مرکزی جلوگیری می‌کند، و فقط پرتوهای نوری کناری از دو منطقه تقریباً هلالی شکل عبور کرده و به کوندانسور می‌رسد. به کمک این دیافراگم، پرتوها کاملاً محیطی شده و به‌طور بسیار مایل به جسم می‌تابند و بخش عمده‌ای از آنها در محیط جسم پراش می‌یابند به نحوی که تنها بخشی از پرتوهای پراش یافته امکان ورود به ابژکتیف را پیدا می‌کنند (شکل ۴-۵).

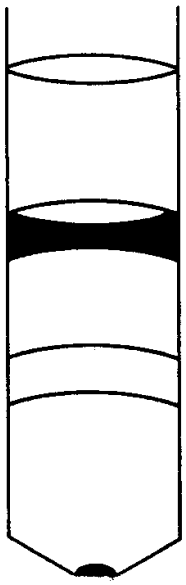


شکل ۴-۵. a) دیافراگم حلقوی b) دیافراگم زمینهٔ تاریک

ابژکتیف[3]: هر ابژکتیف اساساً از تعدادی عدسی تشکیل شده است. تعداد این عدسی‌ها ۴، ۸ و گاه به ۶ عدد می‌رسد که پشت سرهم و با رعایت قوانین فیزیکی قرار گرفته و یا با هم ترکیب شده‌اند. عمل کلی ابژکتیف تشکیل اولین تصویر از جسم است. این تصویر بزرگ‌تر از جسم، معکوس و حقیقی است.

ابژکتیف مهم‌ترین بخش نوری هر میکروسکوپ است. اولین عدسی موجود در لوله ابژکتیف را که به جسم نزدیک‌تر است، عدسی جبهه‌ای[4] یا عدسی شیئی نامند. این عدسی نیمه کروی[5] است. دومین عدسی را عدسی هلالی[6] نامند (شکل ۴-۶). بقیه عدسی‌ها به حسب نوع ابژکتیف تفاوت دارند که در بحث‌های بعدی به آنها اشاره خواهد شد.

1- Annular diaphragme 2- Dark field diaphragme 3- Objective
4- Frontal lens 5- Hemispheric 6- Menisque



شکل ۴-۶. انواع عدسی‌هایی که در ابژکتیف قرار می‌گیرند ۱) عدسی جبهه‌ای (پیشین) ۲) عدسی هلالی ۳) عدسی‌های ترکیبی (بینابینی) ۴) عدسی پشتی

جنس عدسی‌های ابژکتیف

عدسی‌های ابژکتیف از خاک‌هایی با جنس متفاوت که برخی درشتی و ویژگی‌های مختلف دارند، ساخته می‌شوند. این خاک‌ها عبارتند از:

- **کرون**[1]: کرون قدرت تفرق (پراش) نوری کمی دارد و در ساختن عدسی‌های محدب‌الطرفین به کار می‌رود.
- **فلینت**[2]: قدرت تفرق زیادی دارد و در ساختن عدسی‌های مقعرالطرفین مورد استفاده قرار می‌گیرد.
- **فلوئورین**[3]: برای ساختن هر دو نوع عدسی محدب‌الطرفین و مقعرالطرفین مورد استفاده است.
- **کوارتز**[4] (SiO_2): مرغوب‌ترین عدسی‌ها را از کوارتز می‌سازند که در میکروسکوپ U.V از این نوع عدسی استفاده می‌شود.

ابژکتیف‌ها را به حسب روش به کارگیری، ترکیب عدسی‌ها و کارآیی آنها به شرح زیر تقسیم‌بندی می‌کنند:

۱- برحسب روش به کارگیری: ابژکتیف‌ها را به دو نوع خشک[5] و ایمرسیون[6] نامگذاری می‌کنند: وقتی محیط شفاف بین جسم و ابژکتیف (فاصله فروتنال[7]) هوا یا گاز باشد، ابژکتیف را اصطلاحاً ابژکتیف خشک نامند و اگر این فاصله به وسیلهٔ مایعی (آب، گلیسرین، روغن سدر، آلفابرمونفتل و مانند آن) پر شود، ابژکتیف را ایمرسیون می‌گویند.

در درشت‌نمایی‌های بالا که به نور بیشتری نیاز است، از شرایط ایمرسیون استفاده می‌شود که ضمن آن مایع موجود در فاصله فرونتال کار یک عدسی محدب را انجام می‌دهد و پرتوهای نوری را کانونی و همگرا می‌کند، به ابژکتیف می‌رساند و به این ترتیب از هدر رفتن آنها پیشگیری می‌کند. (شکل ۴-۷).

۲- برحسب ترکیب و کارآیی عدسی‌ها

الف - ابژکتیف آکروماتیک[8]: انواع مختلف شیشه از لحاظ درجهٔ شکستِ رنگ‌های مختلف با یکدیگر تفاوت دارند. در ابژکتیف‌های آکروماتیک عدسی‌هایی را که از ترکیب شیشه‌های مختلف ایجاد شده‌اند به‌صورت مجموعه‌های دوتایی (مقعر، محدب) به کار می‌گیرند. در ابژکتیف‌های آکروماتیک با استفاده از ترکیب عدسی‌های دارای جنس و تحدب متفاوت (عدسی‌های مقعر و محدب)، پرتوهای قرمز و آبی را در یک کانون جمع‌آوری کرده و از مجموعهٔ آنها، طیف سبز مایل به زرد را می‌سازند، که در چشم بیشترین حساسیت را ایجاد می‌کند. این نوع عدسی‌ها را عدسی‌های دارای سیستم دوتایی[9] نامند.

ب - ابژکتیف آپوکروماتیک[10]: در این ابژکتیف‌ها ترکیب عدسی‌های مختلف به نحوی است که مجموعه‌ای از طیف‌های آبی، سبز و قرمز هم کانون می‌شوند و به این ترتیب مقدار زیادی از انحرافات رنگی اصلاح می‌گردد. عدسی‌های به کار گرفته شده در ابژکتیف‌های آپوکروماتیک معمولاً ساختمان سه‌تایی[11] دارند. این ابژکتیف‌ها به ویژه برای عکس‌برداری‌های میکروسکوپی مناسب‌اند و در میکروسکوپ‌های دقیق‌تر کاربرد دارند

1- Crown 2- Flint 3- Flourine 4- Quartz 5- Dry objectives
6- Immersion objectives 7- Frontal = working distance 8- Achromatic
9- Doublet 10- Apochromatic 11- Triplet

(شکل ۴-۸). یادآوری می‌شود که نوع دیگری از ابژکتیف‌ها به نام ابژکتیف فاز مخصوص میکروسکوپ‌های فاز متضاد وجود دارد که ویژگی‌های آن در بخش میکروسکوپ فاز متضاد مورد بحث قرار گرفته است.

درشت‌نمایی ابژکتیف

نسبت اندازه تصویر به اندازه جسم را درشت‌نمایی هر سیستم نوری گویند. برای ابژکتیف، درشت‌نمایی از روابط زیر محاسبه می‌شود:

$$Mob = \frac{I(\text{اندازه تصویر})}{I(\text{اندازه جسم})} \quad (۱)$$

$$Mob = \frac{d(\text{فاصله تصویر از عدسی ابژکتیف})}{d'(\text{فاصله جسم از عدسی ابژکتیف})} \quad (۲)$$

$$Mob = \frac{L(\text{طول لوله میکروسکوپ برحسب میلیمتر})}{Fob(\text{فاصله کانونی عدسی ابژکتیف برحسب میلیمتر})} \quad (۳)$$

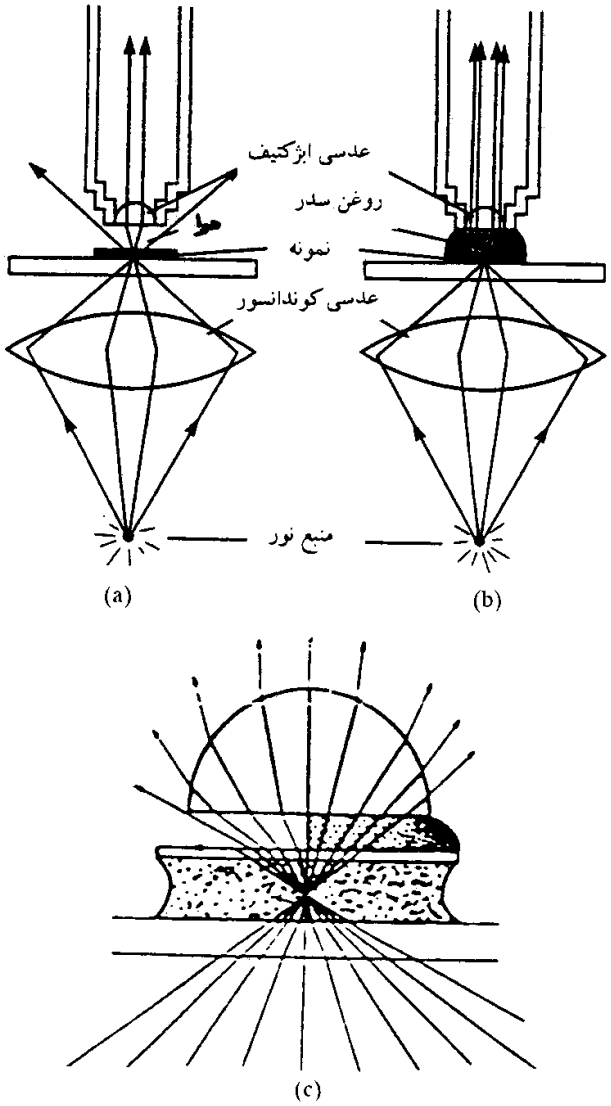
با توجه به رابطه (۳)، چون طول لوله میکروسکوپ (L) به‌طور معمول، ثابت و ۱۶۰ میلیمتر است، بنابراین فاصله کانونی ابژکتیف‌های دارای درشت‌نمایی‌های مختلف (با در نظر گرفتن درشت‌نمایی‌های متداول) به شرح زیر خواهد بود:

ابژکتیف ۱۰ $F = \frac{۱۶۰}{۱۰} = ۱۶ \text{ mm}$

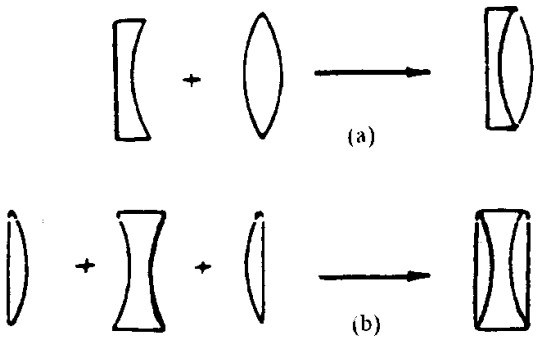
ابژکتیف ۴۰ $F = \frac{۱۶۰}{۴۰} = ۴ \text{ mm}$

ابژکتیف ۱۰۰ $F = \frac{۱۶۰}{۱۰۰} = ۱/۶ \text{ mm}$

مقایسه اعداد فوق نشان می‌دهد که فاصله کانونی ابژکتیف با درشت‌نمایی آن نسبت عکس دارد و هرچه درشت‌نمایی بیشتر شود، فاصله کانونی کمتر و به عبارت دیگر تحدب افزایش می‌یابد. چون تراش عدسی‌های دارای کرویت (تحدب) بیشتر، مشکل‌تر است، ابژکتیف‌های دارای درشت‌نمایی بالا با ارزش‌ترند. بر روی هر ابژکتیف اعداد مختلفی حک شده که نشان دهنده: درشت‌نمایی، زاویه گشودگی[1]، طول لوله میکروسکوپ، شماره سریال و ضخامت لامل مناسب برای آن ابژکتیف می‌باشد. فاصله کانونی برخی ابژکتیف‌ها نیز بر روی لوله ابژکتیف



شکل ۴-۷. مقایسه مسیر پرتوها در عدسی خشک a) و حالت (عدسی) ایمرسیون b) مقایسه کلی نیز مشخص شده است c)

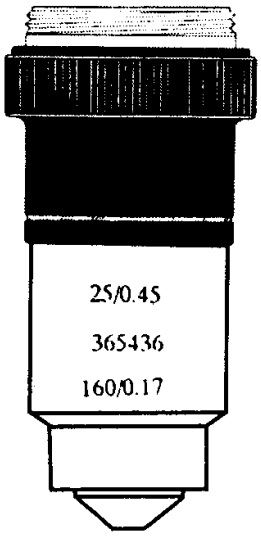


شکل ۴-۸. a) عدسی آکروماتیک b) عدسی‌های آپوکروماتیک

1- Numerical aperture (N.A.)

ثبت شده است. در شکل ۴-۹ تا حد امکان‌معرف اعداد روی هر ابژکتیف است:

برخی مشخصات دیگر ابژکتیف‌ها نیز بر روی آنها حک می‌شود مثلاً Oil: برای ابژکتیف ایمرسیون، Ph: برای ابژکتیف فاز، Plan: برای ابژکتیف‌های معمولی، نوارهای رنگی: برای تشخیص سریع درشت‌نمایی‌ها، Pol: برای میکروسکوپ پلاریزان، fl یا فلینت: برای سیستم‌های فلینت، apo: برای ابژکتیف‌های آپوکروماتیک و مانند آن.



شکل ۴-۹. یک ابژکتیف معمولی (پلانوکروماتیک) با درشت‌نمایی ۲۵×، زاویه گشودگی NA=۰/۴۵، شماره سریال ۳۶۵۴۳۶ که برای میکروسکوپی با طول لوله ۱۶۰ میلیمتر و لامل‌هایی با ضخامت ۰/۱۷ میلیمتر ساخته شده است.

اکولر[1]

اکولرها اساساً از تعدادی عدسی محدب یا محدب‌الطرفین ساخته شده‌اند که در مجموع کار یک ذره‌بین را انجام می‌دهند. اکولر از تصویر ایجاد شده به وسیلهٔ ابژکتیف، تصویری مجازی، مستقیم (معکوس نسبت به جسم اولیه) و بزرگ‌تر درست می‌کند. اکولرها با درشت‌نمایی‌های متفاوتی که بر روی آنها حک می‌شود، ساخته شده‌اند. عدسی‌های اکولری با درشت‌نمایی: ۵X و ۱۰X بسیار متداول هستند. بزرگ‌نمایی ۱۲X و بندرت ۱۵X و ۲۵X نیز وجود دارد.

انواع اکولرها: براساس طرز قرارگرفتن عدسی‌ها و محل دیافراگم دو نوع اکولر ساخته می‌شود:

۱-اکولر منفی: در این نوع اکولر سطوح صاف عدسی‌های موجود در اکولر به طرف بالا (به طرف چشم بیننده) قرار دارد و دیافراگم اکولر در درون لوله آن، در پشت عدسی جبهه‌ای اکولر و نزدیک به کانون آن جای دارد (شکل ۴-۱۰ الف).

انواع متداول این نوع اکولرها، نوع هیجن[2] و دولوند[3] است.

۲-اکولر مثبت: در این اکولرها، سطوح محدب عدسی‌ها به سوی یکدیگر است و دیافراگم اکولر، در خارج آن قرار دارد (شکل ۱۰-۴ ب).

اکولرهای رمزدن[4] و کلنر[5] انواع متداول اکولرهای مثبت‌اند.

توجه به فاصله کانونی اکولرها و مقایسه آن با فاصله کانونی ابژکتیف‌ها نشان می‌دهد که به‌طور کلی اکولرها فاصله کانونی بزرگ‌تری در حد چند سانتیمتر دارند در حالی که فاصله کانونی ابژکتیف‌ها معمولاً کوچک و در حد چند میلیمتر است. به همین دلیل میزان درشت‌نمایی ابژکتیف‌ها اغلب بیش از اکولرهاست.

درشت‌نمایی میکروسکوپ

برای میکروسکوپ، سه نوع درشت‌نمایی درنظر می‌گیرند: درشت‌نمایی تجارتی، درشت‌نمایی مفید و درشت‌نمایی مخصوص.

۱- درشت‌نمایی تجارتی: عبارتست از حاصلضرب درشت‌نمایی سه بخش ابژکتیف، اکولر و لوله میکروسکوپ که به‌صورت زیر محاسبه می‌شود:

$$G_M = G_{ob} \times G_{oc} \times G_T$$

برای مثال با ابژکتیف ۱۰۰، اکولر ۱۰ و درشت‌نمایی لوله میکروسکوپ برابر ۱/۲۵، درشت‌نمایی

1- Ocular 2- Huygen 3- Dolond 4- Ramsden 5- Kellner

میکروسکوپ می‌شود:

G_M = ۱۲۵۰ (برابر) × ۱/۲۵

G_M = ۱۰۰ × ۱۰

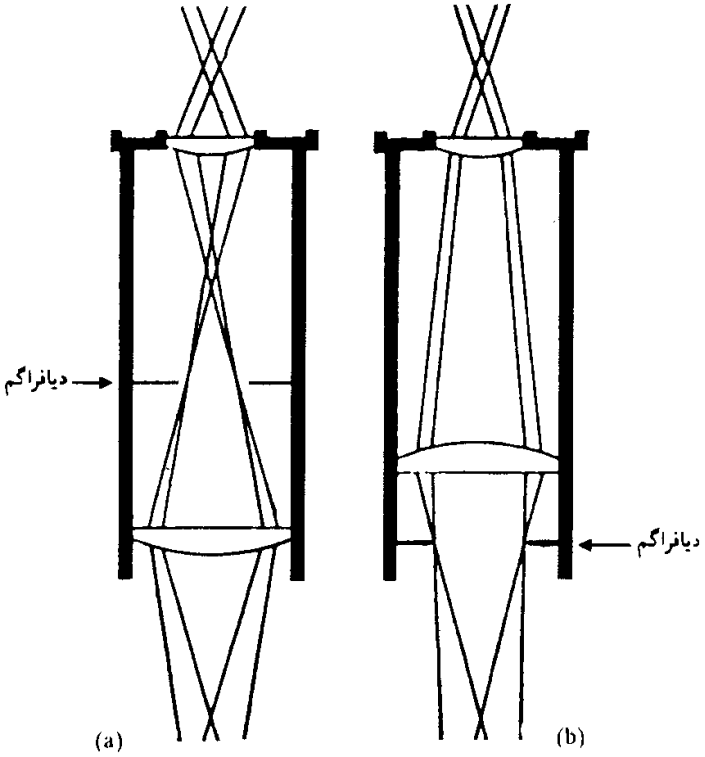
۲- درشت‌نمایی مفید: از حاصلضرب شماره مدخل[1] در هزار به‌دست می‌آید:

G_M = N.A. × ۱۰۰۰

(مفهوم و طرز محاسبه شماره مدخل یا زاویه گشودگی (NA) در صفحه ۱۶۷ توضیح داده شده است).

۳- درشت‌نمایی مخصوص: از تقسیم عدد ۲۵۰ میلیمتر که فاصله متوسط رؤیت واضح با چشم است بر فاصله کانونی ابژکتیک محاسبه می‌شود:

$$G_M = \frac{۲۵۰\,mm}{fob\ mm}$$



شکل ۴-۱۰. طرح مسیر نور در a) اکولر هیجن (اکولر منفی). b) اکولر رامزدن (اکولر مثبت)

تشکیل تصویر در میکروسکوپ

تشکیل تصویر در میکروسکوپ از قوانین تشکیل تصویر در عدسی‌های محدب پیروی می‌کند. ابژکتیف از جسم تصویر اول را می‌سازد که تصویری حقیقی، بزرگ‌تر و معکوس است. (چرا؟) این تصویر برای اکولر در حکم جسم است. از آن جا که فاصله کانونی اکولرها نسبت به ابژکتیف‌ها بزرگ‌تر است، تصویر ایجاد شده به وسیلهٔ ابژکتیف در فاصله کانونی اکولر قرار می‌گیرد. اکولر همانند ذره‌بین، از این تصویر، تصویر نهایی را که مجازی، بزرگ‌تر و مستقیم است، ایجاد می‌کند که با چشم رؤیت می‌شود (شکل ۴-۱۱).

توان تفکیک یا قدرت تمیز میکروسکوپ[2]

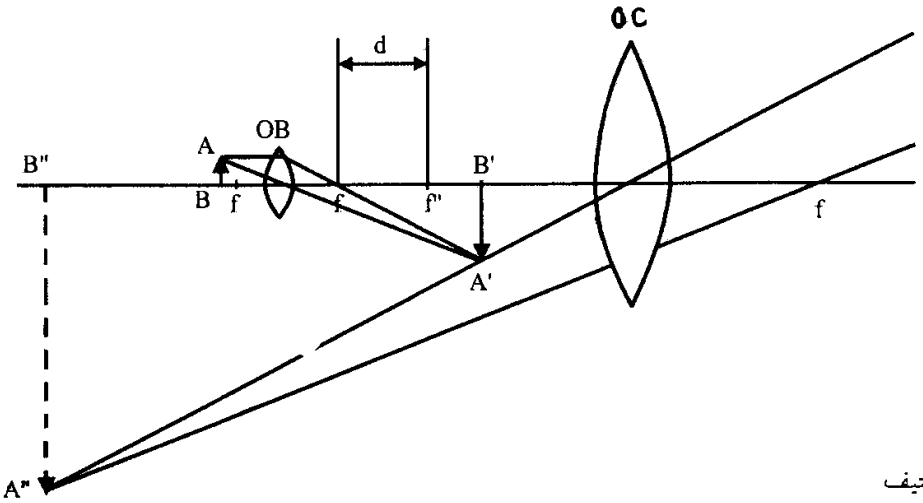
کوچک‌ترین فاصله قابل تشخیص بین دو نقطه واقع بر یک سطح را که به وسیلهٔ یک سیستم نوری، قابل رؤیت باشد، توان تفکیک آن دستگاه گویند. هرچه مقدار عددی توان تفکیک کمتر (کوچک‌تر) باشد، توان تفکیک دستگاه نوری بیشتر (بهتر) است. مثلاً توان تفکیک دستگاهی که دو نقطه با فاصله ۱۰۰ میکرون را از هم تشخیص می‌دهد از توان تفکیک دستگاهی که فاصله ۲۰۰ میکرون را به‌عنوان کوچک‌ترین فاصله بین دو نقطه تشخیص می‌دهد بیشتر است.

با استفاده از معادله آبه[3] توان تفکیک وسایل نوری، حتی چشم را می‌توان محاسبه کرد:

$$\Sigma = \frac{۰/۶۱\lambda}{n\sin\alpha} = \frac{۰/۶۱\lambda}{N.A.}$$

در این رابطه: Σ، قدر مطلق توان تفکیک است. عدد ۰/۶۱، مقدار ثابت محاسبه شده رابطه است. λ طول موج

1- Numerical aperture (N.A.) 2- Resolution Power 3- Abbés equation



OB ابژکتیف
OC اکولر
AB شیئی
A´B´ تصویر معکوس حقیقی
A"B´" تصویر معکوس مجازی - OF فاصله کنونی ابژکتیف - Of فاصله کانونی اکولر
A´B´ بین اکولر و کانون آن تشکیل می‌شود.
هر قدر فاصله کانونی OB کمتر باشد بزرگ نمایی بیشتر است.
هر قدر فاصله کانونی OC کمتر باشد بزرگ نمایی بیشتر است.
هر قدر فاصله d بین دو کانون OB بیشتر باشد بزرگ نمایی بیشتر است.

شکل ۴-۱۱. مسیر پرتوها در میکروسکوپ نوری معمولی

نور (رنگ یا طیف) به کار گرفته شده برای رؤیت جسم است (به‌عنوان مثال طول موج نور سفید ۵۵۰ - ۵۰۰ نانومتر، پرتوهای بنفش حدود ۴۰۰ - ۳۵۰ نانومتر و پرتوهای قرمز حدود ۷۵۰ - ۷۰۰ نانومتر است). n ضریب شکست محیط شفاف است (حد فاصل بین جسم و اولین عدسی ابژکتیف را که می‌تواند هوا یا مایع باشد، محیط شفاف نامند). α نیم زاویه مخروط روشنایی[1] یا نیم زاویه مدخل گشودگی است که شرح آن در صفحه ۱۶۷ آمده است.

چگونه می‌توان توان تفکیک میکروسکوپ را افزایش داد

همان‌طور که مطرح شده در رابطه $\sum = \frac{0/61\lambda}{n\sin\alpha}$ هرچه مقدار عددی $\sum$ کاهش یابد، توان تفکیک میکروسکوپ بهبود یافته یا اصطلاحاً افزایش می‌یابد. برای کم کردن مقدار $\sum$ دو امکان وجود دارد: یا λ (صورت کسر) کاهش یابد یعنی از طول موج‌های کوتاه‌تر استفاده شود و یا آن که $n\sin\alpha = N.A.$ (مخرج کسر) بزرگ شود. با توضیحات بعدی مشخص می‌گردد که امکان بزرگ‌کردن N.A. و به عبارت دیگر میزان تغییرات آن محدود و نزدیک به ۰/۹ تا ۱/۶ است. به همین دلیل عملاً راه اصلیِ کاهش $\sum$ و دستیابی به توان تفکیک بهتر، به کارگیری طول موج‌های کوتاه‌تر، مثلاً پرتوهای فرابنفش است.

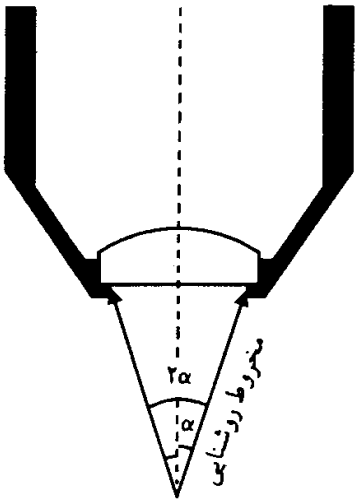
شماره مدخل، زاویه گشودگی یا میزان کارآیی ابژکتیف

مقدار N.A. یا $n\sin\alpha$ را شماره مدخل یا مقدار زاویه گشودگی گویند. n ضریب شکست برخی محیط‌های شفاف که به‌طور معمول در مشاهدات میکروسکوپی مورد استفاده قرار می‌گیرد به شرح زیر است: (جدول ۴-۱)

1- Illumination Cone

جدول ۴-۱

محیط	ضریب شکست
هوا	حدود ۱
آب مقطر	۱/۳۳
روغن سدر	۱/۵
α برمونفتل	۱/۶



شکل ۴-۱۲. نمایش مخروط روشنایی. زاویه رأس مخروط (2α) و نیم زاویه مخروط روشنایی α

جدول ۴-۱ نشان می‌دهد که تغییرات n، محدود و از حدود ۱ تا ۱/۶ است. α نیم زاویه مخروط روشنایی است. مجموعه پرتوهای پراش‌یافته و نیز پرتوهایی که مستقیماً از جسم می‌گذرند و وارد ابژکتیف می‌شوند مخروط روشنایی را به وجود می‌آورند (شکل ۴-۱۲).

همان‌طور که این شکل نشان می‌دهد، از پرتوهای رسیده از جسم، تنها بخش کوچکی که سازنده مخروط روشنایی است وارد ابژکتیف می‌شوند. زاویهٔ رأس مخروط روشنایی را با 2α نمایش می‌دهند. α یا Sin آن به‌عنوان یکی از شاخص‌های میزان کارآیی هر ابژکتیف درنظر گرفته می‌شود. در مثلث قایم‌الزاویهٔ ABC، $\text{Sin}\alpha = \frac{BC}{AC}$ است. یعنی α با شعاع عدسی ابژکتیف و بنابراین با قطر آن (CD) نسبت مستقیم دارد.

همان‌طور که قبلاً شرح داده شد، درشت‌نمایی ابژکتیف با فاصله کانونی آن نسبت عکس دارد. بنابراین هرچه درشت‌نمایی بیشتر شود، فاصله ابژکتیف با جسم کم شده، مخروط روشنایی کوتاه می‌گردد و 2α به ۱۸۰° نزدیک می‌شود. اما هرگز در رؤیت واضح، ابژکتیف با جسم مماس نمی‌شود. اگر به فرض ابژکتیف با جسم مماس باشد، $2\alpha = 180°$ و $\alpha = 90°$ و $\text{Sin}\alpha = 1$ خواهد شد. بنابراین از دید نظری (نه در جریان رؤیت میکروسکوپی) حداکثر $\text{Sin}\alpha = 1$ خواهد بود. با این توضیحات، تغییرات مقدار $\text{Sin}\alpha$ نیز چندان وسیع نیست و در رابطه: $n\text{Sin}\alpha = \text{N.A.}$، حداکثر مقدار ممکن NA، ۱/۶ = ۱ × ۱/۶ خواهد بود. از آن جا که میزان تغییرات NA حدود ۱ تا ۱/۶ می‌شود، راه مناسب افزایش توان تفکیک میکروسکوپ، همان استفاده از طول موج‌های کوتاه‌تر است.

در میکروسکوپ‌های نوری با استفاده از نور سفید، توان تفکیک حدود ۲۵۰۰۰ نانومتر یا ۰/۲۵ میکرون است. وقتی از نور تک‌رنگ[1] (مثل بنفش) با طول موج $\lambda = 4000\ A°$ استفاده شود، توان تفکیک به ۱۷۰ نانومتر یا ۰/۱۷ میکرون، بهبود می‌یابد.

روش‌های مشاهده همراه با افزایش تضاد

میکروسکوپ فاز متضاد[2]

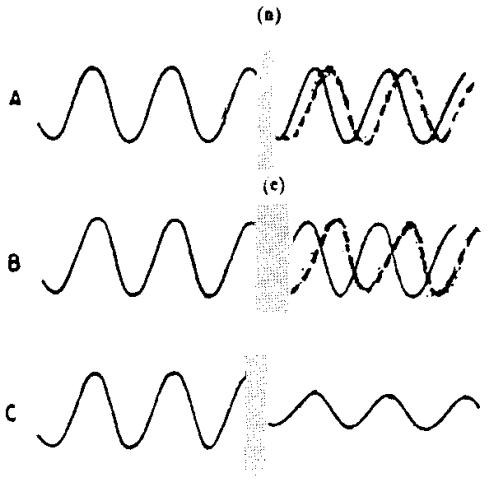
چشم انسان تنها تغییرات طول موج (رنگ) و تغییرات شدت نور مرئی را درک می‌کند. اکثر ساختمان‌های سلولی در ناحیه مرئی طیف نور اساساً شفافند. تنها برخی رنگیزه‌ها (که در سلول‌های گیاهی فراوانند) می‌توانند برخی از طول موج‌های نور را جذب کرده و همانند مواد رنگ شده، قابل رؤیت شوند. علت این که سلول‌های زنده

1- Monochrome 2- phase contrast microscope

امکان جذب نور کمی دارند و شفافند، وجود مقدار زیادی آب در آنهاست. معهذا پس از خشک شدن نیز تغییرات کمی در شفافیت آنها ایجاد می‌شود، یا تا حدی دارای تضاد نوری می‌گردند زیرا اکثر عناصر سازندهٔ آنهاوزن اتمی کمی دارند. مشکل کم بودن تضاد نوری سلول را می‌توان با استفاده از رنگ‌هایی که به‌طور انتخابی بر روی مواد متشکلهٔ مختلف سلول ثابت می‌شوند از میان برداشت. تنوع و تغییرات رنگ موجب تضاد نوری می‌شود. اما در بیشتر موارد روش‌های رنگ‌آمیزی را نمی‌توان برای سلول‌های زنده اعمال کرد، چه قبل از رنگ‌آمیزی مراحل مختلف: تثبیت بافت‌ها، شستشو، آب‌گیری، قالب‌گیری و تهیه برش لازم است و هر یک از این مراحل می‌تواند موجب مرگ سلول‌ها و تغییرات شکل‌شناسی و شیمیایی آنها شود.

در سال‌های اخیر پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای در مطالعه سلول‌های زنده از راه ابداع ابزارهای نوری خاص و کاربرد آنها مثل میکروسکوپ فاز متضاد و میکروسکوپ تداخلی[1] حاصل شده است. اساس این دو روش بر این است که ساختمان‌های زیستی از نظر فیزیکی به این دلیل شفافیت زیادی دارند که تغییر فاز چندانی در پرتوهایی که از آنها می‌گذرد ایجاد نمی‌کنند. امروز می‌دانیم به چه شکل این اختلاف فازهایی که از اختلافات جزئی ضریب شکست و ضخامت ذرات کوچک جسم مورد مطالعه ایجاد می‌شود را می‌توان نمایان (مشخص) ساخت.

شکل ۴-۱۳ عمل یک جسم شفاف و غیر جاذب (A) و مادهٔ شفاف و در عین حال، جذب‌کننده (C) بر روی یک شعاع نورانی را نشان می‌دهد.



شکل ۴-۱۳. طرح نشان دهندهٔ: A، عمل یک جسم شفاف و غیر جاذب. ضریب شکست این جسم بیشتر از محیط است. در نتیجه تغییری در فاز «تأخیری» ایجاد نمی‌شود. B، همان جسم اما خیلی ضخیم‌تر. تأخیر یا تغییر فاز خیلی مشخص‌تر است. C، عمل یک جسم شفاف و جذب‌کننده. هم تأخیر وجود دارد و هم کاهش دامنه (شدت).

در (A)، موج به جسمی که ضریب شکست متفاوتی از محیط دارد برخورد می‌کند. شدت موج ضمن عبور از جسم تغییر نمی‌یابد ولی سرعت آن تغییر می‌کند. اگر ضریب شکست جسم خیلی بیشتر از محیط باشد، از آن تأخیری حاصل می‌شود که آن را تغییر فاز نیز می‌نامند. موج پس از خروج از جسم، سرعت اولیه خود را مجدداً پیدا می‌کند، اما تأخیر ایجاد شده همچنان حفظ می‌گردد. این تأخیر موج موجب تغییر فازی می‌شود که می‌توان آن را تحت عنوان اجزاء طول موج اندازه‌گیری کرد. تغییر فاز به نسبت مستقیمی با اختلاف ضریب شکست جسم و محیطی که آن را احاطه کرده است و ضخامت جسم مورد بررسی افزایش می‌یابد (شکل ۴-۱۳ B).

برای روشن‌شدن طرز عمل یک میکروسکوپ فاز متضاد، قبلاً بایستی وضع یک شعاع نورانی را که از جسم کوچک شفافی با ضریب شکست تقریباً مشابه با محیطی می‌گذرد بررسی کرد (چنین وضعی در مورد سلول‌های زنده صدق می‌کند). این جسم به هر حال مانعی برای عبور شعاع نورانی خواهد بود. بخشی از شعاع نورانی، بدون پراش از جسم می‌گذرد، e و d شدت و طول موجش تغییری نمی‌کند. بخش دیگری از همین شعاع نورانی (موج D در شکل ۴-۱۳ B) تفرق پیدا می‌کند و نسبت به شعاع‌هایی که از جسم نمی‌گذرد (موج S در شکل ۴-۱۳ B) انحرافی پیدا می‌کند.

1- Interference microscope

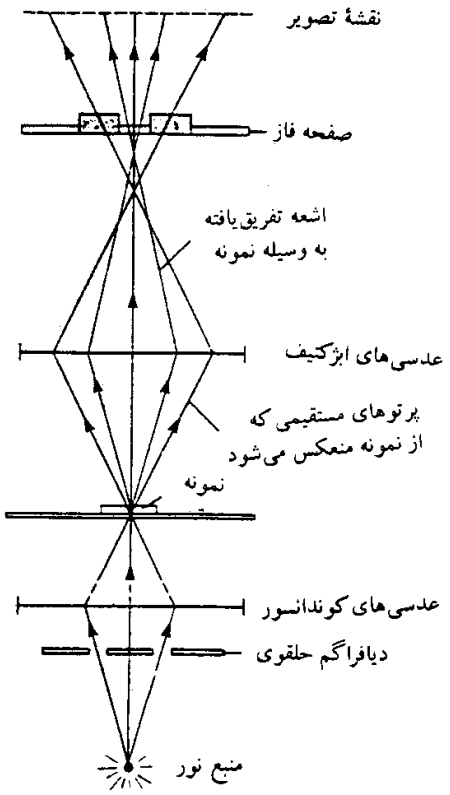
قابل توجه است ذکر کنیم که در مورد مواد زیستی، اختلاف فاز موجود بین امواج S و D تقریباً $\frac{1}{4}$ طول موج ($\frac{\lambda}{4}$) است (شکل ۴-۱۳ B).

این دو شعاع نورانی (D,S) وارد عدسی ابژکتیف شده و تداخل پیدا می‌کنند. شعاعی که از این تداخل نتیجه می‌شود دارای طول موج و دامنه‌ای یکسان با موجی است که از محیط می‌گذرد، امانسبت به آن تأخیر یا تغییر فاز مختصری دارد. این تأخیر برای ایجاد تغییر دامنه به آن حد که با میکروسکوپ نوری معمولی قابل تشخیص باشد نیست و حتی در میکروسکوپ نوری معمولی نیز چنین پدیده‌ای صورت می‌گیرد.

میکروسکوپ فاز متضاد که به وسیلهٔ زرنیک[1] در ۱۹۳۴ ابداع شد، امکان می‌دهد که اختلاف فازهای کوچک را تشدید کرده (و بنابراین شدت آنها را زیاد کنیم) و در نتیجه تشخیص آنها به وسیلهٔ چشم یا صفحه عکاسی را امکان‌پذیر سازیم. در میکروسکوپ فاز، جانبی‌ترین نوری که از ابژکتیف می‌گذرد، به اندازه $\frac{\lambda}{4}$ از نوری که از مرکز ابژکتیف عبور می‌کند، تأخیر یا تقدم فاز دارد.

به منظور ایجاد این اختلاف فاز، در سطح کانونی پشتی ابژکتیف، یک صفحه حلقوی فاز[2] و بعد در محل کوندانسور، یک دیافراگم حلقوی قرار داده می‌شود (شکل ۴-۱۴).

صفحه فاز، صفحه‌ای شفاف است که دارای یک برآمدگی یا یک گودی است، ابعاد و شکل آن با تصویر مستقیم کوندانسوری که در زیر پلاتین قرار گرفته است مطابقت دارد.



شکل ۴-۱۴. مسیر نور در میکروسکوپ فاز متضاد

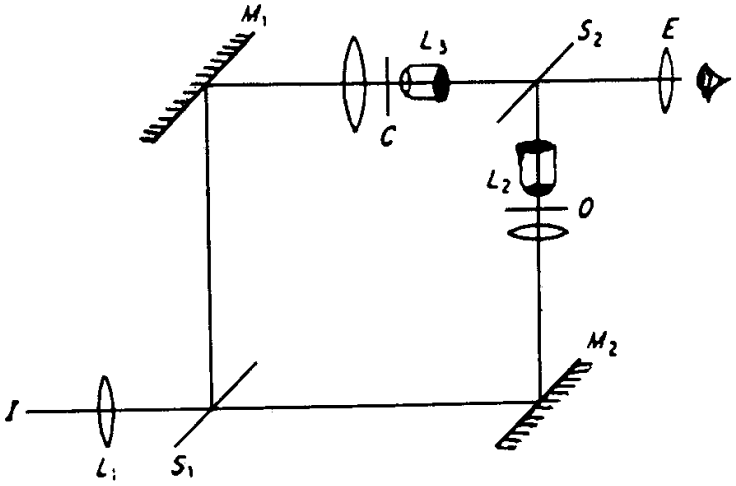
تضاد از تداخل بین تصویر هندسی مستقیمی که به وسیلهٔ بخش مرکزی ابژکتیف ساخته شده و تصویر جانبی تفرق یافته‌ای که به اندازه $\frac{\lambda}{4}$ تأخیر یا تقدم داشته است، صورت می‌گیرد. در حالت تضاد منفی (یا تضاد درخشنده)، انرژی دو دسته اشعه جمع می‌شود (شکل ۴-۱۴) و جسم خیلی روشن‌تر از زمینه به نظر می‌رسد. در حالت تضاد مثبت (یا تضاد تیره)، انرژی دو دسته اشعه از هم کم می‌شود (شکل ۴-۱۴) و در نتیجه تیره‌تر از زمینه دیده می‌شود. پدیده تداخل به منظور تشدید تغییرات جزئی فاز در محل (حد) ابژکتیف و تبدیل آن به تغییرات دامنه (شدت) است. با این روش، جسم شفاف به حسب ضخامتش و با اختلافی که از نظر ضریب شکستش با محیط دارد، به رنگ خاکستری دیده می‌شود.

میکروسکوپ تداخلی

میکوسکوپ تداخلی، از نظر طرز عمل اصول مشابهی با میکروسکوپ فاز متضاد دارد، با این برتری که به کمک آن اطلاعات کمّی (مقداری) را نیز می‌توان به‌دست آورد. به کمک این دستگاه می‌توان اختلاف فاز نوری ساختمان‌های مختلف سلولی را مشخص کرد، و در نتیجه وزن خشک نسبی آنها را سنجید. علاوه بر این، میکروسکوپ تداخلی امکان می‌دهد که تغییرات جزئی و ممتد (پیوسته) ضریب شکست را مشخص سازیم در

1- Zernike 2- Phase plate

حالی که میکروسکوپ فاز متضاد تنها ضریب شکست‌های ناپیوسته را آشکار می‌سازد. در میکروسکوپ تداخلی، تغییرات فاز به وسیلهٔ تغییرات رنگ و تا آن حد مشخص می‌شوند که سلول زنده ممکن است شبیه سلولی تثبیت و رنگ‌آمیزی شده به نظر برسد. شکل ۴-۱۵ طرحی از مجموعه نوری میکروسکوپ تداخلی را مشخص می‌سازد. نوری که به وسیلهٔ یک منبع واحد ایجاد شده به دو بخش تقسیم می‌گردد. یک دسته از شعاع‌های نورانی از جسم می‌گذرند و دسته دیگر بدون عبور از جسم وارد دستگاه می‌شوند.



شکـــــــل ۴-۱۵. طرح یک سیستم مطلوب از میکروسکوپ تداخلی، S_1 و S_2 سطوح آینه‌ای نیمه برگردان، M_1 و M_2 سطوح آینه‌ای تمام برگردان، L_2 و L_3 عدسی‌های میکروسکوپ، O جسم روی لام، C لام مقایسه یاکنترل

سپس این دو دسته اشعه همدیگر را تلاقی کرده و همانند آنچه در یک میکروسکوپ فاز متضاد صورت می‌گیرد تداخل پیدا می‌کنند. اشعه‌ای که از جسم عبور کرده و متحمل تغییر فازی شده، نسبت به اشعه مستقیم، دارای تأخیر می‌شود. مانند آنچه که در یک میکروسکوپ پلاریزان صورت می‌گیرد، این تأخیر (r) بـه ضـخامت جسـم (t) و اختلافی که بین ضریب شکست جسم (n_o) و ضریب شکست محیط (n_m) وجود دارد وابسته است، به‌طوری که:

$$n_o - n_m = \frac{r}{t}$$

و به این ترتیب وقتی مقدار n_m مشخص باشد، می‌توان مقدار n_o (ضریب شکست جسم) را به‌دست آورد.

با میکروسکوپ تداخلی می‌توان ضخامت جسم (t)، تراکمش از ماده خشک و مقدار آب آن را همزمان با هم و با اندازه‌گیری‌های پیوستهٔ (پشت سرهم) اختلاف فاز نوری در دو محیط که ضریب شکست آنها مشـخص است، اندازه‌گیری کرد.

میکروسکوپ زمینه تاریک[1]

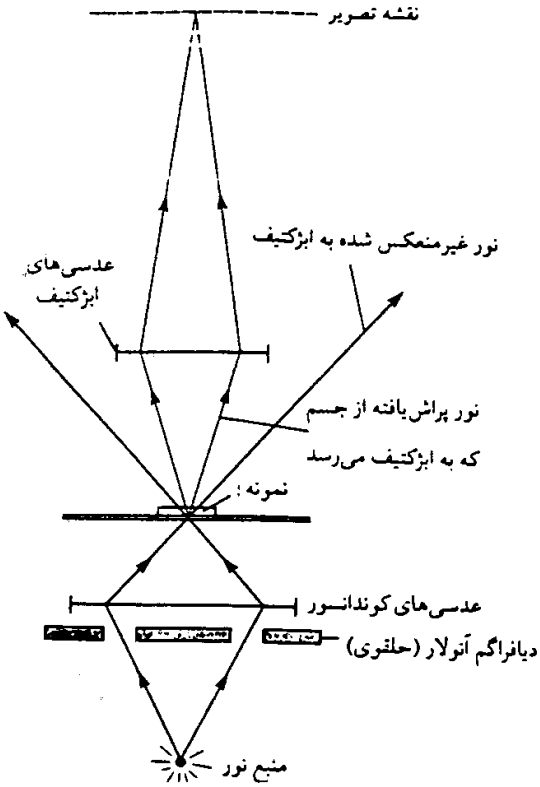
اساس ساختمان این میکروسکوپ همانند یک میکروسکوپ نوری معمولی است با این تفاوت که دیافراگـم کوندانسور آن به نحوی ساخته شده که بخش میانی آن غیرشفاف و مانع عبور پرتوهای نوری مرکزی است و نور تنها از کناره‌های دیافراگم و به‌طور مایل به جسم می‌تابد (شکل ۴-۱۶).

با استفاده از این دیافراگم: الف - زمینه رؤیت میکروسکوپ تاریک می‌شود. ب - از پرتوهای محیطی که به‌طور مـایل بـه جسـم مـی‌تابد، تـنها بـخش پـراش یـافته بـه وسـیلهٔ سـطح جسـم وارد ابـژکتیف مـی‌شود و تـصویر

1- Dark field microscope

را به وجود می‌آورد. هیچ پرتوی که مستقیماً از جسم بگذرد، وارد ابژکتیف نخواهد شد (شکل ۴-۱۶).

با میکروسکوپ زمینه تاریک می‌توان برخی از ساختمان‌هایی را که ابعادشان پایین‌تر از حد دید میکروسکوپ نوری معمولی است رؤیت یا عکس‌برداری کرد، (اولترامیکروسکوپی[1]). بدیهی است، کاربرد این میکروسکوپ، بیشتر برای مطالعات ریخت‌شناسی و برخی حرکات سلولی یا اندامک‌های سلولی است. چون پرتوها در رسیدن به سطح جسم پراش می‌یابند، بنابراین جزئیات ساختمان درونی سلول یا اندامک‌های آن مشخص نخواهد شد. در سلول‌های کشت شده که با میکروسکوپ زمینه تاریک بررسی می‌شوند، هستک، پوشش هسته، میتوکندری‌ها و ذرّات لیپیدی، درخشان به نظر می‌رسند، در حالی که زمینه سیتوپلاسم تیره می‌ماند.



شکل ۴-۱۶. مسیر نور در میکروسکوپ زمینه تاریک

میکروسکوپ پلاریزان[2]

برای بررسی ساختمان‌های زیستی آنیزوتروپ[3] (وقتی تراکم اتم‌ها و مولکول‌های تشکیل دهنده جسمی در جهات مختلف آن ناهمگن باشد، جسم را آنیزوتروپ نامند) که خاصیت انکسار مضاعف نور را دارند، مثل سلول‌های عضلانی، فیبرهای کلاژن، فیبرها در گیاهان و مانند آن از میکروسکوپ پلاریزان استفاده می‌شود.

میکروسکوپ پلاریزان دارای دو قطعه مخصوص است که آنها را قطبی‌کننده[4] و تجزیه‌کننده[5] نامند. این دو قطعه ممکن است از یک لایه فیلم پلاروید یا از یک منشور نیکل[6] ساخته شده باشند. قطبی‌کننده در زیر کوندانسور قرار گرفته و نور قطبی شده را به خط مستقیم به جسم می‌فرستد.

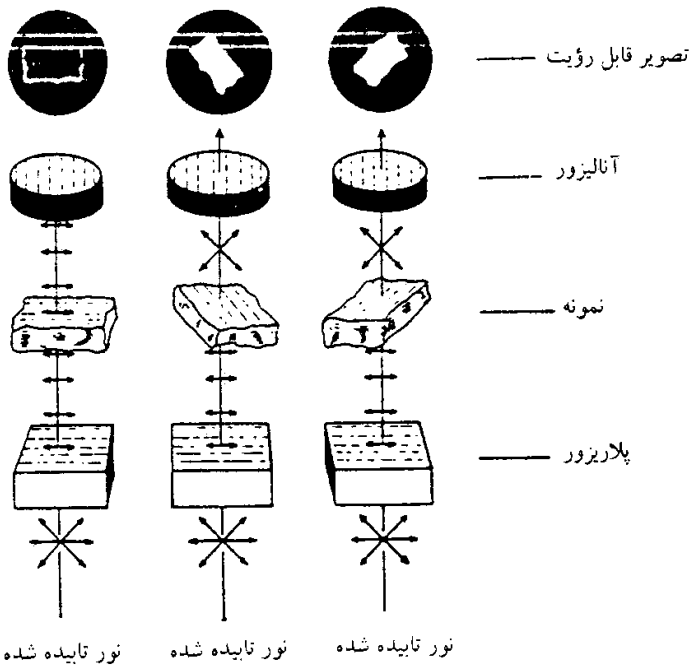
تجزیه‌کننده، در لوله میکروسکوپ و در بالای عدسی ابژکتیف قرار دارد. با جابه‌جا کردن تجزیه‌کننده می‌توان سطح یا جهت قطبیت آن را به جهت قطبیت پلاریزور تغییر داد.

وقتی تجزیه‌کننده به اندازه ۳۶۰ درجه چرخانده شود، میدان دید میکروسکوپ در هر چرخش ۱۸۰ درجه‌ای به تناوب، روشن و تیره می‌گردد. اگر سطح قطبیت آنالیزور و پلاریزور موازی باشد، حداکثر مقدار نور وارد ابژکتیف می‌شود و میدان دید روشن می‌گردد (شکل ۴-۱۷ ب و ج). برعکس وقتی سطح قطبیت آنالیزور عمود بر سطح قطبیت پلاریزور، قرار گیرد هیچ نوری وارد ابژکتیف نمی‌شود و میدان دید تاریک است (شکل ۴-۱۷ الف).

اگر روی پلاتین میکروسکوپ (که در میکروسکوپ پلاریزان، چرخان است)، نمونه‌ای قرار دهیم که قدرت انکسار مضاعف نور را داشته باشد (وقتی جسم مورد بررسی آنیزوتروپ باشد، سرعت انتشار نور پلاریزه، به حسب جهت انتشار تغییر می‌کند. چنین جسمی را دارای انکسار مضاعف نور گویند، زیرا دارای دو ضریب انکسار مختلف

1- Ultramicroscopy 2- Polarizing microscope 3- Anisotrope 4- Polarizer
5- Analizor 6- Nicol pyramid

است که به‌طور نسبی با سرعت‌های مختلف انتقال نور از آن مطابقت می‌کند) جهت قطبیت به حسب تأخیری که به وسیلهٔ جسم ایجاد می‌شود منحرف خواهد شد. حالت متداول کار با یک میکروسکوپ پلاریزان بر این بناست که نمونه را به اندازه‌ای بچرخانیم که، در میدان دید میکروسکوپ، نقاط روشنایی ماکزیمم و می‌نیمم به‌دست آیند. وقتی محور قطبیت جسم مورد بررسی، زاویه ۴۵± درجه بامحورهای پلاریزور و آنالیزور بسازد، روشنایی ماکزیمم حاصل می‌شود.



شکل ۴-۱۷. مسیر نور در میکروسکوپ پلاریزان

روش‌های پیشرفته میکروسکوپی با نور پلاریزه که فعلاً مورد استفاده است، امکان می‌دهد که تأخیرهای حدود یک آنگستروم طول موج را اندازه‌گیری کرده و به توان تفکیک $۰/۳\mu$ برسیم. از آن جا که پدیده انکسار مضاعف وابسته به اختصاصات ساختمانی است که پایین‌تر از طول موج نور معمولی قرار می‌گیرند، میکروسکوپی با نور پلاریزه، به‌طور غیرمستقیم به منظور برخی تحلیل‌های فراساختمانی سلول به کار می‌رود.

امروزه بررسی‌های فراساختمانی سلول‌ها و اندامک‌های سلولی، با میکروسکوپ‌های الکترونی انجام می‌شود.

میکروسکوپ با پرتوهای فرابنفش[1]

علاوه‌بر میکروسکوپ‌هایی که با پرتوهای نوری مرئی کار می‌کنند، میکروسکوپ‌هایی را هم که با پرتوهای فرابنفش (با طول موج‌های نزدیک به پرتوهای نوری) به کار گرفته می‌شوند، جزء میکروسکوپ‌های نوری به حساب می‌آورند. در این بحث پس از توضیح کلی پرتوهای فرابنفش و پدیده فلوئور سانس، به بررسی مختصری در مورد کاربرد این نوع میکروسکوپ‌ها می‌پردازیم.

پرتوهای فرابنفش از پرتوهای دارای طول موج کوتاه (λ از ۱۵۰ A° تا ۲۵۰ A°) هستند که با چشم انسان قابل رؤیت نمی‌باشند. این پرتوها را به حسب میزان طول موجشان به پرتوهای فرابنفش نزدیک λ = ۲۵۰ A و فرابنفش دور λ = ۱۵۰ A تقسیم می‌کنند.

با توجه به فرمول آبه[2] در مورد توان تفکیک میکروسکوپ‌ها $\sum = \frac{۰/۶۱\lambda}{N}$ که قبلاً مورد بحث قرار گرفت، استفاده از پرتوهای فرابنفش که طول موج کوتاه‌تری از پرتوهای مرئی دارند، توان تفکیک میکروسکوپ را بهبود می‌بخشد و به همین دلیل میکروسکوپ‌های فرابنفش در سال‌های اخیر کاربرد وسیعی در بررسی‌های سلول‌شناسی و به ویژه بررسی‌های به حالت فلوئورسانس و ایمونوفلوئورسانس پیدا کرده‌اند. لازم به یادآوری است که پرتوهای فرابنفش به‌طور کلی مخرّب و کشنده سلول‌های زنده، اندامک‌ها و اجزای سلولی هستند به همین جهت بیشتر از

1- Ultraviolat Microscope 2- Abbé

آنها در ایجاد فلوئورسانس و در روش‌های ایمونوسیتوشیمی استفاده می‌شود.

وقتی برخی اتم‌ها به وسیله محرکی از جمله پرتوهای دارای طول موج کوتاه مثل پرتو بنفش تحریک شود ممکن است الکترون‌ها تحریک و پرانرژی شده از مدار خود خارج شوند، به‌طور بدیهی نیروی جاذبه هسته اتم از فرار الکترون ممانعت خواهد کرد. برای آن‌که الکترون‌های تحریک شده بتوانند به مدار خود بازگردند بایستی مقداری از انرژی را که گرفته‌اند، از دست بدهند، چنانچه انرژی از دست داده شده به حدّ طول موج‌های مرئی برسد، پدیدهٔ فلوئورسانس صورت گرفته و جسم (اتم یا مجموعه اتم‌ها) فلوئورسان شده است. این فلوئورسانس را فلوئورسانس اولیه نامند. برای مثال برخی ترکیبات از مشتقات لیپیدی، موم‌ها و یا کرتین‌ها فلوئورسانس اولیه دارند و با تابش پرتوهای فرابنفش به آنها روشنایی قابل رؤیتی ایجاد می‌کنند. اما اغلب ترکیبات سلولی فلوئورسانس اولیه ندارند، در این حالت برای درخشان کردن آنها از ترکیبات رنگی مختلفی به اسم فلوئوروکروم‌ها[1] استفاده می‌شود. وقتی جسمی با کمک فلوئوروکروم‌ها و تحت تأثیر پرتوهای فرابنفش درخشان شود «فلوئورسانس ثانویه» ایجاد شده است. مهم‌ترین این «رنگ‌کننده‌های فلوئورسان» عبارتند از آبی آنیلین که کالوز را تحت تابش پرتوهای فرابنفش به رنگ سبز درخشان درمی‌آورد، «نارنجی آکریدین[2]» ترکیبات چوبی را قرمز درخشان می‌کند. رنگ‌هایی مثل تریپافلاوین[3]، سولفات بربرین[4] و شلیدونین[5] نیز از فلوئورکروم‌ها هستند.

نکته قابل توجه این است که به حسب نوع جسم، نوع فلوئوروکروم و طول موج پرتوهایی که به جسم تابانیده می‌شود، نوع و شدت فلوئورسانس متفاوت است و به همین دلیل می‌توان ترکیب‌های مختلف سلولی را با رنگ‌های فلوئورسان‌کننده اختصاصی و نوع فلوئورسانسشان جایابی و شناسایی کرد. هم‌اکنون به منظور تشخیص اجزای اسکلت سلولی، گیرنده‌های سطح سلول‌ها، تشخیص پادگن‌ها و پادتن‌ها و حتی تشخیص‌های دقیق در آسیب‌شناسی از میکروسکوپ‌های فرابنفش و ایجاد حالت فلوئورسانس به کمک آنها، استفاده گسترده‌ای می‌شود.

اساس ساختمان میکروسکوپ فرابنفش و میکروسکوپ فلوئورسانس شبیه میکروسکوپ نوری معمولی است با این تفاوت که به جای لامپ معمولی، پرتوهای فرابنفش به کمک لامپ جیوه مخصوصی پس از رسیدن به گرمای مناسب تأمین می‌شود. به‌علاوه عدسی‌ها از نوع کوارتز هستند. به منظور جلوگیری از تابش پرتوهای فرابنفش به چشم شخص بیننده، در مسیر پرتوها پس از تابش آنها به جسم و ایجاد حالت فلوئورسانس، فیلترهایی قرار می‌دهند که از عبور پرتوهای فرابنفش جلوگیری می‌کند. در نمونه‌های جدید این میکروسکوپ‌ها به منظور رعایت ایمنی بیشتر و نیز افزایش توان کاری میکروسکوپ، پرتوهای فرابنفش از بالا و از درون لوله ابژکتیفی مخصوص کناری، به‌طور مایل به جسم تابانیده می‌شود با این ترتیب، تنها پرتوهای پراش یافته (بازتاب) از جسم وارد مسیر نوری میکروسکوپ شده و در نهایت و پس از عبور از فیلترها به چشم می‌رسند.

میکروسکوپ الکترونی[6]

پس از جنگ جهانی دوم، استفاده از میکروسکوپ الکترونی و کاربرد آن برای بررسی برش‌های بسیار نازک یاخته‌ها امکان پیشرفت‌های شگرفی را به زیست‌شناسی سلولی داده و در موارد متعددی مفاهیمی را دگرگون ساخته است که گمان می‌رفته پی‌ریزی استواری داشته باشند.

دیدیم که توان تفکیک میکروسکوپ وابسته به طول موج نور به کار رفته است. استفاده از پرتوهای فرابنفش

1- Fluorochromes 2- Acridine orange 3- Tripaflavine 4- Berberine Sulfate
5- Chelidonine 6- Electron Microscope (E.M.)

حداکثر درشت‌نمایی حدود ۳۰۰۰ برابر را ممکن ساخت ولی امید نمی‌رفت که با استفاده از پرتوهای دارای طول موج کوتاه‌تر بتوان از این حدّ گذشت.

الف: اساس.

حدود سال‌های ۱۹۲۴، ل. دوبروگلی[1] نشان داد که پرتوهای الکترونی طول موج بسیار کوتاه (λ = ۰/۰۵A°) دارند. بوش[2] در سال ۱۹۲۶ نشان داد که یک میدان الکتریکی یا مغناطیسی مناسب، پرتوهای الکترونی را در کانون متمرکز می‌کند (همانند اثر عدسی‌های شیشه‌ای بر پرتوهای نوری)، از اینجا تجسّم ایجاد میکروسکوپ الکترونی ممکن گردید.

در هر دو نوع میکروسکوپ نوری و الکترونی منبع پرتوها، رشته‌ای از تنگستن ملتهب شده به وسیله جریان الکتریکی است. در میکروسکوپ نوری، پرتوهای نوری ایجاد شده از چنین رشته‌ای به وسیله کوندانسور بر روی نمونه مورد مطالعه متمرکز می‌شوند. در میکروسکوپ الکترونی، الکترون‌های رها شده از اتم‌های تنگستن تهییج شده را به‌صورت یک ستون یا دستهٔ الکترونی[3] و با استفاده از الکترودها به طرف نمونهٔ مورد مطالعه شتاب می‌دهیم. چون جرم الکترون‌ها بسیار ناچیز و قابل صرف‌نظر کردن است، برای جلوگیری از انحراف آنها در برخورد با ذرات و مواد موجود در هوا، در مسیر عبور الکترون‌ها در لوله میکروسکوپ خلاء برقرار می‌شود. در میکروسکوپ‌های نوری به وسیله کوندانسور، پرتوها (دسته الکترونی) همگرا شده و به نمونه تابانیده می‌شوند. عدسی‌های کوندانسور، ابژکتیف‌ها و پروژکتور به جای عدسی‌های شیشه‌ای از نوع بوبین‌های الکترومغناطیسی بسیار دقیقی هستند که همانند عدسی‌های همگرا در میکروسکوپ‌های نوری عمل می‌کنند.

چون پرتوهای الکترونی طول موج بسیار کوتاه‌تری از پرتوهای نوری دارند (۰/۰۵ A° در برابر حدود متوسط ۵۰۰۰ A°)، بنابراین قدرت تفکیک میکروسکوپ الکترونی تا حد بسیار زیادی بهتر از میکروسکوپ‌های نوری است به‌طوری که در میکروسکوپ‌های نوری، با عدسی‌های خشک توان تفکیک حدود ۲۰۰۰ A°، با حالت ایمرسیون حدود ۱۸۰۰ A°، در میکروسکوپ‌های فرابنفش حدود ۶۰۰ A° و در میکروسکوپ‌های الکترونی از نظر تئوری تا ۱۰۰۰۰ برابر بهتر از میکروسکوپ‌های نوری یعنی حدود ۱ تا ۲ A° است اما مشکلات و خطاها در ساخت بوبین‌های الکترومغناطیسی که به‌عنوان عدسی‌های میکروسکوپ‌های الکترونی به کار گرفته می‌شوند، مشکلات آماده‌سازی نمونه، کنتراست و آسیب‌های وارد شده به نمونه از پرتوها، توان تفکیک را تا حدود ۱۰ تا ۲۰ A° می‌رساند که به هر حال در مقایسه با میکروسکوپ نوری، بسیار بهتر است.

چون در میکروسکوپ‌های نوری فاصله کانونی عدسی‌ها ثابت است، عمل تنظیم میکروسکوپ به وسیله جابه‌جا کردن عدسی‌های شیئی (ابژکتیف‌ها) و تغییر فاصله بین عدسی و نمونه انجام می‌شود. در میکروسکوپ‌های الکترونی، تنظیم به وسیله تغییر دادن ولتاژی که به عدسی‌های الکترومغناطیسی (بوبین‌ها) می‌رسد، صورت می‌گیرد. این تغییر ولتاژ، میدان مغناطیسی را که الکترون‌ها باید از آن عبور کنند، تغییر می‌دهد.

با تکیه بر اصول بنیادی که شرح داده شد یعنی استفاده از پرتوهای الکترونی با طول موج بسیار کوتاه به جای پرتوهای نوری، تهیه و به کارگیری بوبین‌های القایی دقیق (عدسی‌های الکترومغناطیسی) به جای عدسی‌های شیشه‌ای، تأمین خلاء قوی در لوله میکروسکوپ برای عبور الکترون‌ها و به کارگیری اختلاف پتانسیل‌های زیادی بین کاتد و آند برای پرتاب الکترون‌ها به مقدار کافی از رشته تنگستن (کاتد) و ایجاد شتاب حرکتی زیاد آنها، روسکا[4]

1- L.De Brogli 2- Busch 3- Electron beam 4- Ruska

و نول[1] در ۱۹۳۱ در برلین، اولین میکروسکوپ الکترونی را ساختند. سپس به مرور زمان، میکروسکوپ‌های الکترونی متنوع و تکمیل شد و هم‌اکنون انواع مختلف و بسیار پیشرفته‌ای از آنها مثل میکروسکوپ‌های الکترونی گذاره[2] (T.E.M.)، نگاره[3] (S.E.M.)، فشار قوی یا میکروسکوپ الکترونی با ولتاژ زیاد[4] (H.V.E.M.)، STEM در زیست‌شناسی سلولی کاربردهای گسترده‌ای دارند. از سال ۱۹۵۵ به بعد با بهبود فنون تثبیت سلول‌ها، برش‌گیری از نمونه‌های اشباع شده از رزین‌ها مثل اپوکسی[5]، ابداع اولترامیکروتوم برای تهیه برش‌های بسیار نازک به وسیله پورتر - بلوم[6]، امکانات وسیعی را برای بررسی‌های دقیق ساختمان سلول‌ها، اندامک‌ها و اجزای ساختمانی آنها به‌دست داد. پیشرفت روش‌های شیمی سلولی و آنزیم‌شناسی سلولی، روش‌های افزایش کنتر است (رنگ‌آمیزی)، فن استفاده از تثبیت نمونه‌ها به وسیله انجماد سریع آنها[7] که در سال ۱۹۶۳ ابداع شد، آگاهی‌های زیادی را از ساخت و کار اندامک‌ها و غشاءهای سلولی به همراه آورد. ابداع میکروسکوپ الکترونی نگاره از سال ۱۹۶۷ و به کارگیری میکروسکوپ‌های الکترونی با ولتاژ زیاد (۱ تا ۴ میلیون ولت)، تکمیل و تنوع میکروسکوپ‌های الکترونی و ابزار و روش‌های مورد استفاده در میکروسکوپی الکترونی، کمک شایان توجهی به پیشرفت آگاهی‌ها و بینش‌ها در مورد سلول و زیست‌شناسی سلولی نمود.

به منظور اشنایی با اساس ساختمان و کاربرد انواع میکروسکوپ‌های الکترونی که در زیست‌شناسی سلولی مورد استفاده بیشتری دارند به شرح مختصر هرکدام می‌پردازیم.

۱- میکروسکوپ الکترونی گذاره (T.E.M.): این میکروسکوپ دارای لوله یا ستون فولادی محکمی به طول حدود ۰/۷۵ تا ۲ متر و قطر حدود ۳۰ تا ۵۰ سانتیمتر است. در قسمت بالای لوله محفظه‌ای به اسم اطاق الکترون[8] وجود دارد. در قسمت بالای اطاق الکترون یک رشته مقاوم از تنگستن به اسم کاتد روی پایه‌ای عایق سوار شده است. روبروی کاتد، آند به‌صورت صفحه بشقاب مانندی آغشته به املاح پتاسیم قرار دارد. بین کاتد و آند اختلاف پتانسیلی بین حدود ۵۰۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰ ولت برقرار می‌شود. با این اختلاف پتانسیل الکترون‌ها با بشقاب زیاد از کاتد پرتاب شود از سوراخ میانی آند که در حکم دیافراگم و قابل تنظیم است عبور کرده به‌صورت یک دسته الکترونی به درون لوله میکروسکوپ فرستاده می‌شوند و به مقابل کوندانسور (بوبین الکترومغناطیسی) می‌رسند. الکترون‌های کانونی شده به وسیله کوندانسور در لوله میکروسکوپ با شتاب زیاد به جسم یا نمونه می‌رسند.نمونه که اساساً برش‌های بسیار نازک سلول‌هایی است که از ترکیبات رزینی اشباع شده‌اند و بر روی صفحات مشبک و کوچک فلزی (مس یا طلا) به اسم گرید[9] قرار دارد به وسیلهٔ گیرهٔ سوراخ‌دار ویژه‌ای در مسیر الکترون‌ها قرار گرفته است. در برخورد دسته الکترونی با جسم، بخشی از الکترون‌ها پراش یافته از مسیر خارج می‌شوند، برخی از آنها به پرتو X تغییر ماهیت می‌دهند ولی چون برش بسیار نازک است و الکترون‌ها هم در خلاء درون لوله با شتاب زیادی به جسم می‌رسند، عده‌ای از الکترون‌ها از جسم می‌گذرند (الکترون‌های گذرنده[10])، همین الکترون‌ها در نهایت و پس از عبور از عدسی‌های الکترومغناطیسی به نام ابژکتیف و پروژکتور روی یک صفحه از جنس پلاتینوسیانوربایریم یا سولفید روی می‌تابند و آن را به حالت فلوئور سان درآورده و بدین ترتیب از جسم تصویر قابل رؤیتی می‌سازند. چون الکترون‌های گذرنده از جسم عامل تشکیل تصویر هستند این نوع میکروسکوپ را میکروسکوپ الکترونی گذاره نامند. این نوع میکروسکوپ دستگاه‌های ضمیمه‌ای هم دارد که عبارتند از:

1- Knol 2- Transmission Electron Microscope 3- Scanning Electron Microscope
4- High Voltage Electron Microscope 5- Epoxy 6- Porter - Blum 7- Freezeeching
8- Electron Car 9- gride 10- Transmited electrons

الف - دستگاه تغذیه الکتریکی[1] که عبارت از دستگاهی است که جریان ثابتی را بین ۵۰ تا حدود ۱۲۰ کیلوولت تأمین می‌کند.

ب - دستگاه‌های ایجاد خلاء که از دو سری پمپ خلاء درست شده‌است: پمپ اولیه یا پمپ چرخنده[2] که خلائی در حدود ۱ میلی‌متر جیوه ایجاد می‌کند و دیگری پمپ ثانوی یا پمپ نفوذی[3] که خلاء درون لوله میکروسکوپ را تا 10^{-7} میلیمتر جیوه می‌رساند.

ج - مجموعه وسایلی که می‌توانند جسم را درون لوله نگهدارند و حرکت دهند.

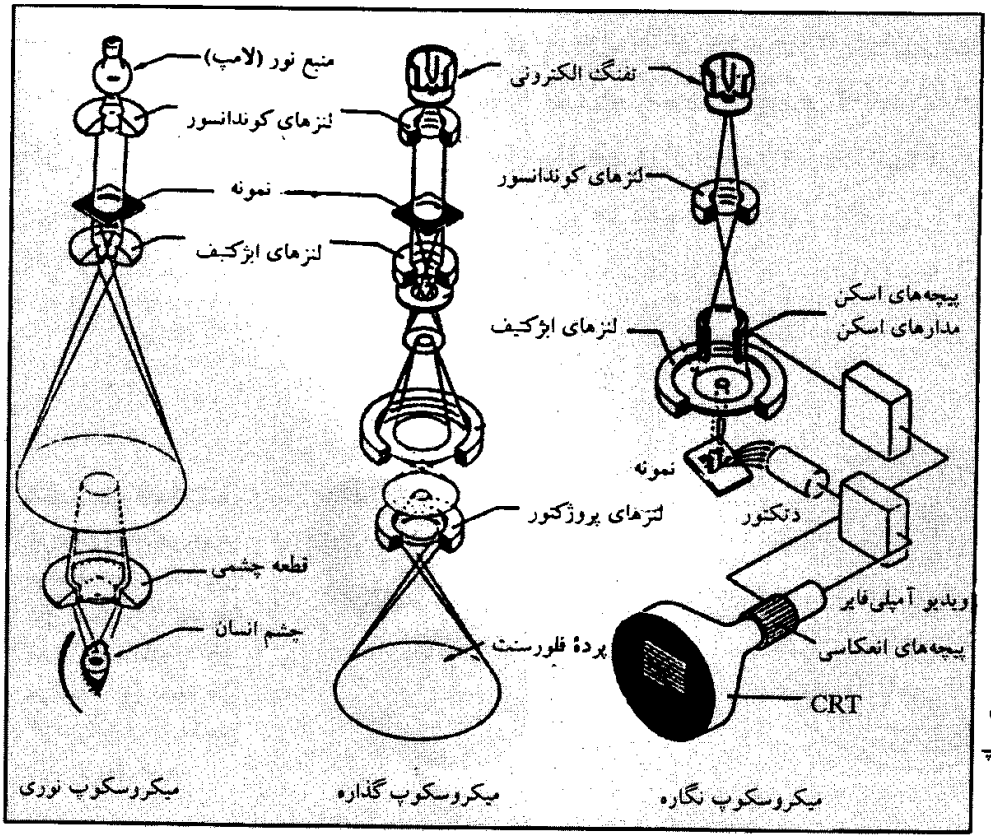
د - وسایل الکتریکی ضمیمه که در کنار لوله قرار دارند و می‌توانند شدت جریان را در بوبین‌ها تغییر دهند تا بزرگ‌نمایی تغییر کند یا تصویر تنظیم شود.

هـ- در کنار اتاقک پایین لوله یک سیستم اکولری (ذره بین) برای افزایش درشت‌نمایی و دقت مشاهده تصویر قرار دارد.

و - وسایل مربوط به عکس‌برداری از تصویر در مواقع لزوم

میکروسکوپ الکترونی گذاره درشت‌نمایی‌هایی از ۵۰،۰۰۰ تا ۱۰۰،۰۰۰ برابر را میسر می‌سازد و از راه بزرگ کردن تصویر می‌توان به درشت‌نمایی‌هایی تا ۵۰۰،۰۰۰ برابر و بیشتر نیز دست یافت. تصاویر گرفته شده با میکروسکوپ‌های الکترونی را فتومیکروگراف الکترونی نامند. توان تفکیک آن در عمل حدود ۲ تا ۴ A° است. شکل ۴-۱۸ مقایسه‌ای بین اساس میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی است و شکل ۴-۱۹ نمای عمومی یک میکروسکوپ الکترونی گذاره را نشان می‌دهد.

یکی از مسائل عمده در مشاهده نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی گذاره تهیه برش‌های بسیار نازکی است که



شکل ۴-۱۸. اساس میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی

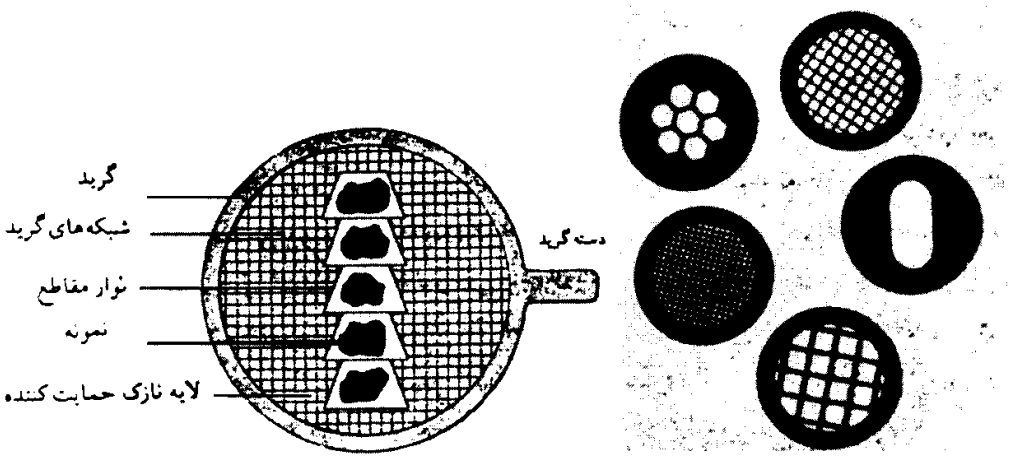
1- Power supply 2- Rotary Pump 3- Diffusion Pump

عده‌ای از الکترون‌ها می‌توانند از آن بگذرند این کار، طولانی و پر هزینه است و نیاز به دقت زیادی دارد. از طرفی چون تهیه برش‌ها به تثبیت قبلی نمونه‌ها، آب‌گیری از آنها و اشباع سازیشان از رزین‌ها نیاز دارد، پس مشاهده نمونه‌های زنده با این میکروسکوپ‌ها امکان‌پذیر نیست. همچنین شرایط خلاء درون لوله میکروسکوپ و گرمای بسیار زیاد ناشی از برخورد الکترون‌ها با نمونه‌ها هم از عواملی هستند که امکان مشاهده نمونه‌های زنده با میکروسکوپ گذاره را منتفی می‌سازند.

تهیه نمونه برای مطالعه و بررسی با میکروسکوپ الکترونی گذاره (T.E.M.)

تهیه نمونه‌های زیستی برای میکروسکوپ الکترونی گذاره نیاز به دستکاری‌های فیزیکی و شیمیایی زیادی دارد که شامل: ۱- ثابت کردن[1] ۲- آب‌گیری[2] ۳- قالب‌گیری[3] ۴- برش‌گیری[4] ۵- رنگ‌آمیزی[5] ۶- سوار کردن[6] برش‌ها است.

چون نمونه برای بررسی با .T.E.M در خلاء قرار می‌گیرند لذا طی مراحل متعددی باید خشک شوند. برای جلوگیری از تخریب، بافت مرطوب، به‌طور معمول توسط محلول‌های تثبیت‌کننده‌ای مانند گلوتارآلدئید یا فرمالدئید پیوندهایی را با پروتئین‌ها برقرار می‌کنند و آنها را به مولکول‌های مجاور خودشان متصل می‌سازند و سپس تترااکسیداسمیوم که با غشاء دو لایه و پروتئین‌های بافتی اتصال برقرار می‌کند، تثبیت می‌گردد. چون الکترون‌ها قدرت نفوذ بسیار کمی دارند لذا بایستی از نمونه‌های تثبیت شده برش‌های بسیار نازکی به ضخامت ۲۰۰ تا ۳۰۰ A° تهیه کرد. برش‌ها ابتدا یک رزین منومری را به ملایمت به بافت وارد می‌کنند تا یک بلوک جامد پلیمریزهٔ پلاستیکی ایجاد گردد. سپس توسط یک چاقوی شیشه‌ای و یا الماس تیز و توسط یک میکروتوم مخصوص (اولترامیکروتوم) برش زده و برش‌ها را روی یک شبکه به اسم گرید که اغلب از جنس مس و در بررسی‌های ویژه از طلا است قرار می‌دهند. تابش دسته الکترونی با شتاب زیاد در محل برخورد به نمونه گرمایی حدود ۵۰۰ °C ایجاد می‌کند. یکی از نقش‌های رزین‌ها علاوه بر فراهم کردن پایداری نمونه و امکان تهیه برش، حمایت از نمونه در برابر همین گرمای زیاد است. از طرفی چون برش‌ها بسیار نازک هستند در برخورد دسته الکترونی امکان پاره شدن آنها وجود دارد به همین دلیل برای پشتیبانی از نمونه، سطح گرید به وسیله غباری از کربن یا پوشش ویژه‌ای از مواد پلاستیک[7] پوشیده می‌شود (شکل ۴-۱۹).



شکل ۴-۱۹. a) گریدهای مختلفی که در میکروسکوپ الکترونی برای سوارکردن برش‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند **b)** نحوه قرار گرفتن نواری از مقاطع نازک بر روی گرید.

1- fixation 2- dehydration 3- embedding 4- sectioning 5- staining
6- mounting 7- Formvare

کنتراست در میکروسکوپ الکترونی به عدد اتمی در اتم‌های نمونه بستگی دارد. عدد اتمی بالاتر باعث پراکنده‌شدن الکترون‌های بیشتر و کنتراست زیادتر می‌شود. نمونه‌های زیستی اغلب از اتم‌های با عدد اتمی خیلی پائین مانند کربن، اکسیژن و هیدروژن تشکیل شده‌اند، لذا برای قابل مشاهده شدن نمونه بایستی مقاطع نازک را رنگ‌آمیزی کرد. این کار را توسط نمک‌های فلزات سنگین مانند سرب و اورانیوم انجام می‌دهند و با استفاده از ترکیب‌هایی مانند استات‌اورانیل، نیترات‌اورانیل و سیترات سرب، کنتراست نمونه‌ها را افزایش داده، آنها را به اصطلاح رنگ‌آمیزی می‌کنند تا مشاهده آنها بهتر صورت پذیرد.

براساس مقدار نمکی که هر قسمت از ترکیبات بافت دریافت کرده باشد، سایه روشن‌های متفاوتی ایجاد می‌گردد. به‌عنوان مثال مولکول‌های چربی‌تیره شده و غشاءهای سلولی را نشان می‌دهند. در برخی موارد می‌توان مولکول‌های خاصی را به‌طور اختصاصی در چنین برش‌هایی مشخص نمود به‌عنوان مثال برخی از آنزیم‌ها را می‌توان با قرار دادن مقطع در معرض سوبستراهایی که واکنش آنها با آنزیم منجر به رسوب گذاری یک مادهٔ متراکم (الکترون دنس) می‌گردد مشاهده نمود. همچنین می‌توان پادتن‌ها را با چنین آنزیم‌ها یا مولکول‌های متراکمی (نظیر فریتین که دارای آهن است) جفت نموده و برای تشخیص ماکرومولکول‌ها مورد استفاده قرار داد.

کاربردهای ویژهٔ T.E.M.

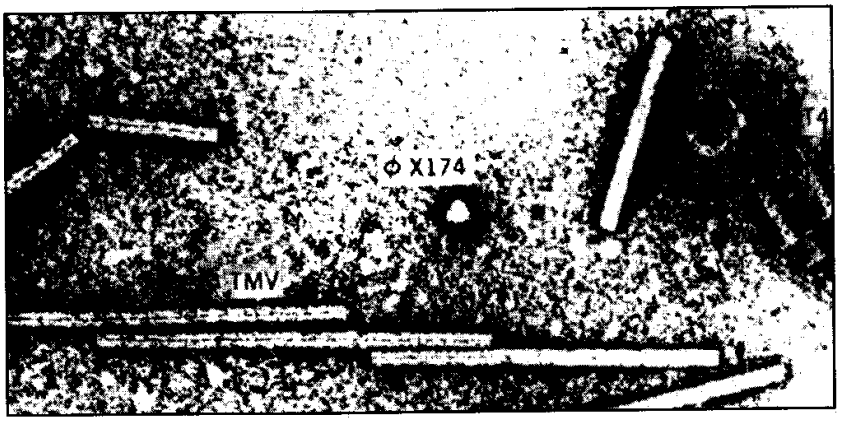
۱-سایه‌اندازی[1]: در این فن، نمونه (که معمولاً دارای ذرات کوچکی مانند ویروس‌ها یا ماکرومولکول‌ها بر روی سطح خود می‌باشد) را بر روی گرید که به وسیلهٔ لایه نازک پوشش داده شده است می‌گسترانیم و در محفظه خلاء قرار می‌دهیم با تبخیر پلاتین موجود در محفظه به وسیله حرارت، لایه نازکی از بخار فلز را با زاویه دقیقی بر روی نمونه رسوب می‌دهیم. فلز در قسمت جلویی ذرات موجود بر روی نمونه به‌صورت توده‌ای انباشته می‌شود در حالی که قسمت‌های عقبی ذرات، فاقد این پوشش ضخیم می‌باشند (قسمت جلو و عقب ذرات را نسبت به سمت و جهتی که از آن سو بخار فلز بر روی نمونه رسوب می‌نماید در نظر می‌گیریم).

زمانی که از نمونه‌های تهیه شده به وسیله این روش با میکروسکوپ الکترونی عکس تهیه نماییم و این عکس‌ها را به‌صورت معکوس چاپ کنیم (یعنی قسمت‌هایی که باید به‌صورت طبیعی در عکس تیره باشند را روشن ببینیم) مناطقی که در اثر رسوب بخار فلز نسبت به الکترون متراکم (الکترون دنس) می‌باشند، روشن به نظر می‌رسند. در صورتی که قسمت‌های عقبی ذرات که نسبت به الکترون شفاف[2] هستند به‌صورت سایه‌های تیره پدیدار می‌شوند.

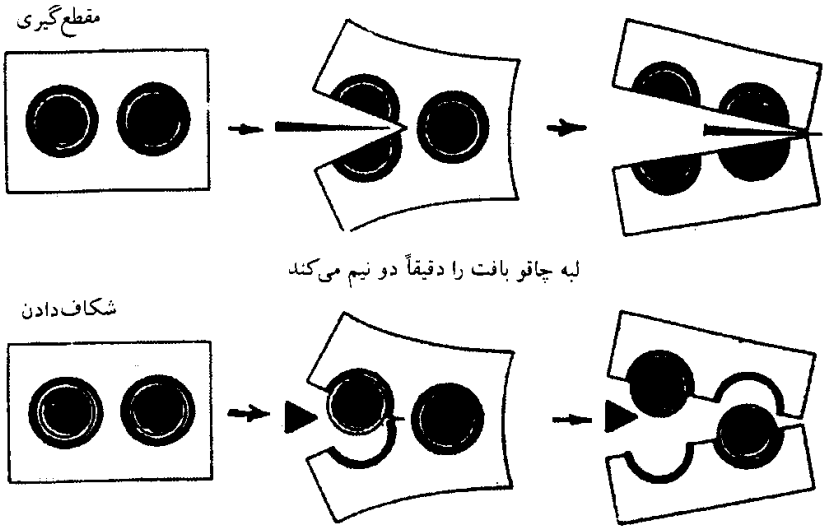
۲-رنگ‌آمیزی منفی[3]: در این فن نیز نمونه که دارای ذراتی نظیر ویروس‌ها و ماکرومولکول‌ها می‌باشد را با ماده‌ای متراکم نسبت به الکترون نظیر اسید فسفوتنگستیک بر روی گرید آغشته می‌نماییم. این عمل باعث نفوذ مادهٔ به کار برده شده در شکاف‌ها وسوراخ‌های ریز سطحی نمونه می‌شود. زمانی که محلول اضافی را از روی سطح گرید به وسیله کاغذ صافی جذب کنیم، ذرات نمونه به‌صورت نواحی روشنی (چون نسبت به الکترون شفاف می‌باشند بنابراین روشن به نظر می‌رسند) که در زمینه تاریک به خوبی مشخص هستند پدیدار می‌گردند (شکل ۴-۲۰).

۳-انجماد و شکاف دادن[4]: تفاوت عمده‌ای که بین شکاف دادن و برش‌گیری وجود دارد در شکل ۴-۲۱ به‌صورت نمایی نشان داده شده است.

1- Shadow casting 2- electron transparent 3- negative staining
4- Freez fracture



شکل ۴-۲۰. ویروس‌های موزائیک توتون (TMV)، T_4 و ϕ X ۱۷۴ که به وسیله فن رنگ‌آمیزی منفی تهیه شده‌اند



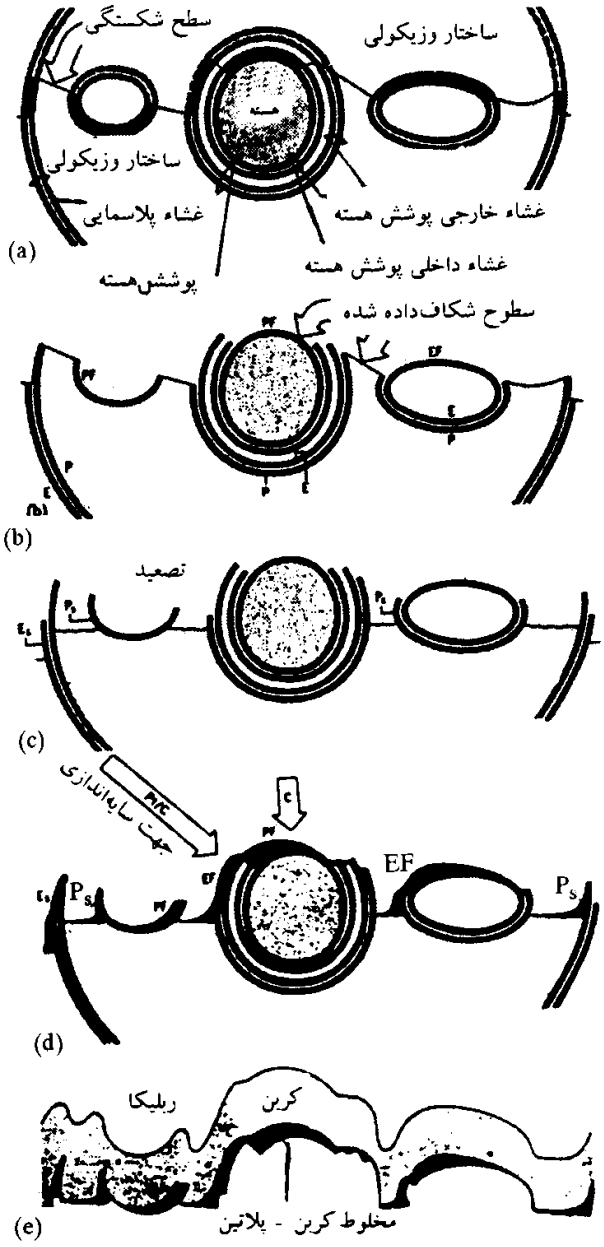
شکل ۴-۲۱. مقایسه برش‌گیری و شکاف‌دادن بافت

در فن شکاف دادن، بافت در راستای نقاط سستی که به‌طور طبیعی در هر یک از سلول‌ها وجود دارند ترک برمی‌دارد و باز می‌شود. این نقاط سست اغلب بین دو لایه لیپیدی که تمامی اندامک‌های محدود به غشاء را می‌پوشاند وجود دارند. برای این فن بافت را ابتدا به وسیله گلیسرول اشباع نموده و در دمای ۱۳۰ - درجه سانتیگراد در فرئون مایع منجمد می‌نمائیم. سپس بافت منجمد شده را به محفظه خلائی که دمای آن به وسیلهٔ ازت مایع در ۱۰۰ - درجه سانتیگراد تنظیم شده و میکروتومی با تیغه استیل در آن قرار دارد منتقل می‌نماییم. بافت به وسیلهٔ تیغه سردمیکروتوم شکاف داده می‌شود (شکل‌های ۴-۲۲ a و b) و زمانی که مسیر شکاف با غشاء اندامک‌های حفره‌ای (مانند هسته، میتوکندری، واکوئل و مانند آن) تلاقی نماید، غشاء در امتداد خط مرکزی خود (محلی که دنباله‌های غیرقطبی مولکول‌های لیپید روبروی یکدیگر قرار گرفته‌اند) شکسته شده و در نتیجه دو نیمه غشایی به وجود می‌آید که با حروف E (اول کلمه Exterior به معنی خارجی) و P (اول کلمه Protoplasmic) نشان داده می‌شوند (شکل ۴-۲۲).

یک سطح از هر کدام از این نیمه‌های غشایی سطح قبلی و اصلی غشاء است (سطوح E و P در شکل‌های c و d) و سطح دیگر، سطح تازه نمایان شده در اثر شکاف‌دادن می‌باشد (سطوح EF و PE در شکل‌های ۴-۲۲ c و d). سپس خلاء محفظه برای تصعید آب موجود بر روی سطح نمایان شده تا عمق چند صد آنگستروم به‌کار گرفته می‌شود. سطوح جدید غشایی که در اثر عمل تصعید نمایان می‌گردند را E_s و P_s می‌خوانند (شکل ۴-۲۲، c).

مخلوطی از کربن و پلاتین (pt/c) که نسبت به الکترون متراکم می‌باشند را بر روی سطوح نمایان شده با زاویه به خصوصی رسوب می‌دهیم که در نتیجهٔ این عمل قسمت‌های جلویی زوایدِ سطحی و همچنین حفره‌ها و

فرورفتگی‌های موجود توسط رسوب فلزی برجسته‌تر می‌گردند (شکل d). بر روی این لایه یک لایه اضافی از کربن که نسبت به الکترون شفاف می‌باشد نیز رسوب می‌دهیم. بافت سایه‌اندازی و پوشش داده شده را از محفظه خارج ساخته و خود بافت را به وسیله شناور ساختن در آب و یا حل‌کردن با بعضی از آنزیم‌ها و حلال‌ها از لایه‌هایی که بر روی آن رسوب داده‌ایم جدا می‌نماییم و بدین نحو فقط نسخه همانند یا رپلیکا[1] برجای خواهد ماند (شکل e) سپس این نسخهٔ همانند را پس از حذف قسمت‌های اضافی و اصلاح‌کردن بر روی گرید قرار داده و زیر میکروسکوپ الکترونی مطالعه می‌کنیم. شعاع‌های الکترونی به سهولت از ورای قسمت‌هایی از رپلیکا که دارای کربن می‌باشد عبور نموده ولی نواحی دارای پلاتین، الکترون‌ها را جذب می‌نمایند. تصاویر حاصل، که حالت سه بعدی دارند به نحو قابل ملاحظه‌ای با آنچه که از نمونه‌های مقطع‌گیری شده به‌دست می‌آیند، متفاوت هستند (شکل ۴-۲۳).



شکل ۴-۲۲. مراحل روش انجماد و شکاف‌دادن

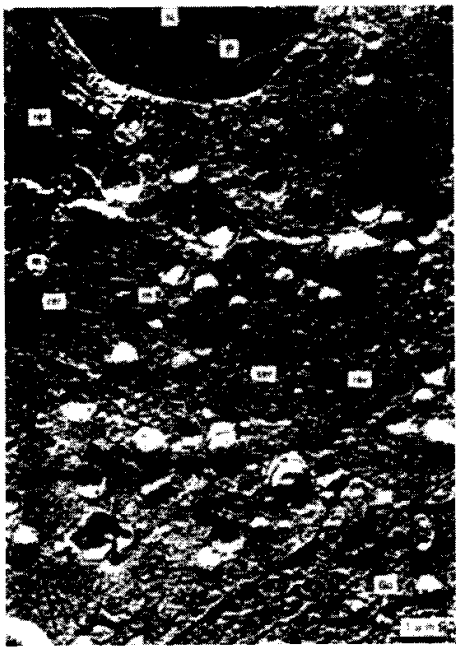
شکل a زاویه سایه‌اندازی که در تهیه رپلیکا استفاده شده، اغلب در فتومیکروگراف‌های حاصله مشخص می‌گردد (مانند سمت چپ پایین شکل b).

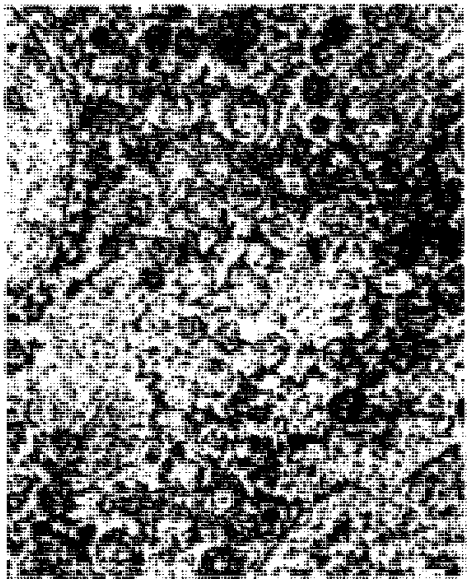
فتومیکروگراف‌ها، ضرورتاً باید در جهت زاویه سایه‌اندازی ملاحظه گردند زیرا در غیر این صورت فرورفتگی‌های سطح ممکن است به‌صورت برجستگی نمایان گردند و بالعکس. اهمیت زاویه نگرش در دو شکل ۴-۲۴ به خوبی مشهود می‌باشد. سرعت سردکردن نمونه قبل از شکاف دادن به نحو قابل ملاحظه‌ای بر روی کارآیی فن تأثیر دارد. نمونه بایستی بسیار سریع منجمد گردد به نحوی که آب موجود در آن از حالت بی‌شکل مایع به سرعت به حالت بی‌شکل جامد تبدیل شود و چیزی که یخ شبه شیشه‌ای[2] نامیده می‌شود تشکیل گردد. اگر انجماد به آهستگی صورت گیرد، آب به بلورهای یخ تبدیل می‌شود، که به خاطر ساختمان بلوری منظم خود، باعث تغییر شکل و از بین بردن اجزاء سلولی می‌گردند. به همین دلیل تلاش‌های اولیه در به کارگیری فن انجماد و شکاف دادن به خاطر به وجود آمدن بلورهای یخ نتایج مناسبی را دربر نداشتند.

میکروسکوپ الکترونی نگاره (S.E.M.)

این میکروسکوپ چندین سال پس از میکروسکوپ گذاره ساخته شد و در زیست‌شناسی سلولی برای

1- replica 2- Vitreousice

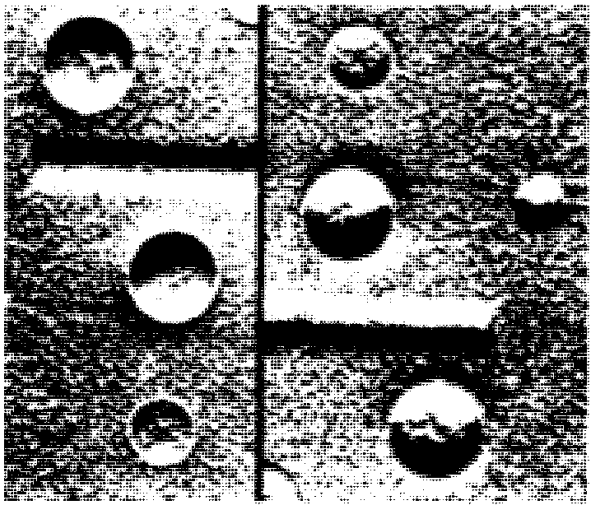




(a) (b)

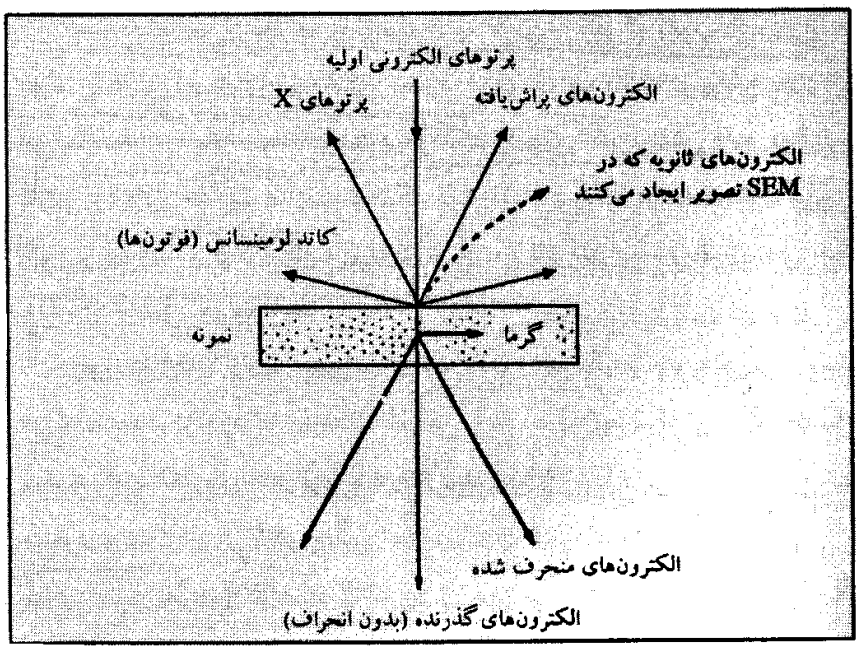
شکل ۴-۲۳. مقایسه فتومیکروگراف الکترونی که از یک ناحیه مشابه به وسیله برش‌گیری (a) و انجماد و شکاف‌دادن (b) تهیه شده‌اند. N (هسته)، Q، P، (منافذ)، RER (شبکه آندوپلاسمی خشن)، SER (شبکه آندوپلاسمی صاف)، GO(دستگاه گلژی)، M (میتوکندری)، Mb (میکروبادی)، Bc (مجرای صفراوی)، Gl (گلیکوژن). جهت یا زاویه سایه‌اندازی در قسمت پایین سمت چپ شکل به وسیلهٔ فلش نشان داده شده است.

بررسی‌های ریخت‌شناسی دقیق، مطالعه تزئینات سطوح نمونه‌ها با قدرت تشخیص زیاد به کار می‌رود. ستون و عدسی‌های کوندانسور و ابژکتیف، همچنین پمپ‌های این میکروسکوپ شبیه میکروسکوپ گذاره هستند. تفاوت اساسی آن با میکروسکوپ گذاره این است که در میکروسکوپ نگاره به جای الکترون‌های گذرنده[1] از جسم که انرژی زیادی دارند و در تشکیل تصویر به کار گرفته می‌شوند، از الکترون‌های پراش یافته از سطح جسم[2] و نیز الکترون‌هایی که در اثر تابش دسته الکترون‌های اولیه و تحریک سطح جسم، از سطح نمونه رها و پرتاب می‌شوند[3] و آنها را الکترون‌های ثانویه نامند (شکل ۴-۲۵) برای تشکیل تصویر استفاده می‌شود. تفاوت مهم دیگر این میکروسکوپ با میکروسکوپ گذاره در این است که جسم که در .T.E.M بر روی صفحهٔ فلوئورسان تشکیل می‌شد، در اینجا بر روی صفحه تلویزیونی تشکیل می‌شود. این میکروسکوپ با اختلاف پتانسیل کمتری نسبت به .T.E.M (بین ۱۰ تا ۳۰ کیلوولت و در برخی نمونه‌های جدید تا حدود ۷۰ کیلوولت) کار می‌کند. قدرت تشخیص آن حدود ۱۵ تا ۳۰ A° می‌باشد.



شکل ۴-۲۴. اهمیت دانستن جهت یا زاویه سایه‌اندازی. دو تصویر از فرورفتگی‌هایی که بر روی ماسه ایجاد گردیده در دو جهت متفاوت که با ۱۸۰ درجه با یکدیگر فرق می‌کنند دیده می‌شوند. در تصویر سمت چپ، فرورفتگی‌ها به وضوح نشان داده شده ولی در شکل سمت راست فرورفتگی‌ها به‌صورت برآمدگی به نظر می‌رسند.

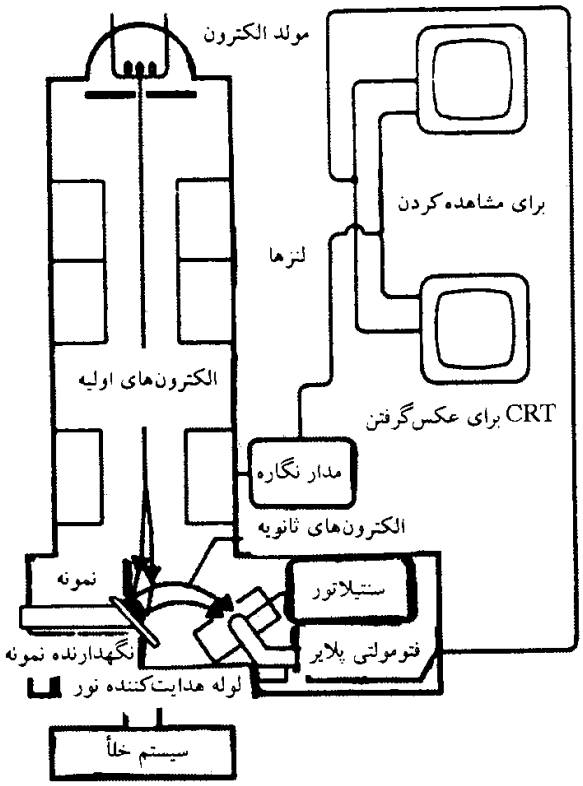
1- transmitted electrons 2- Bachscattered electrons 3- sexondary electrons



شکل ۴-۲۵. مقایسه الکترون‌های اولیه، ثانویه و الکترون‌هایی که در میکروسکوپ T.E.M برای تشکیل تصویر مورد استفاده قرار می‌گیرند.

اساس کار S.E.M.

چنانچه در شکل ۴-۲۶ ملاحظه می‌شود، الکترون‌های رها شده از سطح جسم که با انرژی کمی منتشر می‌شوند (الکترون‌های ثانویه) و نیز الکترون‌های پراش یافته در اثر برخورد الکترون‌های اولیه به جسم، به وسیله یک دتکتور[1] یا کولکتور[2] جذب می‌شوند و ایجاد نور یا فوتون‌ها را می‌کنند. این انرژی نورانی در نوعی مبدّل (فوتومولتی‌پلییر[3]) تبدیل به جریان الکتریکی می‌شود که به وسیله تقویت‌کننده (آمپلی‌فایر)، تقویت شده و سپس وارد یک یا دو لامپ تلویزیونی یا کاتدی (CRT[4]) می‌شود و تصویر سطح جسم را می‌سازد. از آنجا که الکترون‌ها پیوسته سطح جسم را جارو می‌کنند، نام این میکروسکوپ از این عمل گرفته شده است. شکل ۴-۲۶ نمایی از اساس ساختمان میکروسکوپ نگاره را نشان می‌دهد.



شکل ۴-۲۶. اساس ساختمان و کار میکروسکوپ نگاره

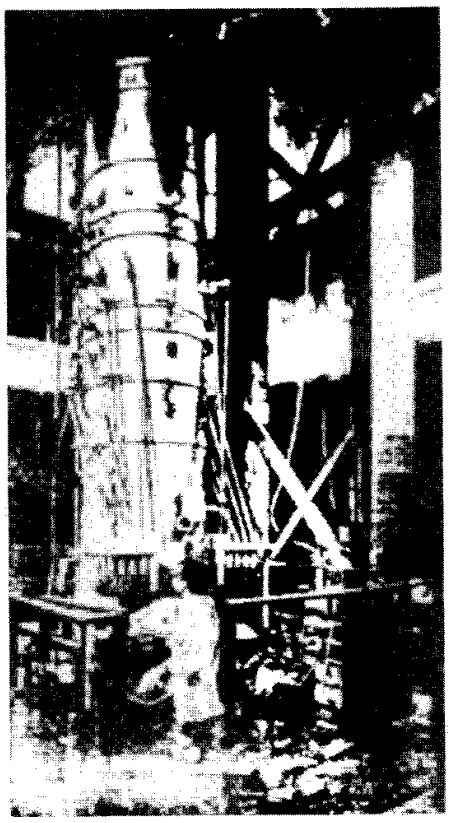
هم‌اکنون این نوع میکروسکوپ در بررسی‌های ریخت‌شناسی دقیق دانه‌های گرده، تزئینات سطحی و آرایش تزئینات سطح نمونه‌ها (دانه‌های گرده، دانه‌ها، هاگ‌ها و مانند آنها)، مطالعات ریخت‌شناسی مریستم‌ها، اندام‌های گل در مراحل مختلف نموشان، کاربردی وسیعی دارد و چون مشکلات و هزینه سنگین آماده سازی نمونه برای میکروسکوپ گذاره را ندارد (تهیه برش‌های بسیار نازک جسم ضرورت ندارد) کاربردهای آن گسترش سریعی دارد.

1- Detector 2- Collector 3- Photomultiplier 4- Catodic Ray Tube

نمونه‌های مورد مطالعه را ابتدا با لایه نازکی از فلز که اغلب آلیاژی از طلا و پلاتین است پوشش می‌دهند. این پوشش فلزی که دارای ضخامتی حدود ۱ نانومتر می‌باشد در پراش دادن الکترون‌هایی که به سطح نمونه برخورد می‌نمایند و در ایجاد تعداد بیشتری از الکترون‌های ثانویه نقش دارد. به این نکته باید توجه داشت که ضخامت لایه فلزی بر روی حداکثر قدرت تفکیک قابل دستیابی تأثیر مستقیم دارد. برای مثال اگر ضخامت پوشش فلزی ۱۰ نانومتر باشد، دو ذره‌ای که فاصله کمتر از ۲۰ نانومتر داشته باشند قابل تفکیک نیستند زیرا پوشش فلزی آنها را به یکدیگر متصل نموده است.

چون در SEM زاویه دید را با حرکت دادن و چرخانیدن نمونه می‌توان تغییر داد، بنابراین نماهایی از زوایای مختلف می‌توان به‌دست آورد که اطلاعات اضافی راجع به اندازه، شکل و دیگر اختصاصات نمونه در اختیار ما می‌گذارد.

میکروسکوپ الکترونی فشار قوی یا با ولتاژ زیاد (H.V.E.M.): این میکروسکوپ با اختلاف پتانسیل بسیار زیاد (۱ تا ۴ میلیون ولت) کار می‌کند. اساس ساختمان آن شبیه میکروسکوپ گذاره است اما طول لوله آن تا حدود ۱۲ متر می‌رسد. برتری عمده این میکروسکوپ آن است که به کمک آن می‌توان فراساختمان سلول‌های زنده را مشاهده کرد. سلول‌ها را در محیط طبیعی زیستشان یا در محیط‌های کشت، در ظرف‌های کوچک و مخصوص، در مسیر الکترون‌ها قرار می‌دهند. توان نفوذ الکترون‌ها که به علت اختلاف پتانسیل بسیار بالا بین کاتد و آند بسیار زیاد است موجب عبور الکترون‌ها از نمونه‌های به ضخامت چندین میکرون می‌شود و این وضع امکان مشاهده نمونه‌های زنده و معرفی حجمی فراساختمان سلول، اندامک‌ها و اجزای سلولی را به‌دست می‌دهد. همین توان نفوذ الکترون‌ها است که امکان استفاده از اطاقک‌های بدون خلاء و دارای نمونه‌های زنده را فراهم ساخته است. حدود ۱۵ سال قبل برای اولین بار در شهر تولوز فرانسه، با کتری‌هایی را که در شرایط عادی زندگی (فشار و رطوبت) قرار داشتند، با میکروسکوپ فشار قوی تحت فشار یک میلیون ولت، برای مدت کوتاهی به حالت زنده مشاهده کردند. هنوز مشکلات فنی مربوط به کاربرد دقیق و وسیع این میکروسکوپ‌ها در زیست‌شناسی سلولی فراهم نشده است. شکل ۴-۲۷ منظره‌ای از یک میکروسکوپ الکترونی فشار قوی را نشان می‌دهد.

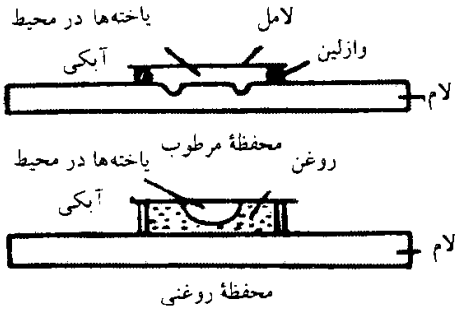


شکل ۴-۲۷. منظره‌ای از یک میکروسکوپ الکترونی فشار قوی

مشاهده نمونهٔ زنده؛ میکرومانیپولاسیون؛ میکروایرادیاسیون

مشاهدهٔ نمونهٔ زنده، از قدیمی‌ترین و در عین حال از جالب‌ترین فنون یاخته شناختی است. این روش بر پایهٔ مطالعهٔ یاخته‌های زنده استوار است و بنابراین تنها در مورد نمونه‌های شفاف که نیازی به تهیهٔ برش ندارند (تک یاخته‌ای‌ها و کشت یاخته‌های منفرد، ریسه داران رشته‌ای، کرک‌ها، برگ‌های نازک گیاهان آبزی، بشره‌ها و غیره) اعمال می‌شود. در مورد گیاهان آبزی، یاخته‌ها باید در محیط طبیعی خود (آب شیرین یا آب دریا) قرار گیرند و در

مورد یاخته‌های موجودات هوازی باید آنها را در مایع فیزیولوژیک خاص قرار داد، اکثر یاخته‌های گیاهی در محلول ساکارز ۷ یا ۸٪ به خوبی قابل مشاهده‌اند، همچنین می‌توان از محلول‌های نمکی متوازن استفاده کرد. برای مشاهده، معمولاً نمونه بین لام و لامل قرار می‌گیرد، چنانچه بررسی دراز مدتی موردنظر باشد برای اجتناب از خشک شدن نمونهٔ مورد مطالعه باید از محفظه‌ای مرطوب یا محفظه‌ای روغنی استفاده کرد (کوماندون[1] و دو فونبرون[2]) (شکل ۴-۲۸).



شکل ۴-۲۸. چگونگی مشاهدهٔ یاخته‌های زنده

همچنین می‌توان ترتیبی را ذکر کرد که به وسیلهٔ باجر برای فیلمبرداری از میتوزهای البومن مایع گیاهان مختلف مورد استفاده بوده است. این البومن روی لاملی گسترده می‌شود که از یک قشر نازک ژلوز شیرین شده پوشیده است و اطراف آن با حاشیه‌ای از وازلین محدود می‌گردد. طشتکی که بدین‌سان شکل می‌گیرد توسط لامل کوچک‌تر دیگری مسدود می‌شود که آن هم با لایهٔ نازکی از ژلوز پوشیده شده و از آلودگی جلوگیری می‌کند، تمامی این دستگاه وارونه بر روی پلاتین میکروسکوپ قرار می‌گیرد. در چنین شرایطی می‌توان میتوزها را تا بیش از ۴۸ ساعت مشاهده کرد.

با استفاده از میکروسکوپ اختلاف فاز، مشاهدهٔ نمونهٔ زنده خیلی جالب‌تر شده است. در میکروسکوپ معمولی، اغلب سازندهٔ یاخته به خوبی مشخص نیستند اما ممکن است با استفاده از رنگ‌آمیزی زیستی آنها را خیلی بیشتر مرئی ساخت.

در این روش از رنگ‌هایی استفاده می‌شود که به‌صورت محلول‌های بسیار دقیق، بدون کشتن یاخته‌ها، به‌طور انتخابی (دلخواه) بر روی برخی از اجزاء سازندهٔ یاخته ثابت می‌شوند بدین‌سان، مثلاً سرخ خنثی یا آبی کرزیل[3] (که به‌صورت محلول ۱ در ۵۰۰۰ یا ۱ در ۱۰۰۰۰ مورد استفاده قرار می‌گیرند) در یاخته‌ها نفوذ می‌کنند و در واکوئل‌ها جمع می‌شوند، در حالی که پروتوپلاسم بی‌رنگ می‌ماند، وقتی هسته و سیتوپلاسم رنگ بگیرند، نشانهٔ این است که یاخته مردنی یا مرده است. در یاخته‌ای که با سرخ خنثی رنگ شده باشد، «جنبش‌های سیکلوز» باقی می‌مانند و در اغلب موارد رشد میسر است، بنابراین واقعاً یک رنگ‌آمیزی «زیستی» خواهد بود. از طرفی، وقتی بخواهند بدانند که یاخته‌ها زنده‌اند یا مرده، چنین رنگ‌آمیزی‌هایی به‌عنوان کنترل به‌کار می‌روند.

رنگ‌کننده‌های دیگری به نام رنگ‌کننده‌های پروتوپلاسمی بسیار سمی‌اند و کاربرد آنها خیلی دقیق و بیشتر به‌صورت رنگ‌آمیزی «نزدیک به کشنده» است. سبز ژانوس[4] و بنفش متیل[5] با غلظت کم مخصوصاً بر روی میتوکندری‌ها ثابت می‌شوند، بنفش دالیا[6] و بنفش کریستال[7] اختصاصاً بر روی هسته ثابت می‌شود، رودامین[8] به‌خصوص کلروپلاست‌ها را رنگ می‌کند.

استفاده از این رنگ‌ها امکان داده است تا میتوکندری‌ها را از واکوئل‌های جوان تشخیص دهند و تکامل آنها را بررسی کنند (گی‌یرمون)، و نیز در موارد pH و rH_2 درون یاخته‌ای (به کمک تغییر یا احیای برخی مواد رنگ‌کننده) اطلاعاتی را به‌دست آورند.

میکرومانیپولاسیون، آزمایش بر روی یاخته راحتی ضمن مشاهدهٔ آن به حالت زنده ممکن می‌سازد. این روش، که مقدماتش توسط شامبر در ۱۹۲۱ فراهم شد، در فرانسه به وسیله دوفونبرون به کار رفته است، در این روش به

1- Comandon 2- De Fonbrune 3- crezyl blue 4- vert Janus 5- violet de methyle
6- violet dahkia 7- violet cristal 8- rodamine

کمک وسایل بسیار کوچک شیشه‌ای (سوزن‌ها و پیپت‌ها و اسکالپل‌های بسیار ریز و غیره) که روی مجموعهٔ مکانیکی (استاتیف) میکروسکوپ سوار شده و می‌توانند با فرمان‌های بسیار ملایم در سه بُعد مختلف جابه‌جا شوند، روی بخش‌های مختلف یاخته عمل می‌کنند (جراحی بخش‌های مختلف یاخته، پیوندها و مانند آن).

میکروایرادیاسیون را می‌توان روش خاصی از میکرومانیپولاسیون به حساب آورد. دستهٔ باریکی از پرتوهای فرابنفش را روی ناحیه‌ای از یاخته که با دقت مشخص شده می‌تابانند و سپس نتایج این تخریب را در ارتباط با وضعیت آن مشاهده می‌کنند، نخستین آزمایش‌ها از این نوع به سال ۱۹۲۱ به وسیلهٔ تچاکوتین[1] صورت گرفته‌اند، تدارکات بسیار کامل‌تری نیز توسط اورتز[2] وبلوم[3] و زیرکل[4] در ایالات متحدهٔ امریکا، بسیس و نومارسکی[5] در فرانسه انجام شده است. همچنین به تازگی (۱۹۶۴)، بسیس در یاخته‌شناسی تجربی از ایرادیاسیون (پرتوافکنی) با دستهٔ باریکی از اشعه‌لیزر[6] استفاده کرده است: یاخته‌هایی که با این دسته اشعهٔ بسیار کوچک آسیب دیده‌اند، برحسب نقطهٔ آسیب دیدهٔ خود، حالات متفاوتی از مرگ یا تباهی را نشان می‌دهند.

مشاهدهٔ یاخته‌های کشته شده (تثبیت و رنگ‌آمیزی)

مشاهدهٔ نمونهٔ زنده جز در موارد خاصی امکان‌پذیر نیست. برعکس، مشاهدهٔ یاخته‌های کشته شده روشی عمومی است. اگر مرگ طبیعی یک یاخته بررسی شود، مشخص می‌گردد که ضمن آن تغییرات عمده‌ای در ساخت یاخته ایجاد می‌شود. برعکس، تثبیت عبارت است از کشتن خیلی سریع یاخته‌ها بدون تخریب ساخت‌های یاخته‌ای آنها (بدون ایجاد ساخت‌های غیرحقیقی یا مجازی). در هر حال رسیدن به این حد تصوری ذهنی است اما سعی بر این است که تا سرحد امکان به آن دست یابند ولی با این حال فساد یاخته بر اثر تثبیت امری است الزامی، زیرا همین فساد ساخت‌های مولکولی پروتوپلاسم عمل مرگ یاخته است.

ثابت‌کننده‌های شیمیایی معمولاً از مواد سمی‌اند که نقش آنها استوار کردن ساخت‌های یاخته‌ای در حالتی هرچه نزدیک‌تر به وضعی است که در مادهٔ زنده دارند. هیچ ثابت‌کننده‌ای کامل نیست، از این رو معمولاً معرف‌های پیچیده‌ای را که در آنها چندین ثابت‌کننده گرد آمده به کار می‌برند، کمابیش بدین امید که به وسیلهٔ یکی از آنها نواقص دیگری را برطرف سازند. حتی در چنین شرایطی، غالباً جز بخشی از اجزاء سازنده یاخته به خوبی تثبیت نمی‌شود و به ندرت می‌توان در یک نمونهٔ آماده شده مثلاً هم هسته و هم کندریوم[7] را مطالعه کرد.

اولین ثابت‌کننده‌هایی که به کار رفتند به‌خصوص دارای الکل و اسیدها بوده‌اند که پروتوپلاسم را به شدت منعقد می‌کنند. سپس در جستجوی ثابت‌کننده‌هایی برآمده‌اند که کمتر اسیدی باشند و بتوانند تا حد امکان چربی‌ها را به‌صورت نامحلول درآورند: این ثابت‌کننده‌ها، ثابت‌کننده‌های میتوکندری‌ها بوده اساساً شامل فرمل، بیکرومات پتاسیم، تتروکسیداُسمیوم هستند که ساخت‌های سیتوپلاسمی را بهتر حفظ می‌کنند.

اینک به‌عنوان نمونه، برخی از ثابت‌کننده‌های آمیخته را که معمولاً به کار می‌روند ذکر می‌کنیم:

مایع کارنوی (برای هسته):

الکل مطلق	۶۰ ml
کلروفرم	۳۰ ml
اسید استیک	۱۰ ml

مایع فلمینگ (برای هسته):

اسید کرومیک ۱٪	۱۵ ml
اسید اسمیک ۲٪	۴ ml
اسید استیک	۱ ml

1- Tschackotine 2- Uretz 3- Bloom 4- Zirkle 5- Nomarski
6- laser 7- chondriume

مایع بوان[1] (برای هسته):

اسید پیکریک	۱۵ ml
فرمل	۵ ml
اسیداستیک	۱ ml

مایع رگو[2] (برای سیتوپلاسم - کندریوم):

بیکرومات پتاسیم ۳٪	۸۰ ml
فرمل	۲۰ ml

مایع هلی[3] (چندارزشی):

سولفات سدیم		۱ g
بیکرومات پتاسیم		۲/۵ g در ۱۰۰ ml آب
کلرورمرکوریک		۵ g
اسید استیک	۵ ml	هنگام استفاده، به محلول افزوده می‌شوند
فرمل	۵ ml	

باید خاطرنشان کرد که این فرمول‌ها مبتنی بر تجربه بوده آمیخته‌های حاصل اغلب ناپایدارند.

با استفاده از «تیمار فیزیکی» نیز می‌توان تثبیت را عملی ساخت. مثلاً از «گرم کردن سریع» که موجب انعقاد پروتئین‌ها می‌شود برای تثبیت استفاده شده است، این روش، که تا حدی نامناسب اما سریع است، اغلب در خون‌شناسی و میکروب‌شناسی به کار رفته است. به همین ترتیب به وسیلهٔ سرما، در شرایطی که از تشکیل بلورهای یخ جلوگیری می‌شود. اجزاء سازندهٔ یاخته را بی‌حرکت (ثابت) می‌کنند. خشک کردن به کمک سرما (یخ زدن - خشک کردن) به تدارکات خاصی نیاز دارد. نمونه‌ها در ایزوپنتان[4] (که به دلیل هدایت حرارتی شدیدش انتخاب شده است) در دمای ازت مایع ۱۹۶ °C - سریعاً منجمد شده سپس در دمایی بین ۲۰ °C - و ۶۰ °C - و در خلاء بی‌آب می‌شوند. بعد آنها را مستقیماً با پارافین مذاب قالب‌گیری می‌کنند. این روش به طور نظری بهترین است زیرا بلافاصله ساخت‌های یاخته‌ای را بی‌حرکت کرده از عمل هر مادهٔ شیمیایی جلوگیری می‌کند، اما کاربرد آن دقت زیادی لازم دارد. جانشین‌سازی به کمک سرما عمل بسیار ساده‌تری است. نمونه‌ها در دمای کم مثل حالت قبل منجمد شده بعد بی‌آب کردن آنها را در الکل اتیلیک مطلق در ۴۰ °C - یا در بوتانول[5] تا آب شدن کامل یخ صورت می‌گیرد، سپس قالب‌گیری به روش معمول انجام می‌شود.

برای قضاوت دربارهٔ ارزش یک تثبیت، باید بتوان حالت یاختهٔ ثابت شده را با یاختهٔ زنده مقایسه کرد و این مسئله است که جز در مورد برخی از انواع یاخته‌ها امکان‌پذیر نیست.

وقتی کشت باکتری یا خون مورد بررسی باشد، یاخته‌ها را می‌توان مستقیماً تثبیت کرده روی لام چسبانید: این همان روش تهیهٔ فروتی[6] است.

در مورد گیاهان، گاهی می‌توان یاخته‌های کاملی را ثابت و رنگ‌آمیزی کرد (ریسه‌داران رشته‌ای، بشره‌های گیاهی، کشت بافت‌ها). مریستم‌ها را می‌توان به‌طور کامل در محلول استیک رنگ‌کنندهٔ (کارمن[7]، اورسئین[8]) گرم غوطه‌ور کرد، با این عمل، مریستم‌ها هم تثبیت و هم رنگ می‌شوند و سپس می‌توان یاخته‌هایشان را با فشار فزاینده بین لام و لامل از هم جدا کرد (روش «له کردن»).

با وجود این، غالب اوقات لازم است برش‌هایی به کمک میکروتوم[9] تهیه شوند. جسم، پس از تثبیت، به وسیلهٔ انجماد یا غالباً پس از بی‌آب شدن، با قالب‌گیری توسط پارافین سخت می‌شود. در این حالت، به‌منظور زایل کردن ثابت‌کننده، جسم را با آب شستشو داده سپس آن را در الکل‌هایی که به‌تدریج غلظت آنها تا الکل مطلق افزایش می‌یابد قرار می‌دهند. بعد آن را در تولوئن[10] و بالاخره در ظرف دارای پارافین مذاب می‌گذارند. در نهایت جسم در

1- Bouin 2- Regaud 3- Helly 4- isopentane 5- butanol
6- frotti 7- carmin 8- orceine
۹- microtome دستگاهی است که با آن برش‌های میکروسکوپی تهیه می‌کنند - م.
10- toluene

قالبی از پارافین جای می‌گیرد. این قالب پارافینی به وسیلهٔ میکروتوم به‌صورت برش‌های نازکی (به ضخامت ۲ تا ۵۰μm) بریده می‌شود، و نواری از برش‌ها به‌دست می‌آید که آنها را روی لام می‌چسبانند. این عملیات بی‌آب کردن و آغشتن ممکن است ساخت‌های یاخته‌ای را با ایجاد پدیده‌ای مؤثرتر از تثبیت خراب کنند.

سپس برش‌هایی که پارافین آنها قبلاً گرفته شده است رنگ می‌شوند. در رنگ‌آمیزی، رنگ‌های گوناگونی را به کار می‌برند که متناسب با مطالعهٔ هر عنصر انتخاب شده‌اند. چنانچه عمل رنگ‌کننده به اندازهٔ کافی انتخابی باشد، رنگ‌آمیزی می‌تواند به‌طور مستقیم انجام پذیرد. ممکن است رنگ‌آمیزی «با بازگشت» یا «با کاستن» صورت گیرد. در این حالت، برش با رنگ موردنظر بیش از حد رنگ می‌شود، بعد به کمک معرف مناسبی مادهٔ رنگ کنندهٔ زاید را زایل می‌کنند تا این که تنها برخی عناصر (میتوکندری‌ها، دانه‌های کروماتین) رنگی باقی بمانند. غالباً دو و حتی سه رنگ برای رنگ‌آمیزی اجزاء سازندهٔ یاخته به کار می‌روند. اینک چند روش مربوط به مطالعهٔ اندامک‌های گوناگون درون یاخته‌ای را بررسی می‌کنیم.

از رنگ‌کننده‌های بسیار متعدد متداول، تنها به ذکر سه نوع آنها اکتفا می‌کنیم:

۱- مواد رنگ‌کننده‌ای که منشاء طبیعی دارند، مانند هماتوگزیلین[1]، کارمن، آورسئین.

۲- فرآورده‌های ساختگی که برخی از آنها حالت بازی دارند و مخصوصاً برای هسته مناسب‌اند (مانند تیونین[2]، سبزمتیل[3]، سافرانین[4]، بنفش ژانسین[5]، فوشین[6] بازی)، و برخی دیگر حالت اسیدی دارند (مانند فوشین اسیدی، سبزلومیر[7]، ائوزین[8]).

۳- همچنین امروزه رنگ‌کننده‌های خنثی، حاصل از ترکیب رنگ‌کننده‌های اسیدی و بازی، را به کار می‌برند (مانند ائوزینات‌های آبی‌متیلن[9]).

برخی رنگ‌کننده‌ها، در برخورد با مواد مختلف، رنگ‌های متفاوت خاصی ایجاد می‌کنند که اینک به ذکر یک مثال اکتفا می‌کنیم: تیونین آبی‌رنگ، ترشحات مخاطی و لعاب‌ها و «ولوتین[10]» موجود در قارچ‌ها را سرخ رنگ می‌کند. این پدیده را «متاکرومازی[11]» و این رنگ‌کننده‌ها را «متاکروماتیک[12]» می‌نامند.

برش‌ها، پس از رنگ‌آمیزی، به وسیلهٔ الکل بی‌آب گردیده، سپس در تولوئن گذاشته شده و بعد با بوم کانادا بین لام و لامل قرار می‌گیرند.

اصول اوّلیه هیستوشیمی و سیتوشیمی

برای این که یک واکنش هیستوشیمی، معتبر و با معنی تلقی شود، لازم است که اصول اولیه زیر مدنظر قرار گیرد:

۱- موادی که مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرد نبایستی از جایگاه اصلی خود به خارج انتشار یابد. هنگامی که ماکرومولکول‌ها نظیر DNA و پروتئین‌ها، مورد بررسی باشند این مشکل به سهولت قابل حل است، با این وجود وقتی ماده موردنظر در ثابت‌کننده‌ها و یا در محیط واسطه‌ای که واکنش در آن انجام می‌پذیرد حل شود، همچنان که در مورد اوره و گلیکوژن و نیز یون‌های سدیم، پتاسیم یا کلر چنین است در تفسیر نتایج بایستی دقت‌های ویژه‌ای اعمال شود. ثابت‌کننده‌ها[13] باید ساختمان سلول را حفظ کنند و از انتشار ترکیبات مورد مطالعه جلوگیری کنید. برای مثال ثابت‌کننده‌هایی که در مطالعه چربی‌ها به کار می‌روند نباید محتوی حلال‌های چربی

1- hematoxyline 2- thionine 3- vert de methyle 4- safranine 5- violet gentiane
6- fuchsine 7- vert lumiere 8- eosine 9- eosinates de bieu de methylene
۱۰- volutine ماده‌ای است احتمالاً مرکب از اسیدنوکلئیک.
11- metchromasie 12- metachromatique 13- fixative

باشند و حلال‌های اسیدی را نباید در فنون تشخیص فسفات کلسیم به کار برد، زیرا فسفات کلسیم در محیط اسیدی محلول است. در بررسی‌های هیستوشیمی، ثابت‌کننده‌هایی که بیش از همه کاربرد دارند، فرمالدئید (فرمالین) برای میکروسکوپ نوری و گلوتار آلدئید برای میکروسکوپ الکترونی می‌باشد.

۲- محصول واکنش بایستی نامحلول و رنگی باشد یا توان پراش الکترونی زیادی داشته باشد. نامحلول بودن محصول واکنش باعث جلوگیری از انتشار آن به داخل محلول‌های رنگی و یا گسترش آن به نقاط مختلف نمونه مورد آزمایش می‌گردد. فرآورده‌های رنگی یا دارای پراش الکترون می‌توانند به ترتیب با میکروسکوپ نوری یا الکترونی مورد مطالعه قرار گیرند (شکل ۴-۲۹).

۳- روش به کار گرفته شده بایستی برای ماده یا گروه‌های شیمیایی مورد مطالعه اختصاصی باشد.

۴- روند آزمایش نبایستی ماهیت گروه‌های واکنش دهنده را تغییر دهد و یا واکنش آنها را مهار کند.

در پاره‌ای از واکنش‌های هیستوشیمیایی، شدت رنگ ایجاد شده به‌طور مستقیم با غلظت ماده مورد بررسی تناسب دارد. تحت این شرایط، غلظت مواد مورد مطالعه می‌تواند به وسیله میکرواسپکتروفتومتر که آمیزه‌ای از میکروسکوپ و اسپکتروفتومتر می‌باشد انجام شود. با اندازه‌گیری میزان نوری که توسط نواحی کوچکی از سلول یا بافت جذب می‌شود، سنجش کمّی مواد شیمیایی در آن ناحیه امکان‌پذیر می‌گردد.

به تازگی این روش با کاربرد تجهیزات اسکنینگ پیشرفت بیشتری حاصل کرده است. این تجهیزات تراکم

	پروتئین‌ها	نوکلئوپروتئین	چربی خنثی	گلیکوژن	میتوکندری و دستگاه گلژی	آنزیم‌ها
فرمالدئید	ترکیبات افزایشی	ترکیبات افزایشی	حفظ می‌شود	حفظ می‌شود	فیکس می‌شود	حفظ می‌شود
کلرید جیوه	رسوب می‌کند	رسوب می‌کند	حفظ می‌شود	حفظ می‌شود	حفظ می‌شود	-
تتروکسیداسمیوم	ترکیبات افزایشی	ترکیبات افزایشی	فیکس می‌شود	-	فیکس می‌شود	-
اسید کرومیک	رسوب می‌کند	رسوب می‌کند	حفظ می‌شود	حفظ می‌شود	حفظ می‌شود	-
بی‌کرومات پتاسیم	حفظ می‌شود	حل می‌شود	حفظ می‌شود	حفظ می‌شود	حفظ می‌شود	-
اسید پیکریک	رسوب می‌کند	رسوب می‌کند	-	رسوب می‌کند	-	-
اسید استیک گلاسیال	فیکس نمی‌شود	رسوب می‌کند	-	حفظ می‌شود	تخریب می‌شود	-
اسید تری‌کلرواستیک	رسوب می‌کند	رسوب می‌کند	-	-	-	-
الکل اتیلیک	دناتوره می‌شود	دناتوره می‌شود	حل می‌شود	رسوب می‌کند	حل می‌شود	حفظ می‌شود
استون	حفظ می‌شود	حفظ می‌شود	حل می‌شود	اثر خیلی ضعیف	حل می‌شود	حفظ می‌شود

شکل ۴-۲۹. اثر معرف‌های موجود در فیکساتورها بر مواد سلولی

نوری تصاویر حاصل از روش سیتوشیمی را با دقت بیشتری تجزیه و تحلیل کرده و اطلاعات را به کامپیوتری که

نتایج را استخراج می‌کند می‌فرستد. این روش حایز اهمیت بسیاری است، زیرا تعیین نوع اختصاصی سلول در بافت‌های دارای انواع گوناگون سلول که حالت متداولی در بدن جانداران می‌باشد را امکان‌پذیر می‌سازد.

نمونه‌هایی از کاربرد روش‌های هیستوشیمی در تشخیص مواد حایز اهمیت در زیست‌شناسی

شناسایی یون‌ها

الف - آهن: هنگامی که برش‌هایی از بافت‌های دارای یون‌های فریک (Fe^{3+}) در مخلوطی از فروسیانور پتاسیم و اسید کلریدریک خوابانده (انکوبه) شود، یون‌ها را می‌توان با تشکیل رسوب بسیار نامحلول آبی‌تیره فروسیانور فریک نمایان ساخت (واکنش پرس). این روش نه تنها امکان تعیین مکان سلول‌های تجزیه‌کننده هموگلوبین را فراهم می‌آورد بلکه تشخیص بیماری‌هایی که در آنها رسوب آهن در بافت‌ها روی می‌دهد را نیز امکان‌پذیر ساخته است.

ب - فسفات‌ها: توسط واکنش با نیترات نقره آشکار می‌شوند. در مرحله بعدیِ واکنش، فسفات نقره به وسیله هیدروکینون احیاء شده و رسوب سیاه نقرهٔ احیاء شده را پدید می‌آورد (شکل ۴-۳۰). فسفات نامحلولی که به وفور در بدن یافت می‌شود فسفات کلسیم است که در بافت استخوانی به مقدار زیادی وجود دارد.

شناسایی لیپیدها

رنگ‌هایی که در محیط‌های واسطه (حلال) بیش از چربی‌ها حل شوند، به بهترین نحوی لیپیدها را نشان می‌دهند. برای استفاده از چنین رنگ‌هایی در رنگ‌آمیزی چربی‌ها، الکل به قطرات چربی سلولی منتقل می‌شود.

رنگ‌هایی که به این منظور بیشتر به‌کار می‌روند عبارتند از: سودان III و سودان سیاه که به ترتیب با چربی‌ها رنگ قرمز و سیاه را ایجاد می‌کنند (شکل ۴-۳۱).

روش‌های دیگری که به منظور تعیین مکان کلسترول و استرهای آن، فسفولیپیدها و گلیکولیپیدها به‌کار می‌روند در تشخیص بیماری‌های متابولیکی که در آنها تجمع داخل سلولی انواع گوناگون لیپید روی می‌دهد با ارزش هستند.

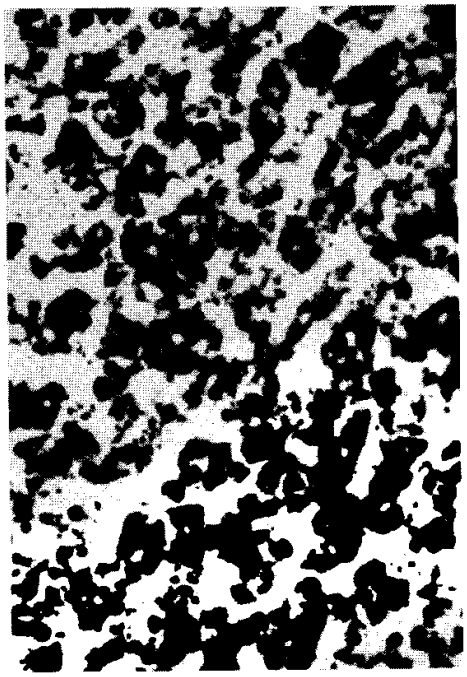
شناسایی اسیدهای نوکلئیک

برای شناسایی اسیدهای نوکلئیک به‌طور معمول از روش‌های مختلف سیتوشیمی مثل روش فولگن یا روش براشه استفاده می‌شود که شرح آنها در فصل دوم صفحهٔ ۹۷ آمده است و یا روش‌ها و ابزارهای بسیار پیشرفته مثل PCR الکتروفورز و مانند آن به کار گرفته می‌شود که در صفحات آینده به آن اشاره خواهد شد.

شناسایی پروتئین‌ها

واکنش‌های غیرمستقیم به منظور نمایان ساختن پروتئین‌ها در بافت‌ها و سلول‌ها اساساً برپایه روش‌های تشخیص اسیدهای امینه آنهااستوار است. تعیین مکان وبرخی اوقات، تعیین مقدار پروتئین‌ها در بافت‌ها بر اساس پیدایش رنگ در اثر واکنش‌هایی است که با تیروزین (واکنش میلّون)، تریپتوفان (بنزیدین چهار ازته) (شکل ۴-۳۲) و آرژینین (واکنش ساکاگوشی) رخ می‌دهند. واکنش ساکاگوشی اغلب در مطالعه چگونگی پراکنش پروتئین‌های بازی در هسته سلول‌ها به کار می‌رود، مثلاً برای تشخیص هیستون‌ها و پروتامین‌ها که هر دوسرشار از آرژینین هستند. روش‌هایی

شکل ۴-۳۰. فتومیکروگراف برشی از اپیفیز استخوان دکلسیفیه نشده که با نیترات نقره تیمار شده و سپس به وسیله هیدرکینون احیاء گردیده است. رسوب سیاه در بافت استخوانی (پیکان‌ها) نمایانگر حضور فسفات کلسیم است. بافت غضروف بدون واکنش (C) در قسمت فوقانی برش واقع است. ۱۲۵×



شکل ۴-۳۱. فتومیکروگراف برشی از کبد سگ که با سودان سیاه رنگ‌آمیزی شده است. به قطرات لیپید رنگ شدهٔ داخل سلولی توجه کنید. ۲۰۰×

نیز برای مطالعه گروه‌های S − H و S − S که به وفور برخی پروتئین‌ها مثل کراتین یافت می‌شوند، وجود دارد. چون این روش‌ها در بیوشیمی به‌طور مشروح مورد بررسی قرار می‌گیرد، از توضیح آنها خودداری می‌گردد. (شکل ۴-۳۲).

شکل ۴-۳۲. برش غده زیر ارواره‌ای موش که با روش بنزیدین چهار ازته برای پروتئین‌های دارای تریپتوفان رنگ‌آمیزی شده است. سلول‌های آسینی (AC) واکنشی نشان نمی‌دهند در حالی که سلول‌های لوله‌ای (پیکان‌ها) مملو از ذرّات به شدت واکنش دهنده می‌باشند. ۳۰۰×

شناسایی پلی‌ساکاریدها و اولیگوساکاریدها

پلی‌ساکاریدها در بدن اغلب به‌صورت آزاد و یا ترکیب باپروتئین‌ها و یا لیپیدها وجود دارند. بخش پلی‌ساکاریدی در گلیکوپروتئین‌ها یا گلیکولیپیدها می‌تواند از بخش‌های همگن قندی تشکیل شده باشد.

برای تشخیص پلی‌ساکاریدها در سلول‌ها به‌طور معمول از روش PAS (پریودیک اسید - شیف) استفاده می‌شود. در این روش ابتدا نمونه‌ها (برش‌های سلول‌ها) را به مدت حدود ۱۵ دقیقه تحت تأثیر اسیدپریودیک (HIO_4) قرار می‌دهیم. این اسید با اکسیدکردن گروه‌های

۱ و ۲ گلیکول موجود در ریشه‌های گلوکز موجب پیدایش گروه‌های آلدئیدی می‌شود. این گروه‌های آلدئیدی با معرّف شیف (فوشین بی‌رنگ شده) ترکیب پیچیدهٔ جدیدی را که نامحلول است و رنگ ارغوانی یا آبی قرمز دارد به وجود می‌آورد که با میکروسکوپ نوری قابل تشخیص است.

این گونه پلی‌ساکاریدها را PAS^+ نامند. از آنجا که در سلول مواد PAS^+ دیگر نیز وجود دارد، اختصاصی بودن این واکنش بایستی با تأثیر قبلی آنزیم‌های تجزیه‌کننده پلی‌ساکاریدها مورد کنترل قرار گیرد. نشاسته و گلیکوژن از پلی‌ساکاریدهای PAS^+ هستند. تمام ترکیبات قندی سلول PAS^+ نیستند. به مجموعه گسترده ماکرومولکول‌های دارای قند در بدن نام عمومی ترکیبات گلیکوژوگه می‌گویند که این واژه، گلیکوپروتئین‌ها و گلیکولیپیدها و نیز پروتئوگلیکان‌ها (مولکول‌هایی درشت‌تر از گلیکوپروتئین‌ها) را شامل می‌شود.

گلیکوپروتئین‌های دارای مقدار ناچیز پروتئین را که به وسیله برخی از سلول‌های پوششی تولید می‌شوند مواد موکوسی نامند. برخی گلکوپروتئین‌ها مثل تیروگلوبولین غدهٔ تیروئید و گونادوتروپین‌های غده هیپوفیز مقدار زیادی پروتئین دارند.

برخی گلیکوپروتئین‌ها فاقد گروه‌های اسیدی هستند (گلیکوپروتئین‌های خنثی) و برخی مقادیر محدودی ریشه‌های کربوکسیل یا سولفات دار (مواد موکوسی اسیدی) دارند. این نوع ریشه‌های دارای سولفات یا کربوکسیل موجود در گلیکوپروتئین‌ها یا پروتئوگلیکان‌ها به شدت با معرّفی به نام آبی‌آلیسین واکنش نشان می‌دهند.

گیکولیپیدهااز ترکیبات مهم موجود در اغلب غشاهای سلولی هستند که در غشاء پلاسمایی سلول‌های عصبی نیز فراوانند. (نظیر گانگلیوزید و سربروزیدها). بخش قندی گلیکولیپیدها، اولیگوساکاریدهایی (مولکول‌هایی با تعداد کم و تا حدود ده اوز) مشابه با اولیگوساکاریدهایی است که در گلیکوپروتئین‌ها وجود دارند.

شناسایی آنزیم‌ها

روش‌های هیستوشیمی زیادی به‌منظور آشکارسازی و تشخیص آنزیم‌ها به کار گرفته می‌شود. در مطالعه آنزیم‌های ناپایدار، بایستی از برش‌های ثابت نشده انجمادی بافت‌ها استفاده کرد. بسیاری از آنزیم‌ها می‌توانند بخشی از فعالیت خود را در بافت‌های ثابت شده توسط ثابت‌کننده‌های آلدئیدی نظیر فرمالین یا گلوتارآلدئید، حفظ کنند. اغلب روندهای شناسایی آنزیمی بر مبنای تولید رسوب‌هایی به شدت رنگ‌پذیر یا الکترون متراکم در جایگاه فعالیت آنزیمی استوار است. برای مثال چگونگی شناسایی سه نمونه از آنزیم‌هایی را که می‌توان با میکروسکوپ نوری یا الکترونی بررسی کرد، شرح می‌دهیم.

الف - اسید فسفاتازها

روش گومری[1] به‌منظور تشخیص فعالیّت اسید فسفاتازها بر این بناست که برش‌های نمونه‌های ثابت شده با فرمالین را در محلولی از گلیسروفسفات سدیم و نیترات سرب، با PH = ۵ قرار می‌دهیم. آنزیم اسید فسفاتازها، گلیسروفسفات را هیدولیز کرده، یون فسفات را آزاد می‌کند که با نیترات سرب وارد عمل شده رسوب بی‌رنگ نامحلول سرب را در جایگاه فعالیت آنزیمی ایجاد می‌کند. در دومین مرحله رسوب با محلولی از سولفید آمونیوم واکنش نشان می‌دهد و رسوب سیاه رنگ سولفید سرب را به وجود می‌آورد. این روش امکان تعیین جایگاه وجود و فعالیت این آنزیم را فراهم آورده است و اغلب در ظاهر ساختن لیزوزوم‌ها که اندامک‌های محتوی اسید فسفاتاز هستند، به کار می‌رود (شکل ۴-۳۳). برای مطالعه این آنزیم‌ها با میکروسکوپ نیازی به

1- Gomorie

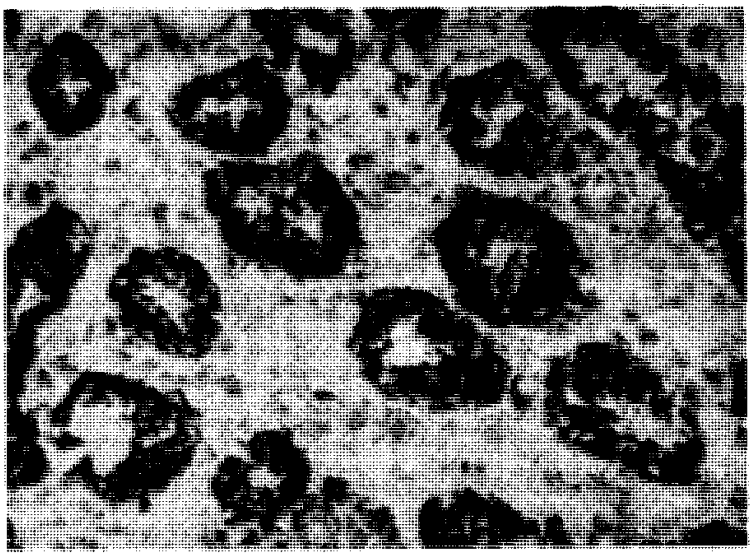
شکل ۴-۳۳. فتومیکروگراف برش کلیه موش صحرایی که با روش اسیدفسفاتاز - سرب رنگ‌آمیزی شده است. لیزوزوم‌ها به شکل ذرّات تیره‌ای در سلول‌های لوله پیچیدهٔ نزدیک ،به شدت رنگ می‌گیرند. ×۴۰۰

مرحله استفاده از سولفیدآمونیوم نمی‌باشد.

ب - دئیدروژنازها

این آنزیم‌ها هیدروژن را از یک سوبسترا برداشته و در شرایط مناسب به سوبسترای دیگر انتقال می‌دهند.

دِئیدروژناز فراوانی در بدن وجود دارند که در فرآیندهای سوخت‌وسازی مختلفی نقش مهمی ایفا کرده و به کمک سوبسترایی که بر آن اثر می‌کنند، قابل شناسایی می‌باشند. روش تشخیص هیستوشیمی دئیدروژنازها عبارت است از خوابانیدن برش‌های بافتی ثابت نشده، در محلول سوبسترای دارای تترازول که پذیرنده H^+ محلول با خاصیت رنگ‌پذیری ضعیف می‌باشد. آنزیم دئیدروژناز هیدروژن را از سوبسترا به تترازول انتقال داده و آن را به ترکیب نامحلول و به شدت رنگ پذیری به نام فرمازون[1] احیاء می‌کند که در جایگاه فعالیت آنزیمی ته‌نشین می‌شود. با این روش می‌توان جایگاه سوکسینات دئیدروژناز، آنزیم کلیدی چرخه اسیدسیتریک (چرخه کربس) را در میتوکندری‌ها تعیین کرد (شکل ۴-۳۴).

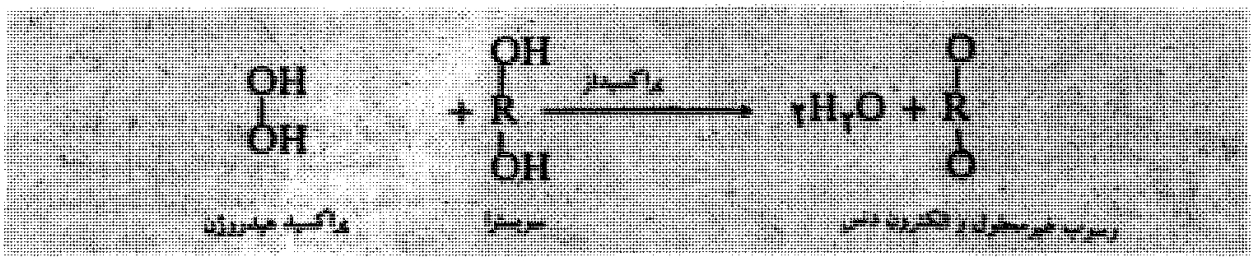


شکل ۴-۳۴. فتومیکروگراف برش انجمادی کلیه ثابت نشده (تازه) که در سوکسینات همراه با مونوتترازول (MTT) خوابانیده شده است. رسوب تیره‌ای که در لوله‌ها مشاهده می‌شود، نشان دهندهٔ فعالیت سوکسینات دئیدروژناز است. ×۴۰۰

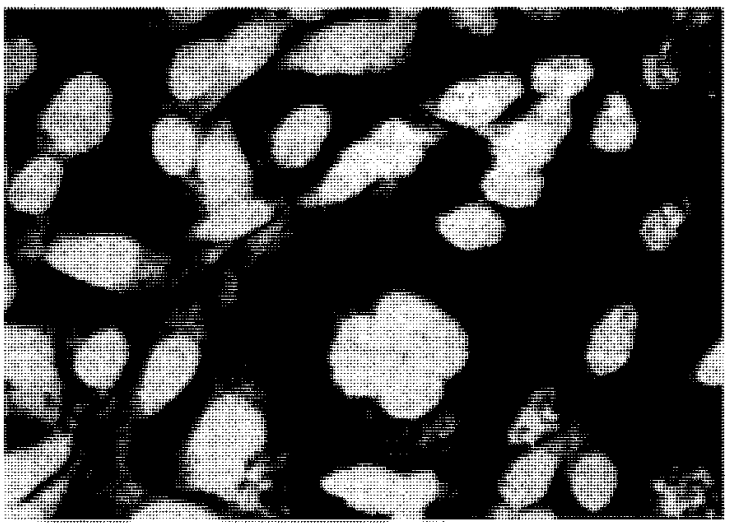
1- fermazon

ج - پراکسیداز

این آنزیم‌ها که در بسیاری از انواع سلول‌ها وجود دارند، با انتقال یون‌های هیدروژن به پراکسید هیدروژن و تشکیل مولکول‌های آب، احیاء شدن برخی سوبستراها را پیش می‌برد.



در این روش، برش‌های بافتی که کاملاً ثابت شده است، در محلولی متشکل از پراکسیدهیدروژن و ۳ و ۳′ - دی‌آمینوآزوبنزیدین اکسید شده، منجر به پیدایش رسوب الکترون متراکم سیاه رنگ نامحلولی می‌گردد که امکان تعیین جایگاه فعالیت پراکسیداز را در میکروسکوپ نوری و الکترونی فراهم می‌آورد. از آنجا که آنزیم پراکسیداز به شدت فعال است، مقدار قابل ملاحظه‌ای رسوب نامحلول را در زمان کوتاهی تولید نموده، و این روند را به‌صورت آزمون هیستوشیمیایی بسیار حساسی درمی‌آورد. (شکل ۴-۳۵).



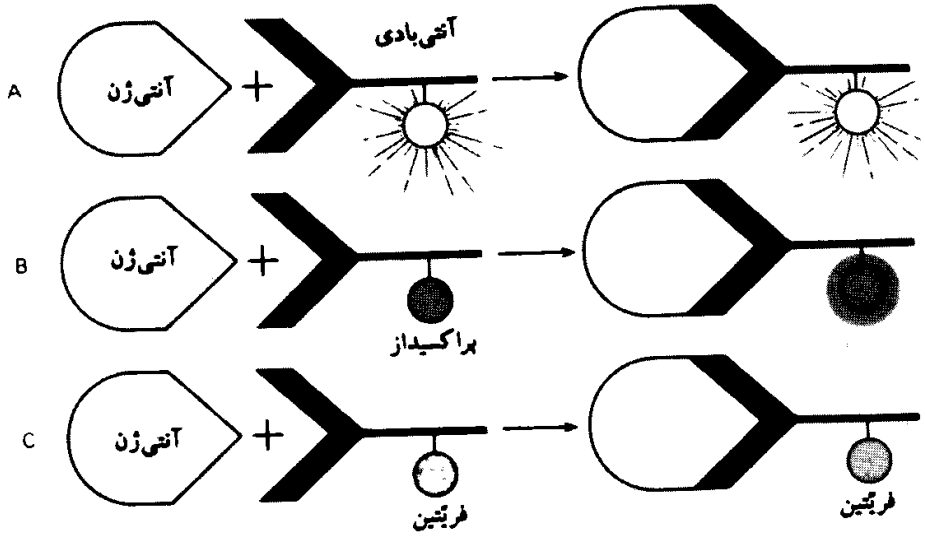
شکل ۴-۳۵. فتومیکروگراف کشت بافت کلیه جنین هامستر که با ویروس سیمیان شماره ۴۰ تغییر شکل یافته و با آکریدین اورنژ رنگ‌آمیزی گردیده و با میکروسکوپ فلوئورسان، عکس‌برداری شده است. فلوئورسان سبزی (که در تصویر به رنگ سفید نشان داده شده) در نواحی دارای DNA (هسته) نمایان گردیده و رنگ قرمز مایل به نارنجی (که به رنگ خاکستری نشان داده شده) مشخصه سیتوپلاسم سرشار از RNA می‌باشد. در مرکز تصویر یک سلول غول پیکر مشاهده می‌گردد. ×۱۰۰۰

ایمنوسیتوشیمی

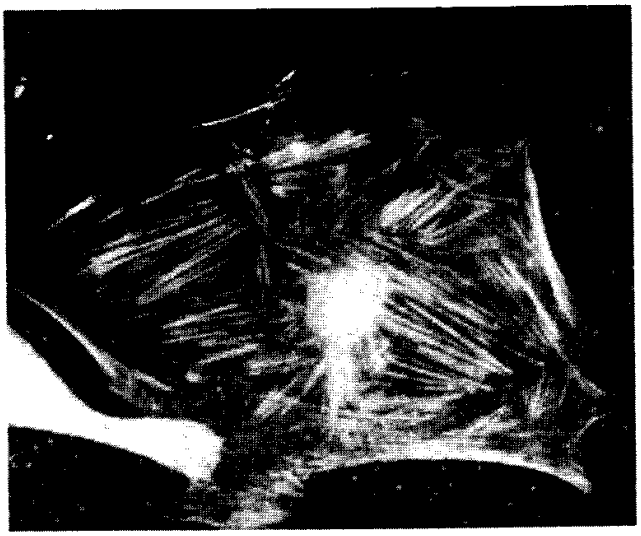
ایمنوسیتوشیمی بر مبنای ایجاد پیوند بین ایمنوگلوبولین‌ها با موادی است که بتواند آنها را با میکروسکوپ قابل رؤیت کند. در این روش به‌طور معمول از موادی که بتوانند ایمنوگلوبولین‌ها را به حالت فلوئورسان درآورند استفاده می‌شود.

از روش ایمنوسیتوشیمی اغلب برای شناسایی پروتئین‌های اختصاصی و سایر ماکرومولکول‌هایی که نقش پادتنی (آنتی‌کری) دارند استفاده می‌شود. پادتن‌ها به‌طور معمول پروتئین‌هایی از گروه گلوبولین‌ها (ایمنوگلوبولین‌ها) هستند که در برابر ورود و تأثیر پادگن (پادگن‌ها) به بدن در پلاسما و مایعات بافتی ایجاد می‌شوند.

غالباً سه روش برای نشاندار کردن پادتن‌ها به کار می‌رود (شکل ۴-۳۶).



شکل ۴-۳۶. سه روش متعارف نشاندار کردن و شناسایی پروتئین‌های اختصاصی به کمک ایمنوسیتوشیمی. A: پادتن به یک ترکیب فلوئورسنت اتصال یافته است. پس از انکوباسیون، برش‌های دارای پادگن که در معرض محلول پادتن نشاندار قرار گرفته‌اند. در میکروسکوپ فلوئورسان مطالعه می‌شوند. B: پادتن به پراکسیداز پیوند شده است. پس از واکنش پادگن - پادتن، برش مراحل هیستوشیمیایی شناسایی پراکسیداز راگذرانده و با میکروسکوپ نوری یا الکترونی مطالعه می‌شود (به متن توجه کنید). C: پادتن به فریتین اتصال یافته است. پس از واکنش پادگن - پادتن، این ماده به وسیله میکروسکوپ الکترونی مورد مطالعه قرار می‌گیرد که در آن اتم‌های آهن الکترون منتشر فریتین قابل مشاهده‌اند.



شکل ۴-۳۷. رشته‌های آکتین، متشکل از مجموعه‌های ریز رشته‌ای آکتین در سیتوپلاسم فیبروپلاست کشت شده انسان که از قبل در پادتن فلوئورسان ضد آکتین خوابانیده شده است. ۱۷۶۷×

۱- پیوند با ترکیبات فلوئورسان: با این روش می‌توان جایگاه پادگن‌های اختصاصی را با استفاده از میکروسکوپ فلوئورسان تشخیص داد (شکل ۴-۳۷).

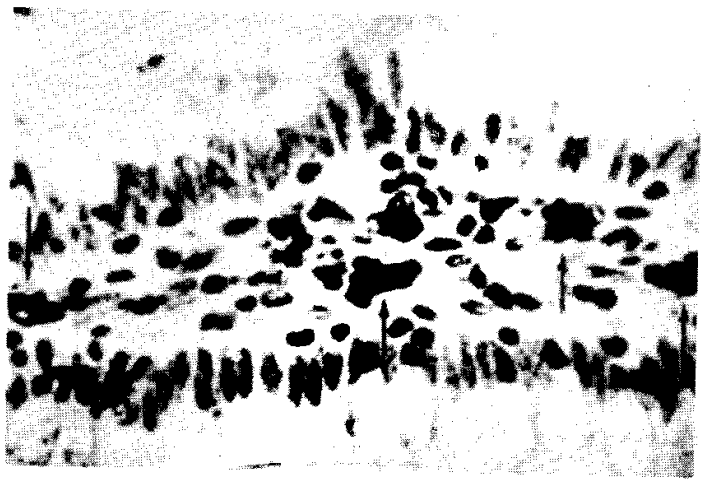
۲- پیوند با یک آنزیم: این روش، ردیابی پادتن‌های نشاندار را به کمک سیتوشیمی آنزیم قرار دادی امکان‌پذیر می‌سازد.

آنزیمی که بیش از همه به کار می‌رود پراکسیداز است که با روش بیان شده قبلی و با استفاده از میکروسکوپ نوری یا الکترونی قابل ردیابی می‌باشد (شکل ۴-۳۸).

۳- پیوند با یک الکترون متراکم که در میکروسکوپ الکترونی قابل ردیابی است: پروتئینی سرشار از آهن به نام فریتین یا ذرات طلا اغلب به‌عنوان شاخص پادتن به کار می‌رود. در میکروسکوپ الکترونی، تعیین مکان پادتن‌های متصل به فریتین الکترون متراکم یا طلا، به سهولت امکان‌پذیر است. به‌منظور تعیین مکان پادگن، دو روش مستقیم و غیرمستقیم در ایمنوسیتوشیمی وجود دارد.

۱- روش مستقیم

برش‌هایی از بافت مشکوک به داشتن پادگن (ماده X) در محلولی از پادتن نشاندار شدهٔ مناسب خوابانده می‌شود. پادتن به‌طور اختصاصی با ماده X وارد واکنش شده ترکیبی را ایجاد می‌کند که با میکروسکوپ قابل بررسی است: محل تشکیل این ترکیب، همان پادتن موردنظر می‌باشد (شکل ۴-۳۸).

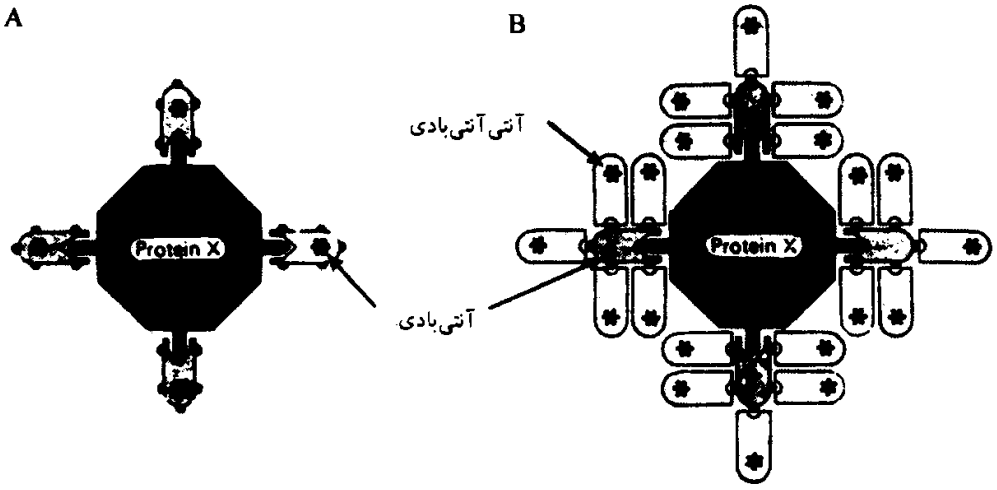


شکل ۴-۳۸. فتومیکروگراف یک پرز روده که ماکروفاژهای رنگ‌آمیزی شده با ایمنوپراکسیداز با استفاده از پادتن‌های ضد لیزوزیم (پیکان‌ها) را نشان می‌دهد. ۴۰۰×

۲- روش غیر مستقیم

ابتدا پادگن X به بدن جانوری مثل خرگوش تزریق می‌شود در نتیجه در بدن خرگوش پادتن مربوط به آن ایجاد می‌شود. پادتن خرگوش به جانور دیگری مثل بز یا گوسفند تزریق می‌گردد و موجب تشکیل پادتنی جدید (پادپادتن خرگوش) توسط بز یا گوسفند می‌شود.

اگر برش نمونه‌های دارای پادگن X را با پادتن خرگوش (که نشاندار نیست) به مدت کافی تماس دهیم و پس از شستشو به آن پادپادتن نشاندار شده خرگوش را بیافزاییم جایگاه پروتئین x (پادگن) به کمک مشاهده میکروسکوپی قابل تشخیص می‌گردد. برتری این روش آن است که به دلیل اتصال تعداد زیادی مولکول‌های پادپادتن نشاندار بر مجموعه پادگن، پادتن غیرنشاندار حساسیت روش تا حدّ زیادی افزایش می‌یابد و با سهولت محل پادگن X مشخص می‌شود (شکل ۳۹-۴).



شکل ۴-۳۹. فنون مستقیم (A) و غیرمستقیم (B) در ایمنوفلوئورسان. در فن مستقیم، پادتن نشاندار شده که با مادهٔ فلوئورسان، به پادگن موجود در سلول‌ها اتصال می‌یابد. همان‌گونه که مشاهده می‌کنید، در این نمونه فرضی هر مولکول پادگن تنها به تعداد کمی مولکول پادتن متصل شده است. در فن غیرمستقیم ابتدا پادتن غیرفلوئورسان به پادگن پیوند می‌شود و سپس پادپادتن فلوئورسان (که به نام ایمنوگلوبولین فلوئورسان نیز خوانده می‌شود) خود را به پادتن متصل می‌کند. از آنجا که هر مولکول پادتن به پنج مولکول پادپادتن فلوئورسان می‌پیوندد، بنابراین روند غیرمستقیم بسیار حساس‌تر است، زیرا هر مولکول پادگن به‌طور غیرمستقیم به تعداد کثیری مولکول پادتن فلوئورسان متصل می‌شود.

خواص زیستی لیزر و کاربردهای آن

یکی از مهم‌ترین اکتشافات قرن بیستم، کشف لیزر است. این پرتو در سال ۱۹۱۷ توسط انیشتین شناخته شد و در سال‌های بعد، روش‌های مختلف تولید انواع لیزر به سرعت گسترش یافت. لیزرهای تولید شده معمولاً دارای طول موج‌های نور مرئی یا قابل رؤیت IR و UV بودند، بنابراین نور لیزر از جنس نور معمولی یعنی امواج الکترومغناطیس الکترومغناطیس و با همان ویژگی مثل خاصیت موجی و ذره‌ای می‌باشد. فوتون‌های نور لیزر همانند فوتون‌های نور مرئی، با سرعت ۳۰۰۰۰۰ کیلومتر در ثانیه در هوا منتشر می‌شوند، انرژی فوتون‌های نور لیزر همانند نور مرئی و دیگر امواج الکترومغناطیس به وسیله رابطه $E = hf$ تعیین می‌شود که در این رابطه $h = ۶/۶۴\times۱۰^{-۳۴}$ js (ثابت پلانک) و f فرکانس نوسانات آن می‌باشد. لیزر دارای ویژگی‌هایی است که خواص ویژه‌ای را در مقایسه با دیگر نورها باعث می‌شود. این ویژگی‌ها عبارتند از:

۱- شدت [1]

نور لیزر در مقایسه با دیگر چشمه‌های نوری، دارای شدت زیادی است. شدت زیاد نور لیزر مربوطه توان کل و کلیمیشن [2] مناسب آن می‌باشد.

زاویه پراش پرتوهای لیزری بسیار کم است و نور لیزر که از یک چشمه لیزری ایجاد گردد، روی خط تقریباً مستقیم و موازی حرکت می‌کند و لذا با افزایش فاصله، پهنا و سطح مقطع دسته پرتو، تغییر زیادی نمی‌کند. این در حالی است که شدت نور حاصل از چشمه‌های نور معمولی، افزایش فاصله، با عکس مجذور فاصله کاهش می‌یابد.

۲- *خاصیت جهتی* [3]

اندازه پهن شدگی دسته پرتولیزری به ازاء هر متر طی مسافت، تقریباً یک میلیمتر بوده و می‌توان گفت که این نور یک دسته پرتو بسیار موازی شده است.

۳- *تک‌رنگی* [4]

ایجاد نور کاملاً تک‌رنگ در عمل امکان‌پذیر نیست لیکن با توجه به نحوه تولید لیزر می‌توان لیزرهایی با پهنای باند حدود ۰/۰۱ نانومتر ایجاد کرد.

۴- همدوسی [5]

نورهای حاصله از یک چشمه لیزری به‌صورت همدوس بوده و فاز نور حاصله، با لحظات قبل و بعد مربوط می‌شود و لذا تغییر فاز دسته پرتولیزری در یک لحظه به‌خصوص با توجه به لحظات قبل، قابل محاسبه است.

۵- *قطبیت (پلاریزاسیون)* [6]

نور لیزر به‌طور ذاتی قطبی (پلاریزه) نمی‌باشد، و لیکن در اکثر دستگاه‌های ایجادکننده لیزر به دلیل استفاده از پنجره‌های بروستر، لیزرها پلاریزه می‌شوند.

جذب فوتون‌های با طول موج‌های مختلف توسط بافت‌های زیستی

بافت‌های مختلف بدن واکنش متفاوتی نسبت به طول موج‌های مختلف نور دارند. بعضی از این طول

1- Intensity 2- Collimation 3- directionality 4- Monochromacity
5- Coherence 6- Polarization

موج‌ها را ممکن است جذب کنند در حالی که بعضی دیگر را پراکنده و یا منعکس سازند. شرط اصلی تأثیر فوتون‌های نوری بر روی یک بافت به‌خصوص، جذب فوتون‌ها می‌باشد. علاوه‌بر تأثیر طول موج نور بر روی بافت‌ها، عامل مؤثر دیگر در ایجاد اثر زیستی، شدت دسته پرتو می‌باشد.

هموگلوبین، طول موج‌های ناحیه UV را به میزان صددرصد و طول موج حدود ۴۵۰ نانومتر را به میزان ۹۰ درصد جذب می‌کند. طول موج‌های بین ۵۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر دارای جذب بیشتری در هموگلوبین نسبت به طول موج ۴۵۰ نانومتر بوده و جذب طول موج‌های بالاتر از ۶۰۰ نانومتر حدود ۵ درصد کاهش می‌یابد. ملانین با توجه به آن که دارای رنگدانه‌های سیاه می‌باشد تقریباً قابلیت جذب یکسان نورهای آبی تا قرمز (طیف نور قابل رؤیت) را دارد. میزان جذب طول موج ۳۰۰ نانومتر در ملانین، ۱۰ درصد و طول موج ۴۰۰ نانومتر، ۲۵ درصد می‌باشد.

تأثیر لیزر بر بافت‌ها

تأثیر لیزر بر بافت‌ها را می‌توان به سه دسته تقسیم کرد که عبارتند از:

۱- تأثیر حرارتی[1]

۲- تأثیر فتومکانیکی[2]

۳- تأثیر فتوشیمیایی[3]

تأثیر حرارتی

تأثیرات حرارتی نور لیزر را می‌توان در دو بخش مورد بررسی قرار داد:

الف - انعقاد[4] دمای بدن در حالت طبیعی ۳۷ درجه می‌باشد. اگر بافت‌های نرم از این دما تا دمای ۶۰ درجه گرم شود در صورتی که این افزایش برای مدت کمی باشد تغییری در ساختمان طبیعی بافت‌ها قابل مشاهده نخواهد بود. در صورتی که دما از ۶۰ درجه بیشتر شود پدیده انعقاد در بافت‌ها اتفاق می‌افتد و تأثیر قابل مشاهده دیگر در این وضعیت سفید شدگی بافت مورد تابش است که مربوط به تأثیر لیزر بر روی پروتئین‌ها می‌باشد. در این حالت پروتئین‌ها حالت جمع شدگی (چروکیده‌ای[5]) پیدا کرده و نور تابیده را به مقدار زیادی پراکنده[6] می‌سازند و در نتیجهٔ انکسار و انعکاس زیاد رنگ سفید مشاهده می‌شود. از این خاصیت در بند آوردن خون رگ‌های قطع شده استفاده می‌کنند. با تابش لیزر به رگ‌های پاره شده می‌توان چروکیدگی کلاژن دیواره رگ‌ها و در نتیجه متوقف شدن خونریزی را موجب شد. این ویژگی لیزر در مواردی مثل جلوگیری از خونریزی داخل شکم، با روش آندوسکوپی مورد استفاده زیاد دارد.

ب - تبخیر[7] وقتی که دمای بافت‌ها تا صد درجه سانتی‌گراد افزایش یابد وضیعتی کاملاً متفاوت اتفاق می‌افتد. بدین صورت که آب داخل سلول‌ها به جوش آمده و در نتیجه تبخیر می‌شود. بدین ترتیب فشار داخل سلول از فشار خارج سلول زیادتر شده و باعث پاره شدن دیواره سلولی می‌شود. در صورتی که تابش لیزر به سلول ادامه یابد، موقعی که دمای آن به ۳۰۰ تا ۴۰۰ درجه سانتی‌گراد رسید، بافت‌های مورد تابش سیاه می‌شود که علت آن سوختن کربن‌های موجود در سلول‌هاست.

1- Photothermal Effect 2- Photomechanical 3- Photochemical
4- Coagulation 5- Shrinkage 6- Scatter 7- Vaporization

به‌طور مختصر می‌توان گفت که تأثیر حرارتی لیزر بستگی به طول موج، شدت و زمان تابش آن به بافت دارد.

تأثیر تابش لیزر CO_2

این لیزر تقریباً در همه جراحی‌ها به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد.

طول موج حاصل از این لیزر $10/6\mu^m$ است. انرژی این طول موج به‌طور عمده توسط آب بافت‌ها جذب می‌شود. ضریب جذب طول موج $10/6\mu^m$ در بافت‌ها خیلی زیاد است و عمق مؤثر ($\frac{1}{e}$) آن در بافت‌ها حدود $10\mu^m$ می‌باشد، به عبارت دیگر ۹۰٪ این نوع تابش در فاصله‌ای حدود $100\mu^m$ جذب می‌شود. این مقدار ضخامت چند سلول می‌باشد که در نتیجه تابش لیزر با این طول موج موجب گرم شدن سریع بافت تا دمای ۱۰۰ درجه می‌شود و سپس انرژی اضافی صرف تبخیر آب سلول‌ها می‌گردد.

پس از تبخیر آب سلول‌ها، انرژی اضافی موجب سوختن کربن‌ها شده و دود تولید می‌کند. همان‌طور که گفته شد، چون عمق نفوذ این طول موج کم است می‌توان سلول‌ها را لایه‌لایه از بین برد و سپس لایه‌های عمیق‌تر را مورد تابش قرار داد و عمق جراحی را به میزان موردنظر افزایش داد. حدود ۲/۵ ژول انرژی لازم است تا یک میلیمتر مکعب آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد به بخار ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد تبدیل شود. بنابراین با یک لیزر یک واتی که یک ژول انرژی در ثانیه تولید می‌کند در حدود ۰/۲۵ ثانیه، یک قطعه بافت با سطح مقطع یک میلیمتر مربع و عمق ۱۰۰ میکرومتر تبخیر می‌شود. یک لیزر ۲۰ واتی که دسته پرتو خروجی آن بر روی سطحی با قطر ۲ میلی‌متر متمرکز گردیده است، عمق ۲/۵ میلی‌متری را در مدت یک ثانیه تبخیر می‌کند.

به علّت جذب زیاد، می‌توان از پراکندگی اشعه در اطراف ناحیه مورد تابش تقریباً صرف‌نظر کرد. لیزر CO_2 را می‌توان برای بریدن[1] یا تبخیر مورد استفاده قرار داد.

از خاصیت برشی آن می‌توان برای بریدن ریشه‌های توموری استفاده کرد. وقتی که لیزر CO_2 برای بریدن استفاده می‌شود، بایستی دسته پرتو خروجی لیزر ر تا حدّی زیادی تنظیم کرد به‌طوری که بتواند مانند یک چاقوی بسیار تیز عمل کند.

مواقعی که ریشه زخم‌ها قابل دسترسی نباشد، می‌توان با روش تبخیر تومورها را لایه‌لایه از بین برد. برای این منظور می‌توان اشعه را از حالت تنظیم خیلی باریک به یک دسته پرتو پهن[2] تبدیل کرده و قطر مقطع آن را زیاد کرد. به‌طوری که در هر لحظه بتوان سطح بیشتری را مورد تابش قرار داد. در این صورت می‌توان کنترل بیشتری روی تأثیرات عمقی داشت. بایستی توجه داشت که در این حالت با در نظر گرفتن آن که سرعت تبخیر کم می‌شود، حرارت حاصل در بافت‌ها، فرصت کافی برای انتشار[3] به بافت‌های کناری خواهد داشت که عیب عمده این روش محسوب می‌شود. وقتی عمق زیادی را با این روش از بین ببریم، تأخیر در ترمیم را موجب شده و احتمال عفونت را افزایش می‌دهد.

لیزر CO_2 را می‌توان به‌عنوان یک چاقوی بسیار تیز و ظریف در جراحی‌ها به کار برد. علاوه بر آن لیزر را می‌توان از طریق فیبرهای نوری به هر نقطه دلخواه به‌خصوص از طریق مجاری مختلف مثل مری، نای و یا رگ‌ها، منتقل کرد و ضمن کنترل از خارج، بدون ایجاد پارگی‌های اضافی، جراحی موردنظر را انجام داد. استفاده از لیزر در جراحی، موجب کاهش احتمال عفونت (به خاطر خاصیت میکروب‌کشی لیزر)، کاهش احتمال خونریزی (به خاطر خاصیت

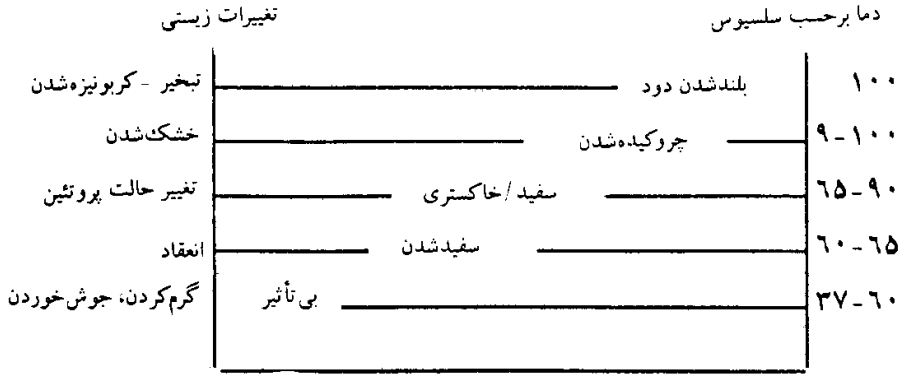
1- incision 2- defocussing 3- diffusion

انعقادی لیزر[1]، کاهش احتمال کاشت[2] در مورد زخم‌های بدخیم، کاهش نیاز به ماده بیحس و بیهوش‌کننده، کاهش بقاء اثر جراحی[3]، کاهش درد و سرعت زیادتر در ترمیم و مانند آن می‌شود.

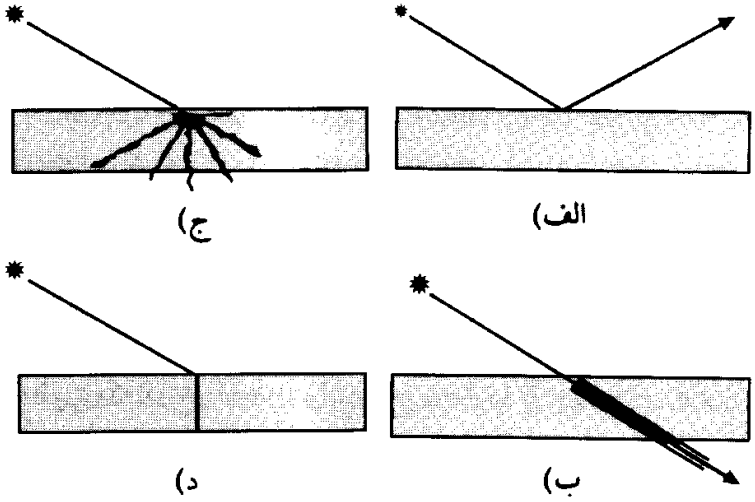
اندرکنش لیزر بافت

تأثیرات ایجاد شده توسط لیزرهای جراحی - برش، تبخیر و انعقاد - همگی ناشی از اثر حرارتی آنها بر روی بافت‌ها می‌باشند.

طبیعت اندرکنش نور لیزر با بافت‌های زیستی می‌تواند در پدیده‌های انعکاس، عبور، پراکندگی و جذب دسته‌بندی شوند (شکل ۴-۴۰ و شکل ۴-۴۱ و شکل ۴-۴۲).



شکل ۴-۴۰. تغییرات قابل رؤیت با نور لیزر



شکل ۴-۴۱. a) انعکاس، پرتولیزری از سطح بافت منعکس شده و بر بافت تأثیری ندارد. b) عبور، پرتولیزری از بافت عبور می‌کند در این صورت اثری بر موضع نداشته و یا تأثیرش بسیار کم است. c) پراکندگی، پرتولیزری بر روی بافت پراکنده می‌شود و در ناحیهٔ وسیعی جذب می‌گردد تأثیر آن پراکنده و ضعیف است. d) جذب، پرتولیزری توسط حجم کوچکی از بافت جذب‌شده و بر روی این حجم تأثیر می‌گذارد.

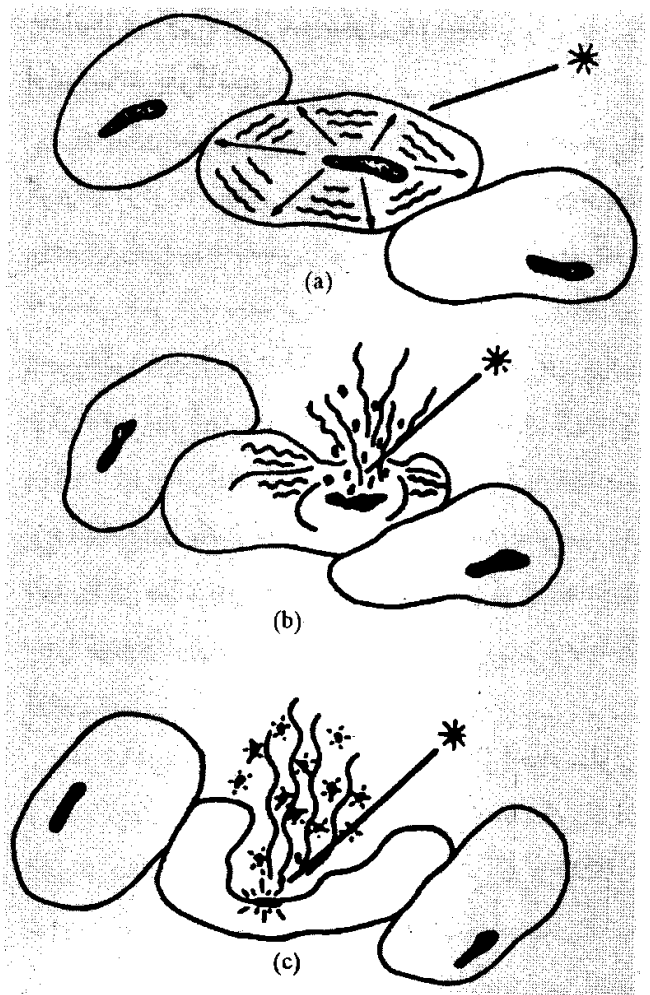
برای این که نور بتواند بر روی بافت تأثیر بگذارد باید به وسیله آن جذب شود. اگر نور به وسیلهٔ بافت منعکس شود و یا از آن عبور کند تأثیری در آن نخواهد داشت و اگر نور پراکنده شود، در ناحیهٔ وسیع‌تری جذب شده و اثر آن کمتر خواهد بود. شکل ۴-۴۳ تأثیر نسبی لیزرهای CO_2، آرگون و نئودیمیوم‌یاگ را مقایسه می‌کند. این شکل گسترش نسبی آسیب گرمایی ناشی از پرتو خام را نشان داده و نقش سایر عوامل مهم نظیر سیستم انتقال تراکم توان، طول عمر پالس‌ها را در نظر نمی‌گیرد. به‌طوری که در شکل نشان داده شده، لیزر CO_2 بالاترین جذب را (فقط ۳۰ الی ۹۰ میکرون در آب) داشته و بیشترین تأثیر حرارتی را به وجود می‌آورد. این لیزر بافت را به‌صورت سطحی منعقد می‌سازد.

1- Coagution effect 2- Implantation 3- Scar

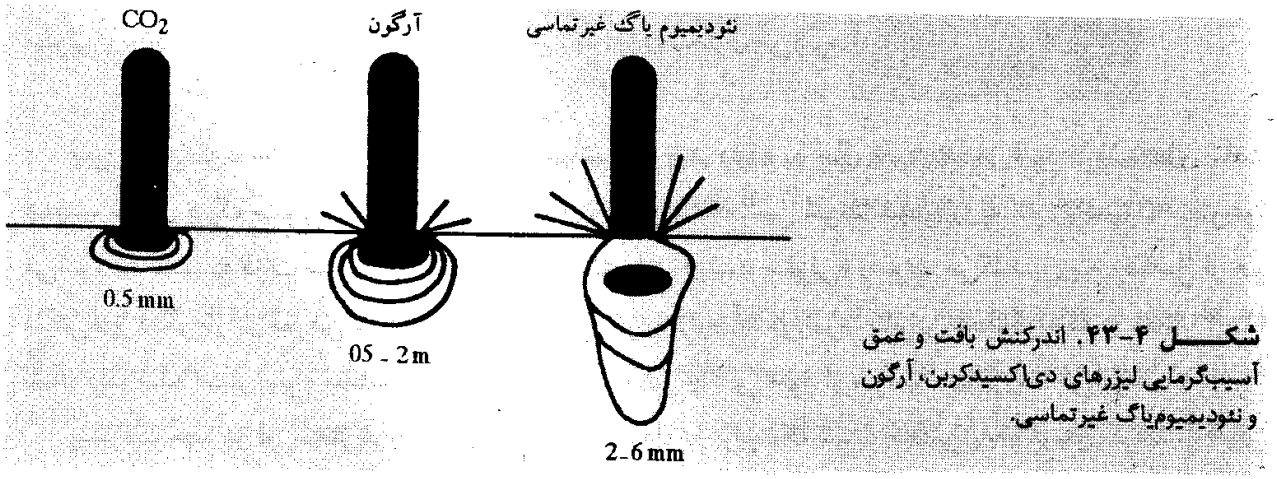
مجزاکردن و مطالعه دودمان‌های خالص سلولی در آزمایشگاه

به تازگی فنون نوینی ابداع شده است که امکان مجزاکردن سوسپانسیون‌های خالصی از یک نوع سلول را فراهم می‌آورد مانند سلول آسینی لوزالمعده، سلول کبد و سلول جداری معده. در بدن این سلول‌ها با سایر انواع سلول‌ها مخلوط هستند و این امر از مطالعه بیوشیمیایی و سیتوفیزیولوژیک آنها ممانعت به عمل می‌آورد. در حال حاضر سلول‌های سرطانی مجزا شده که به‌طور معمول با سلول‌های عروق خونی و بافت همبند آمیخته‌اند می‌توانند به‌صورت سلول خالص مورد مطالعه قرار گیرند.

تمامی روش‌های مورد استفاده بر پایه هضم آنزیمی اجزاء سلولی و خارج سلولی که سلول‌ها را به‌هم اتصال می‌دهند قرار دارد. آنزیم‌هایی که بیشترین کاربرد را دارند پروتئازها، کلاژناز و هیالورونیداز می‌باشند. انکوباسیون بافت همراه با این آنزیم‌ها سلول‌ها را سست می‌کند. سپس سلول‌ها با نیروهای جداکننده ضعیفی (تکان دادن، با پیپت کشیدن و مانند آن) از یکدیگر تفکیک می‌شوند. پس از آن سوسپانسیون سلولی با انواع مختلف سلول به وسیله تفکیک با سانتریفوژ یا توسط سدیمانتاسیون جاذبه‌ای، خالص



شکل ۴-۴۲. a) یک سلول نور لیزر را جذب کرده و تا نقطه جوش گرم شده است. در این حالت سلول از بین می‌رود. b) انفجار سلول، بخار و تفالهٔ سلول به بیرون پرتاب می‌شود. c) بخار و تفاله از محل مورد تابش خارج شده و با پرتولیزر کربونیزه می‌شود.

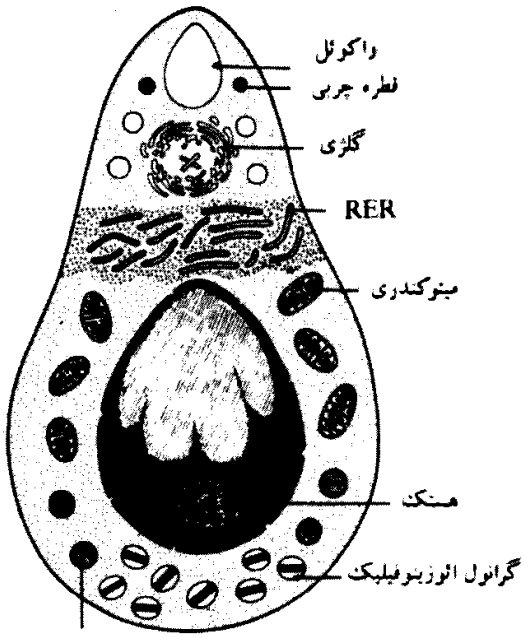


شکل ۴-۴۳. اندرکنش بافت و عمق آسیب‌گرمایی لیزرهای دی‌اکسیدکربن، آرگون و نئودیمیوم‌یاگ غیرتماسی.

می‌گردد. فرآیند سدیمانتاسیون جاذبه‌ای می‌تواند به‌صورت رسوب ملایم سوسپانسیون سلولی بر سطح شیبی از آلبومین باشد. سلول‌ها به آهستگی در محلول آلبومین نشست کرده برحسب چگالی خود در ارتفاعات مختلفی متوقّف می‌شوند.

جداسازی اجزاء سازنده سلول به‌وسیله اولتراسانتریفوگاسیون

تفکیک سلولی فرآیندی فیزیکی است که ضمن آن نیروی گریز از مرکز به منظور جدا کردن اندامک‌ها و محتویات سلولی برحسب ضریب ته‌نشینی آنها مورد استفاده قرار می‌گیرد. ضریب ته‌نشینی هر ذره بستگی به اندازه، شکل و چگالی آن ذره و چسبندگی محیط دارد. اگر یک سلول در معرض نیروی گریز از مرکز کافی قرار گیرد اندامک‌های درون سلول در لایه‌های مختلفی پراکنده خواهند شد (شکل ۴-۴۴). در هر لایه تنها می‌توان یک نوع اندامک را یافت که مکانش بستگی به ضریب ته‌نشینی آن دارد. با فن سانتریفوژ افتراقی، می‌توان هر گونه اندامک سلولی را مجزا کرده و ترکیب شیمیایی و اعمال آن را در آزمایشگاه تعیین کرد.



گرانول نارس ائوزینوفیلیک

شکل ۴-۴۴. مطبق شدن یک ائوزینوفیل نا بالغ پس از سانتریفوژ. اجزاء سلولی با چگالی بیشتر (ذرات ائوزینوفیل، هسته) در ته سلول تجمع یافته‌اند، در حالی که اندامک‌های سبک‌تر (گلژی، شبکه آندوپلاسمی خشن [RER]) در سمت مقابل قرار دارند.

در سانتریفوژ افتراقی، سوسپانسیونی از اجزاء سلولی حاصل از خرد کردن سلول طی فرآیندی موسوم به همگون‌کردن، تحت تأثیر نیروهای مختلف سانتریفوژی قرار می‌گیرد (شکل ۴-۴۴). اندام یا بافت جانوری که تازه کشته شده است، یا اندام‌ها و بافت‌های گیاهی به قطعات بسیار کوچکی بریده می‌شود و سپس در محلول مناسبی غوطه‌ور می‌گردد. اغلب سوکروز با غلظت ۰/۲۵ mol/L به کار برده می‌شود و لی چگالی، چسبندگی و ترکیب محیط را می‌توان تغییر داد. قطعات اندام همراه محلول سوکروز در یک دستگاه همگون‌کننده قرار می‌گیرند. این دستگاه اغلب از یک استوانه شیشه‌ای تشکیل شده که درون آن میله‌ای است با سرعت زیاد می‌چرخد (شکل ۴-۴۴).

قطعات بافت بر اثر برخورد به میله چرخان، به دیواره استوانه اصابت می‌کنند. این امر منجر به پارگی غشاهای سلولی و آزاد شدن اندامک‌ها و محتویات سلولی به درون محلول می‌شود.

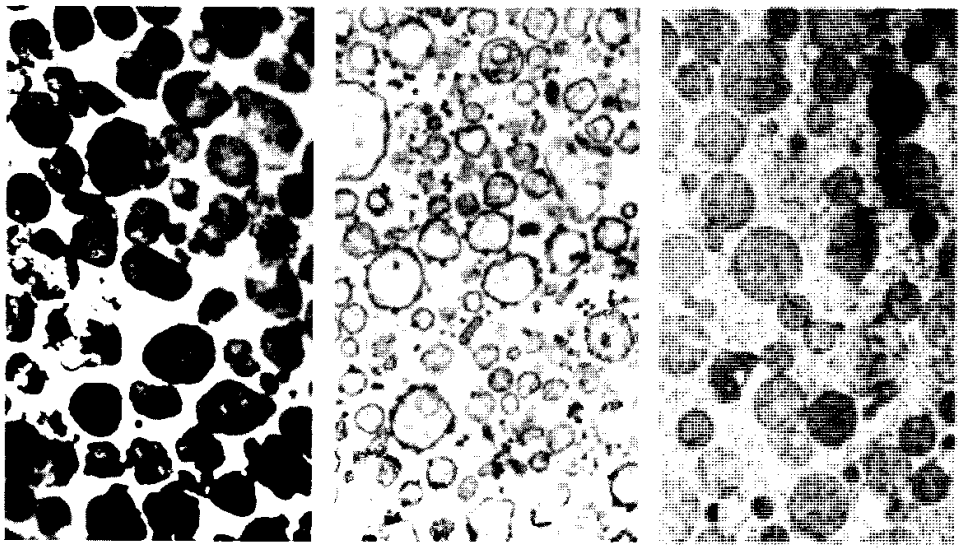
پس از این که همگون‌سازی کامل شد، سوسپانسیون چند دقیقه به حال خود رها می‌شود تا رشته‌های بافت همبند، بقایای بزرگ سلولی و سلول‌های دست‌نخورده بتوانند ته‌نشین شوند. سپس رویه سوسپانسیون سانتریفوژ می‌شود که نخست ذرات سنگین‌تر (اندامک‌ها و محتویات درشت سلولی) رسوب می‌کنند. رویه حاصل از هر سانتریفوژ دیگر بار در معرض نیروی گریز از مرکز قوی‌تری قرار داده می‌شود. بنابراین همان‌گونه که در شکل ۴-۴۴ نشان داده شده است اجزاء مختلف سلولی به ترتیب کاهش چگالی خود از سوسپانسیون جدا می‌شوند.

پیشرفت مهم در فن سانتریفوژ افتراقی، سانتریفوژ کردن در برابر یک شیب غلظتی یا سانتریفوژ کردن در شیبی وابسته به چگالی است. شیب (گرادیان) متشکل است از یک منبع محلول سوکروز که غلظت (چگالی) آن در ته لوله حداکثر بوده و در سر لوله حداقل است ودر آن، غلظت از سر به سوی ته به‌تدریج افزایش می‌یابد. مخلوط همگون در بالای این شیبِ تثبیت شده قرار می‌گیرد و سانتریفوژ می‌شود. ذرات به داخل شیب نفوذ می‌کنند ولی

فقط تا سطحی می‌رسند که در آن تعادلی میان تأثیر نیروی گریز از مرکز و تمایل ذره به معلق ماندن وجود داشته باشد (چگالی بویان). این فن امکان می‌دهد تا اجزاء خالص‌تری از اندامک‌ها را به‌دست آوریم. برخلاف شیب یکنواخت که هم‌اکنون بحث شد می‌توان شیبی غیریکنواخت یا پلکانی را به کار برد که از مناطق بر روی هم سوار شده تشکیل شده است که چگالی آنها از یک منطقه به منطقه دیگر، از ته تا سر لوله سانتریفوژ کاهش می‌یابد.

تمامی مراحل فنونی که بیان گردید، در دمایی کمی بالاتر از نقطه انجماد صورت می‌پذیرد تا با عمل سیستم‌های آنزیمی که در خلال تفکیک، اندامک‌ها را تخریب می‌کنند مقابله شود.

کنترل خلوص اجزایی که بدین ترتیب به‌دست آمده است با میکروسکوپ نوری (برای هسته‌ها، میتوکندری‌ها و ذرات ترشحی) و با میکروسکوپ الکترونی (برای ریبوزوم‌ها، میکروزوم‌ها و مانند آن، شکل ۴-۴۵) یا با روش‌های بیوشیمیایی صورت می‌پذیرد. برای مثال بخشی که محتوی لیزوزوم‌هاست می‌تواند با تعیین مقدار اسیدفسفاتاز، آنزیمی که به‌طور معمول در این ذرات یافت می‌شود شناسایی گردد در حالی که بخش محتوی هسته‌ها می‌تواند با تعیین مقدار DNA موجود در آن مشخص شود. تفکیک اجزاء سلولی به وسیله سانتریفوژ افتراقی نمایانگر پیشرفت فن بزرگی است که مطالعه جزئیات اجزاء سلولی را که نسبتاً خالص به‌دست آمده‌اند یعنی هسته‌ها، هستک‌ها، میتوکندری‌ها، شبکه‌آندوپلاسمی خشن، ریبوزوم‌ها، ذرات ترشحی و رنگیزه‌ها را ممکن می‌سازد. (شکل ۴-۴۶).

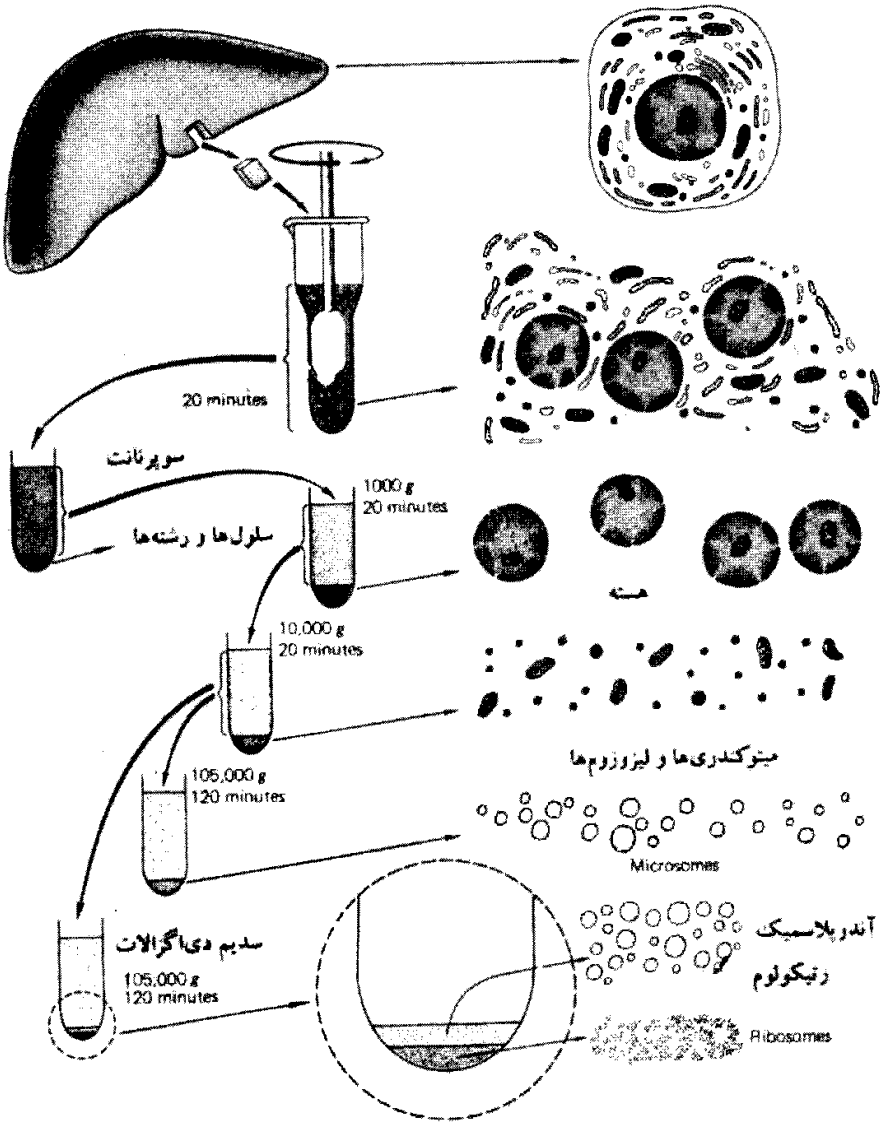


شکل ۴-۴۵. میکروگراف الکترونی سه بخش سلولی به وسیله سانتریفوژ کردن شیبی وابسته به چگالی A: بخش میتوکندری‌ها، آمیخته با میکروزوم‌ها. ۱۳۰۰۰× B: بخش میکروزومی. ۴۲۵۰۰× C: بخش لیزوزومی، ۲۵۰۰۰×

نمونه‌ای از کاربرد این روش، مطالعه فیزیولوژی میتوکندری‌هاست که بالاخره پس از بحث‌های طولانی، با جدا کردن این اندامک‌ها مشخص گردید و به وسیله مطالعه بیوشیمیایی متعاقب آن تأیید شد که این اندامک‌ها نیروگاه سلول هستند، یعنی جایی که انرژی مواد غذاییِ خورده شده، به انرژی رایج سلول یعنی آدنوزین‌تری‌فسفات (ATP) تبدیل می‌شود.

اتوهیستورادیوگرافی

در این روش ماده رادیواکتیو و قابل جذب را در اختیار بافت یا سلول قرار می‌دهند (به مدت کافی) این ماده



شکل ۴-۴۶. مجزا کردن اجزاء سلولی به وسیله سانتریفوژ افتراقی. رویه هر لوله در سرعت‌های بالاتری سانتریفوژ می‌شود. ترسیم‌های سمت راست نشانگر اندامک‌های ته هر لوله پس از هر بار سانتریفوژ هستند. نیروی گریز از مرکز با g نشان داده می‌شود که جانشین نیروی جاذبه است (g ۱۰۰۰ یعنی نیرویی ۱۰۰۰ بار قوی‌تر از نیروی جاذبه زمین).

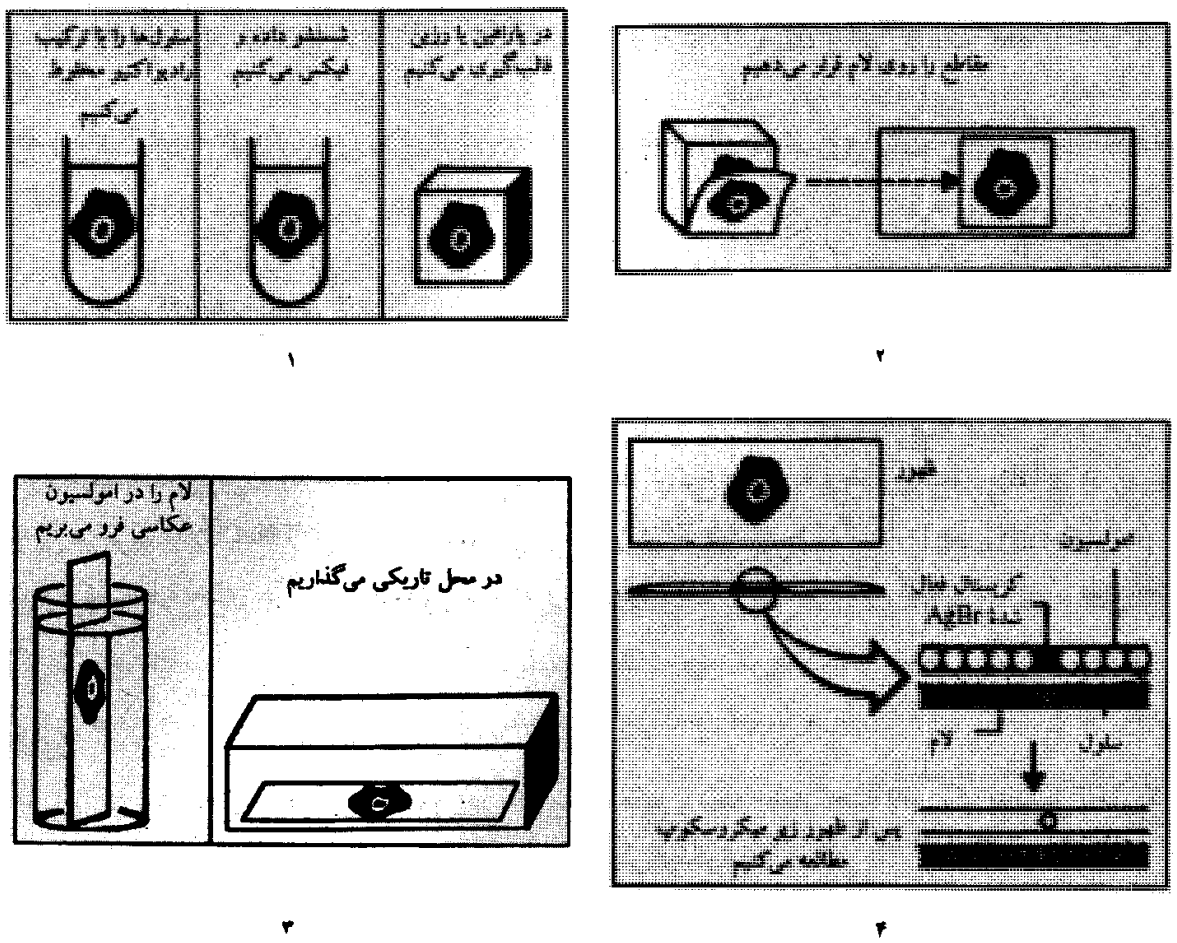
رادیواکتیو پس از جذب به اندامک‌های خاصی می‌رسد برحسب این که چه ماده‌ای باشد و در چه واکنش‌هایی در سلول وارد شود، اثر رادیواکتیویته آن را می‌توان با عکس‌برداری به کمک فیلم‌های مخصوص ردیابی‌کرد. فیلم‌هایی که در اتوهیستورادیوگرافی مورد استفاده قرار می‌گیرند به‌صورت فیلم‌های ژلاتینی‌اند که در آنها ذرات بسیار ریز نقره به حالت امولسیون وجود دارد. وقتی پرتوهای رادیواکتیو به این فیلم می‌رسند ذرات نقره را احیاء می‌کنند و نقره احیاء شده تیره‌رنگ می‌شود. با قرار دادن فیلم‌های مخصوص اتورادیوگرافی و مقایسه محل‌های سیاه شدهٔ این فیلم‌ها با سلول‌های مشاهده شده می‌توان مکان رادیواکتیو را در سلول‌ها یا بافت‌های موردنظر ردیابی کرد.

امروزه با به کار بردن این روش‌ها می‌توان مراحل پدیده‌های مختلفی مثل فتوسنتز، تنفس سلولی، بیوسنتز دیوارهٔ اسکلتی و بیوسنتز غشاءها و بسیاری از فرآیندهای زیستی سلول‌ها را مشخص کرد.

در اتوهیستوگرافی پیش سازها موادی هستند که پس از این که وارد سلول شدند بتوانند برای درست کردن مولکول‌های درشت‌تر به کار روند تا مولکول‌های درشت نشاندار (رادیواکتیو) شوند. سپس اثر مواد رادیواکتیو را بر روی فیلم‌های حساس می‌توان ردیابی کرد. موادی که معمولاً در زیست‌شناسی سلولی به‌عنوان نشانه‌گذار[1] استفاده می‌شوند عبارتند از: ۱۴C، ۳۲P، ۳H (تریسیوم) و گاهی ۳۵S یا ۱۳۱I.

1- merker

استفاده از روش اتوهیستورادیوگرافی آگاهی‌های زیادی را در مورد فراساختمان سلول و فیزیولوژی سلولی به‌دست داده است. هم اکنون با اقتباس از کارهای کارو[1] و پالاد[2] (۱۹۶۱) این فن برای میکروسکوپی بماند الکترونی به خوبی متناسب شده است. (شکل ۴-۴۷).



شکل ۴-۴۷. نمایی از مراحل هیستوگرافی را نشان می‌دهد

مواد پیش ساختی که اغلب مورد استفاده قرار گرفته‌اند عبارتند از:

۱- تیمیدین تریسیوم‌دار شده (T^3H) روی گروه متیل، که به‌طور اختصاصی بیوسنتز DNA را نشانه گذاری می‌کند،

۲- اوریدین تریسیوم‌دار شده روی کربن ۵، که به‌طور اختصاصی بیوسنتز DNA را نشانه گذاری می‌کند، در حقیقت، بخشی از اوریدین که با متیل‌دار شدن به‌صورت تیمیدین درمی‌آید، رادیواکتیویته خود را نیز از دست می‌دهد و بنابراین بیوسنتز اتفاقی DNA را نشانه گذاری نخواهد کرد،

۳- اسیدهای امینه تریسیوم‌دار شده که به‌طور اختصاصی بیوسنتز پروتئین‌ها را نشانه گذاری می‌کنند.

در این سه حالت، مواد پیش ساختی که محلول‌اند در جریان کار مربوط به سلول‌شناسی زدوده می‌شوند و تنها ماکرومولکول‌هایی که نامحلول‌اند رادیواکتیویته خود را حفظ می‌کنند.

همچنین با نشاندار کردن مواد پیش ساخت مناسب به کمک تریسیوم، می‌توان بیوسنتز گلوسیدها یا لیپیدها را مطالعه کرد، عبور این مواد همیشه اختصاصی نیست. شایسته است که اختصاصی بودن فن را با تکمیل آن به وسیلهٔ

1- Caro 2- Palade

هیدرولیز آنزیمی مناسب روی برش شاهد و مقایسهٔ رادیواکتیویتهٔ قبل و بعد از هیدرولیز استحکام بخشید.

خاطرنشان می‌کنیم که اتوهیستوگرافی می‌تواند در موارد دیگری نیز به کار برده شود. با همین فن می‌توان از راه نشاندار کردن یک ترکیب، نفوذ و جای‌گیری درون سلولی آن را بررسی کرد، این فن یکی از مطمئن‌ترین فنونی است که می‌توان از آن در مسائل مربوط به تراوایی سلول استفاده کرد؛ مثلاً این فن امکان داده است که واقعیت نفوذ ماکرومولکول‌های گوناگون به درون سیتوپلاسم مشخص شود و وضعیت ترکیبات با منشأ خارجی، در حد سلولی بررسی گردد.

در فصل‌های آینده، مثال‌های بسیاری که از نتایج حاصل به کمک اتوهیستورادیوگرافی به‌دست آمده‌اند ذکر خواهند شد.

طیف سنجی (اسپکتروفتومتری[1])

هر ترکیبی به حسب آن که چه شرایطی بر آن حاکم است طیف خاصی ایجاد می‌کند یا طیف خاصی را بیش از سایر طیف‌ها جذب می‌کند. مثلاً $Ca_{۶۸۲}$ کلروپلاستین a (کلروفیل + پروتئین) طیف جذبی‌برابر ۶۸۲ = λ نانومتر دارد. $P_{۷۰۰}$ طیف جذبی‌برابر ۷۰۰ = λ نانومتر دارد. گاهی اوقات از نوع طیف به وجود یا نبود ماده‌ای در جسم موردنظر پی می‌بریم مثلاً NaCl (کلروسدیم) طیف زرد و کلرورمنیزیم طیف سبز رنگ دارد. هموژنای سلولی هم به حسب نوع ترکیب طیف‌های مختلف را تشکیل می‌دهد و این طیف‌ها را برای شناخت ترکیبات سلولی با طیف‌های شاهد مقایسه می‌کنیم.

الکتروفورز

اساس این فن استفاده از جابه‌جایی ذرات بار در یک محیط مایع یا نیمه جامد تحت تأثیر یک پتانسیل الکتریکی برای جداسازی ذرات و ترکیبات مختلف به ویژه پروتئین‌ها و پلی‌نوکلئوتیدها است.

جسمی که دارای بار الکتریکی مثبت است به طرف قطب منفی و جسمی که دارای بار الکتریکی منفی است به طرف قطب مثبت می‌رود.

الکتروفورز به‌صورت‌های مختلفی انجام می‌شود که مهم‌ترین آنها عبارتند از:

اکتروفورز روی کاغذ، الکتروفورز با دستگاه، الکتروفورز روی ژل و مانند آن.

الکتروفورز از فنون بسیار مهمی است که پژوهشگران بیوشیمی در ۵۰ سال اخیر برای شناسایی و تعیین خلوص ماکرومولکول‌ها به کار برده‌اند. اساس این فنون، مطالعه حرکت مولکول‌های باردار در یک میدان الکتریکی است که متأثر از ماهیت شیمیایی، بار الکتریکی، اندازه و شکل ماکرومولکول‌ها می‌باشد. مولکول‌های زیستی بسیاری نظیر پپتیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک را می‌توان با استفاده از این روش‌ها شناسایی و تفکیک کرد. وقتی پروتئین‌ها در بافری با PH غیراز PH ایزوالکتریک خود قرار می‌گیرند، باردار می‌شوند. این مولکول‌های باردار در میدان الکتریکی حرکت می‌کنند که این حرکت بستگی به تراکم بار (نسبت بار به وزن) آن مولکول‌ها دارد و هرچه این تراکم بیشتر باشد مولکول با سرعت بیشتری حرکت می‌کند. برای تعیین تعداد زیر واحدها، جرم مولکولی و بررسی فرم طبیعی پروتئین‌ها از روش‌های مختلف الکتروفورز استفاده می‌کنند. الکتروفورز اولیه‌ای که به کار برده شد تحت عنوان الکتروفورز با مرز متحرک[2] نام گرفت که با مشکلات زیادی مواجه بود. با به کار گرفتن محیط‌های

1- Spectrophotometric

2- Moving boundny electrophoresis

پشتیبان یا نگهدارنده[1] نظیر کاغذ، استات سلولز، سیلیکا، آلومینا و ژل‌هایی نظیر نشاسته، آگارز، پلی‌آکریل‌آمید، ضمن رفع آن مشکلات، شرایط بهتری برای جداسازی، تثبیت و رنگ‌آمیزی پروتئین‌ها به وجود آمد و فن الکتروفورز منطقه‌ای[2] (به دلیل این که در جریان الکتروفورز اجزای نمونه پروتئینی به‌صورت مناطق کاملاً مجزایی از یکدیگر جدا می‌شوند) شکل گرفت.

از میان محیط‌های نگهدارنده، ژل‌پلی‌آکریل‌آمید مساعدترین شرایط لازم برای شناسایی پروتئین‌ها را داشته است. استفاده از این ژل امروزه بسیار متداول است. این ژل از طریق پلیمریزاسیون در حضور پرسولفات آمونیوم (به‌عنوان آغازکننده[3]) و کاتالیزوری به نام TEMED (تترامتیل‌اتیلن‌دی‌آمین) تشکیل می‌گردد. ژل حاصل بی‌رنگ، شفاف، مقاوم در برابر حرارت و افزایش قدرت یونی بافرها و مقاوم در برابر تغییرات وسیع PH بوده رنگ‌آمیزی آن بسیار آسان می‌باشد. مزایای این ژل اینست که با تغییر در غلظت آکریل‌آمید و بیس‌آکریل‌آمید می‌توان اندازه منافذ ژل را تغییر داد. یعنی اگر غلظت آکریل‌آمید بیشتر شود قطر منافذ ژل کوچک‌تر می‌شود و بالعکس (بنابراین از قبل می‌توان ژل مناسب برای نمونه خاص را تعیین کرده سپس اقدام به تهیه ژل کرد) لذا ژل در مقابل مولکول‌ها همچون غربالی عمل می‌کند و همین خصوصیات است که باعث می‌شود پروتئین‌های با اندازه مختلف ولی تراکم بار یکسان به خوبی بر روی این ژل جدا شوند.

به‌طور کلی الکتروفورز بر روی ژل‌پلی‌آکریل‌آمید را می‌توان به دو روش انجام داد:

۱- **الکتروفورز براساس بار الکتریکی:** الکتروفورز و جداسازی نمونه‌های طبیعی پروتئین‌ها براساس بار و اندازه مولکول صورت می‌گیرد و هرچه نسبت بار به جرم مولکول بیشتر باشد حرکت مولکول در میدان الکتریکی بیشتر خواهد بود. این نوع الکتروفورز شرایط خاصی دارد و زمانی به کار می‌رود که شکل طبیعی و فعالیت زیستی پروتئین‌ها محفوظ بماند.

۲- **الکتروفورز براساس جرم مولکولی[4]:** در سال ۱۹۶۹، وبر[5] و اکبُرن[6] نشان دادند که الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید در حضور پاک‌کننده یونی سدیم دو دسیل‌سولفات (SDS) یا لوریل‌سولفات[7] یکی از ساده‌ترین و کارآمدترین روش‌ها برای تعیین وزن مولکولی پروتئین‌های نمونه است. پروتئین‌ها در حضور این ماده غیرطبیعی (دناتوره) شده و در حضور ۲- مرکاپتواتانل یا دی‌تیوتریتول باندهای دی‌سولفیدی آنها احیا می‌شود و به‌صورت زیر واحدها و پلی‌پپتیدهای با ساختمان اول در می‌آیند. SDS از قسمت غیرقطبی خود به نواحی غیرقطبی زنجیرهای پروتئین متصل می‌شود و به‌صورت ماسکی با بار منفی تمام سطح پروتئین را می‌پوشاند که بارهای روی مولکول پروتئین در مقایسه با بار منفی آن بسیار ناچیز می‌باشند و این در حالی است که بارهای مثبت آن را نیز خنثی[8] می‌کند لذا پلی‌پپتیدهای حاصل تقریباً از نظر تراکم بار یکسان می‌شوند و حرکت مولکول‌ها در میدان الکتریکی متأثر از جرم مولکولی خواهد شد. بنابراین می‌توان با استفاده از نمونه‌های استاندارد با وزن مولکولی مشخص، جرم مولکولی پروتئین یا پلی‌پپتید را تعیین کرد.

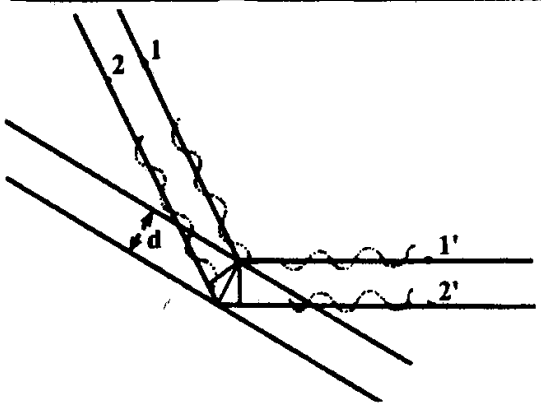
پراش پرتوهای X (پراش Xray)

اساس این روش مبتنی بر پراش پرتوهایی است که از موانعی با ضخامت کم عبور می‌کنند چنانچه یک دسته شعاع نورانی سفیدرنگ (طول موج حدود A° ۵۳۰۰) به شبکه دارای تفرقی که تعداد خطوط آن ۱۰۰۰ در هر

1- Support 2- Zone electrophoresis 3- Initiation
4- Molecular Mass Electrophoresis (SDS . PAGE) 5- Wober 6- Ocborn
7- Lauryl sulfate 8- Neutralize

میلیمتر است برخورد کند (فواصل خطوط 1μ) پراش پیدا می‌کند که با ظهور خطوط (باندهای) مختلفی در طیف پدیدار می‌گردد. در مواردی که طول موج نور به کار رفته مشخص باشد می‌توان میزان خطوط شبکه را از روی میزان زوایای پراش پرتوها محاسبه کرد و بالعکس (شکل ۴-۴۸).

برای این که بتوان طیفی را با اشعه X به‌دست آورد، فاصله بین خطوط بایستی خیلی کمتر از مقدار ذکر شده باشد. برای به‌دست آوردن تفرقی از اشعه X بایستی از شبکه‌هایی که ابعاد بسیار کوچکی دارند مثل بلورهای طبیعی استفاده کرد. آرایش اتم‌ها، یون‌ها یا مولکول‌ها در چنین بلورهایی با شبکه‌ای واقعی مطابقت می‌کند. پراش پرتوهای X به‌خصوص در مطالعه بلورهای مواد آلی و غیرآلی مفید است. با استفاده از این اشعه می‌توان آرایش فضایی متقابل اتم‌های سازنده این بلورها را مشخص کرد. تجزیه ساختمان مولکول‌های آلی پیچیده مثل پروتئین‌ها و اسیدهای‌نوکلئیک به دلیل تعداد زیادی اتم که در ساختمان آنها وجود دارد و همچنین بی‌نظمی‌هایی که در ساختمان سه بعدی آنها دیده می‌شود خیلی دشوارتر است. شناخت ساختمان مولکولی هموگلوبین، میوگلوبین، DNA و کلاژن با استفاده از پراش پرتوهای X موجب پیشرفت‌های قابل توجهی در زیست‌شناسی مولکولی بوده است. روش استفاده از پراش پرتوهای X اساساً مبتنی بر این است که یک دسته اشعه X جهت یافته از نمونه مورد تجزیه مثل بلور هموگلوبین، رشتهٔ DNA و یا کلاژن عبور می‌کند. یک صفحه عکسبرداری در پشت نمونه، تصویر پراش پرتوها را ثبت می‌کند. چنین صفحه‌ای یکسری از لکه‌ها یا نوارهایی را نشان می‌دهد که به‌طور متحدالمرکزی قرار دارند و در نتیجه تداخل امواج تفرق یافته ایجاد شده‌اند. فاصله‌ای که این لکه‌ها یا نوارها را از مرکز تصویر پراش پرتوها جدا می‌کند، انعکاس فاصله موجود بین واحدهای منظم تکرار شونده یا شاخص‌های متناوبی است که در نمونه مورد بررسی وجود دارند.



شکل ۴-۴۸. نشان دهنده عمل یک دسته پرتو X که بر روی دو سطح موازی از یک شبکه بلوری تابانده شده است. دو سطح از یکدیگر به اندازهٔ d فاصله دارند. شعاع‌های ۱ و ۲ با این سطوح زاویه‌ای می‌سازند و پرتوهای ثانوی یا پراش یافته (۱ و ۲) به وجود می‌آیند.

هر چه زاویه پراش کوچک‌تر باشد، فاصله بین واحدهای تکراری بیشتر است. هرچه این فواصل منظم‌تر باشند لکه‌های پراش نیز مشخص‌تر هستند. می‌توان یک سلول شفاف را همانند یک شبکه بلوری سه بعدی در نظر گرفت که در داخل آن اتم‌ها قرار دارند. کاربرد روش‌های خیلی دقیق‌تر مربوط به اشعه X بر روی مولکول‌های آلی مثل میوگلوبین، هموگلوبین و DNA امکان داده است که نه تنها فاصله بین اتم‌ها را در داخل واحد سلولی بلکه توان پراش هر یک از این اتم‌ها را به‌طور مستقل مشخص سازیم. توان پراش اتم‌ها وابسته به عدد اتمی آنهاست و بنابراین با یک پراش الکترونی مطابقت دارد و می‌تواند شاخصی برای شناسایی نوع اتم باشد.

تداخل اتم‌های سنگین (مثل جیوه) به نقاط مشخصی از یک مولکول آلی موجب افزایش توان پراش این مولکول می‌شود. بنابراین اتم سنگین نقطه نشانه‌ای را برای تجزیه ساختمان مولکول موردنظر مشخص می‌سازد.

چنین تجزیه‌ای که بر پایه نشانه‌های (اثرات) تراکم الکترونی استوار است به‌طور مسلم بسیار پیچیده خواهد بود. به هر حال به کمک اطلاعات ریاضی بسیار پیچیده می‌توان در نهایت ساختمان سه بعدی مولکول مورد بررسی را بازسازی کرد. روش پراش پرتوهای X یکی از پرثمرترین روش‌هایی است که در زیست‌شناسی مولکولی و فراساختمانی مورد استفاده است. نه تنها این روش به زیست‌شناسان امکان مشخص‌کردن آرایش مولکول‌ها را داده

است بلکه اندازه‌گیری دقیق فواصلی که مولکول‌ها را از هم جدا می‌سازد و حتی شناخت سازمان اتمی مولکول‌ها را نیز فراهم آورده است (شکل ۸-۴۸).

با دلایل هندسی ساده می‌توان از قانون برگ استفاده کرد و فاصله d را محاسبه کرد ($n\lambda = 2\ d\sin\theta$) که در آن n: تعداد سطوح پراش دهنده؛ λ: طول موج پرتوها؛ d: فاصله سطوح پراش از یکدیگر؛ θ: زاویه تابش پرتوها به سطح پراش دهنده است).

نحوه استفاده از پراش پرتوهای X

برای بیان این مطلب اقدام به انجام تجربه‌ای به این صورت می‌کنیم که: یک صفحه مشبک فرض می‌کنیم که هر خانهٔ آن یک میکرومتر مربع ($1\mu^2$) باشد. اگر دسته‌ای از پرتوهای نوری به این صفحه برخورد کند، پرتوهای پراش یافته تداخل و تشدید پیدا می‌کنند. (نقاط تیره = گره و نقاط روشن = بطن) اگر در مسیر این پرتوها فیلم عکاسی قرار دهیم و فیلم را ظاهر کنیم یک سری لکه‌های تیره که معرف گره‌ها و یکسری لکه‌های روشن که معرف بطن‌ها هستند دیده می‌شوند. فاصلهٔ این لکه‌ها که وابسته به سطوح پراش دهنده یا اندازه خطوط تقسیم است به عوامل مختلف زیر بستگی دارد:

۱- فاصلهٔ سطوح پراش دهنده یا خطوط از یکدیگر ۲- نوع و جنس سطوح پراش دهنده ۳- زاویه تابش پرتوها ۴- طول موج پرتو مورد استفاده (هر چه طول موج کمتر باشد شکست کمتر است).

روش کروماتوگرافی

این روش که هم‌اکنون بسیار پیشرفته است در زیست‌شناسی سلولی اساساً برای جداسازی و شناسایی مواد و ترکیبات مختلف سلولی و شناسایی دقیق آنها مورد استفاده قرار می‌گیرد. اهمیت روش دقت بسیار زیاد آن است که می‌تواند مقدار بسیار کم مواد موجود در عصاره‌های سلولی را تفکیک نماید. اساس روش بر جابه‌جایی ذرات موجود در یک بخش متحرک بر روی یک بخش جامد است. سرعت جابه‌جایی مواد موجود در بخش متحرک با درشتی مولکول‌ها، جرم مولکولی آنها و میل ترکیبی مواد بستگی دارد و بنابراین مواد مختلف بخش متحرک با سرعت متفاوتی در بخش ثابت جابه‌جا شده در نهایت به حسب درشتی و جرم مولکولیشان در جایگاه‌های خاصی از بخش ثابت جایگزین می‌شوند. هم‌اکنون انواع مختلفی از روش‌های کروماتوگرافی برای جداسازی و شناسایی ترکیبات مختلف سلولی به کار گرفته می‌شود که مهم‌ترین آنها عبارتند از: کروماتوگرافی کاغذی[1]، کروماتوگرافی لایه نازک[2]، کروماتوگرافی تبادل یونی[3]، کروماتوگرافی میل ترکیبی[4]، صاف کردن به وسیلهٔ ژل[5]، کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا[6]، گاز کروماتوگرافی[7]. شرح مفصل تمامی این روش‌ها به‌طور معمول در کتاب‌های بیوشیمی آورده می‌شود. در این‌جا برخی انواع کروماتوگرافی را که در زیست‌شناسی سلولی کاربرد متداول‌تری دارد به‌طور خلاصه بررسی می‌کنیم.

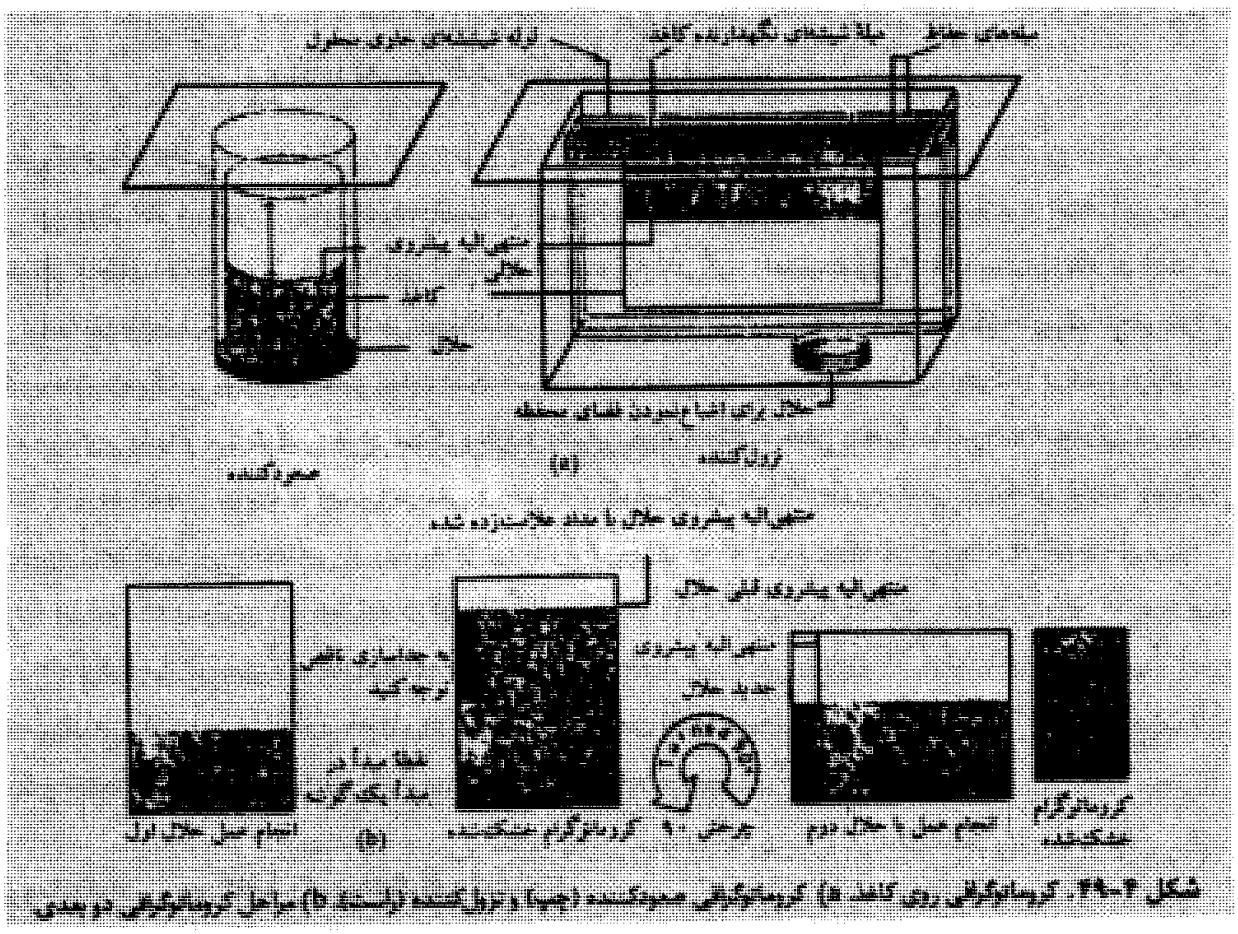
کروماتوگرافی روی کاغذ (کروماتوگرافی کاغذی)

در این فن فاز ثابت یک محیط آبی می‌باشد که مولکول‌های آن با رشته‌های سلولزی کاغذ کروماتوگرافی پیوندهای محکمی دارد و فاز متحرک یک حلال آلی است که به خاصیت مویینگی از خلال کاغذ عبور می‌کند. در

1- Paper chromatography
2- Thin - Layer chromatography
3- Ion exchange chromatography
4- Affinity chromatography
5- Gel filtration chromatography
6- High performance liquid chromatography
7- Gas chromatography

این فن از یک صفحه کاغذ صافی مستطیل شکل که با فاز آبی به خوبی اشباع شده است استفاده می‌شود. پس از آن که کاغذ صافی نیم خشک شد، نمونه را به‌صورت لکه یا خط باریکی در یک طرف آن قرار داده و سپس صفحه را در یک محفظه کاملاً بسته که هوای داخل آن با بخار فاز متحرک اشباع شده است طوری قرار می‌دهیم که لبه کاغذ در ظرفی که دارای فاز متحرک است قرار گیرد (شکل a ۴۹-۴). با خاصیت مویینگی، فاز متحرک به آرامی در کاغذ نفوذ می‌کند و از یک طرف به طرف دیگر جابه‌جا می‌شود. این جابه‌جایی ممکن است بالارونده (کروماتوگرافی صعودی[1]) یا پائین‌رونده (کروماتوگرافی نزولی[2]) باشد. اجزای موجود در نمونه به‌صورت متفاوتی بین دو فاز ثابت و متحرک تفکیک و پراکنده می‌شوند. وقتی که فاز متحرک به نزدیکی لبه مقابل کاغذ رسید عمل را متوقف می‌کنند. پس از خشک شدن کاغذ، مناطق مختلف ایجاد شده در آن را با روش‌های مختلف و مناسب فیزیکی و شیمیایی تفکیک کرده و شناسایی می‌کنند. سرعت حرکت عناصر در این نوع کروماتوگرافی به‌صورت سرعت نسبی (RF[3]) بیان می‌شود که عبارت است از نسبت فاصله طی شده توسط هر جزء موجود در نمونه به مقدار مسافت طی شده به وسیله حلال یا فاز متحرک. محاسبه RF با توجه به فرمول زیر انجام می‌شود:

$$RF = \frac{\text{مسافتی که جزء موردنظر از مبدأ طی کرده است}}{\text{مسافتی که حلال از مبدأ پیموده است}}$$



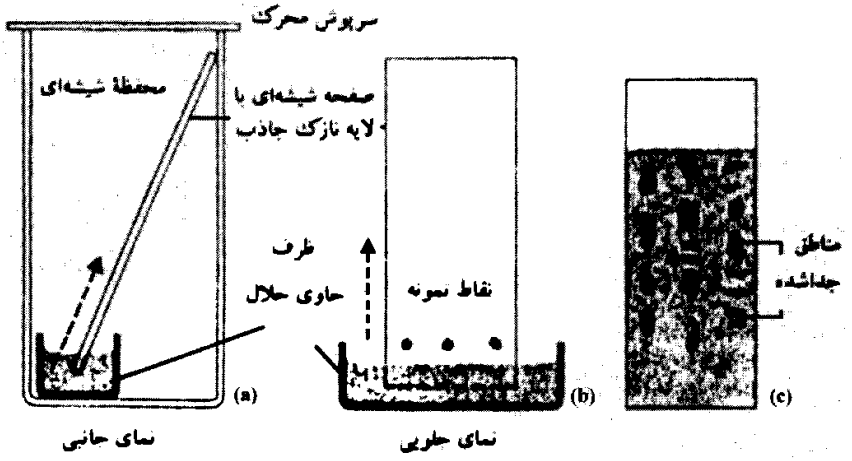
شکل ۴-۴۹. کروماتوگرافی روی کاغذ a) کروماتوگرافی صعودکننده (چپ) و نزول‌کننده (راست) b) مراحل کروماتوگرافی دو بعدی

برای دستیابی به تفکیک بهتر، می‌توان از کروماتوگرافی کاغذی دوبُعدی استفاده کرد. در این حالت پس از پایان مرحله اول کروماتوگرافی، کاغذ صافی را ۹۰ درجه حول محور خود چرخانیده و دوباره با فاز متحرکِ متفاوتی (حلالِ دیگری) عمل را انجام می‌دهیم (شکل b ۴-۴۹).

1- ascending chromatography 2- descending chromatography 3- Relative Factor

کروماتوگرافی لایه نازک

این فن به ویژه برای جداسازی اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع، تری‌گلیسریدها، فسفولیپیدها، استروئیدها، پپتیدها، نوکلئوتیدها و مواد متعدد زیستی دیگر وسیله با ارزشی است. در حقیقت این نوع کروماتوگرافی روی کاغذ است که اصلاحاتی در آن داده شده است، بدین نحو که صفحه‌ای شیشه‌ای یا پلاستیکی که توسط لایه نازک و یکنواختی از مواد جاذب پوشیده شده است جایگزین کاغذ صافی می‌گردد. نحوه عمل بدین طریق است که مواد جاذب انتخابی را به‌صورت غلیظ در آب تهیه کرده و به‌صورت یکنواختی بر روی صفحه شیشه‌ای می‌مالیم تا لایه نازکی ایجاد گردد و اجازه می‌دهیم تا خشک شود (فاز ثابت). پس از آن، نمونه‌ای را که اغلب در حلال فرّاری حل کرده‌ایم به‌صورت نقطه یا خط باریکی بر روی یک لبه لایه نازک مالیده تا زمانی که نمونه خشک گردید صفحه را در ظرف کم عمقی که محتوی حلال آلی با قطبیت کمی است (فاز متحرک) قرار می‌دهیم. حرکت فاز متحرک در لایه نازک که طبق خاصیت مویینگی انجام می‌پذیرد باعث پراکنش عناصر موجود در نمونه بر مبنای تفکیک تمایزی آنها بین فاز ثابت و متحرک می‌گردد (شکل ۴-۵۰).



شکل ۴-۵۰. کروماتوگرافی لایه نازک. (a) و (b) صفحه شیشه‌ای دارای لایه نازک جاذب و نمونه مورد استفاده در ظرف کم عمق دارای حلال قرار داده می‌شود. عمل مویینگی باعث صعود حلال در ماده جاذب می‌گردد (فلش‌ها) و نمونه را به‌صورت یک سری از مناطق مجزا تفکیک می‌نماید (c).

مزایای کروماتوگرافی لایه نازک نسبت به نوع کاغذی، یکی سریع بودن آن است، به‌طوری که به ندرت بیش از ۲۰ تا ۳۰ دقیقه به طول می‌انجامد و دیگر این که به خاطر آزادی عمل در انتخاب لایه جاذب، تفکیک به نحو بهتر و مؤثرتری انجام می‌پذیرد همچنین با مقدار بسیار اندکی از نمونه می‌توان کروماتوگرافی را انجام داد. در جدول زیر بعضی از مواد جاذبی‌که به‌طور متداول مورد استفاده قرار می‌گیرند لیست شده است.

جدول ۴-۲. جاذب‌های مورد استفاده در کروماتوگرافی لایه نازک

جاذب	مواد جدا شده
سیلیکاژل	اسیدهای امینه، پلی‌پپتیدها، اسیدهای چرب، استروئیدها، فسفولیپیدها، گلیکولیپیدها، لیپیدهای پلاسما
آلومینا	اسیدهای امینه، استروئیدها، پادامین‌ها
سلیت	استروئیدها
پودر سلولز	اسیدهای امینه، نوکلئوتیدها
هیدروکسی آپاتیت	پلی‌پپتیدها، پروتئین‌ها
پلی امین امین	نوکلئوتیدها، الیگونوکلئوتیدها

کروماتوگرافی تبادل یونی

پروتئین‌ها و دیگر ماکرومولکول‌های باردار را می‌توان توسط کروماتوگرافی تبادل یونی[1] تفکیک و جدا نمود. برای این منظور به‌طور معمول از استوانه‌های شیشه‌ای که توسط دانه‌های رزین پر شده‌اند، استفاده می‌گردد. رزین‌های مورد استفاده پلی‌مرهایی هستند که گروه‌های یونی شونده زیادی به‌طور شیمیایی به آنها اضافه شده است. انواع رزین‌هایی که بار منفی دارند را تبادل‌کنندگان کاتیونی و انواع بار مثبت را تبادل‌کنندگان آنیونی می‌نامند. زمانی که محلولی از یون‌ها از درون این ستون عبور نماید یون‌ها برای محل‌های باردار رزین با یکدیگر رقابت می‌نمایند و در نتیجه سرعت عبور هر یونی از داخل ستون به میل ترکیبی آن با محل‌های باردار رزین، درجه یونی شدن آن و ماهیت و غلظت یون‌های رقابت‌کننده در محلول بستگی دارد. اختلافی که در سرعت عبور یون‌ها از داخل ستون وجود دارد مبنای اصلی جداسازی پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک توسط این روش می‌باشد، زیرا این مولکول‌ها دارای گروه‌های مثبت و منفی گوناگونی می‌باشند. در جدول زیر بعضی از تبادل کنندگان یونی که برای جداسازی پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک به کار می‌روند لیست شده‌اند. از رزین‌هایی که به نحو فراگیر برای جداسازی پروتئین‌ها استفاده می‌گردند، دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز[2] به‌عنوان تبادل‌کننده آنیونی و کربوکسی‌متیل‌سلولز[3] تبادل‌کننده کاتیونی را می‌توان نام برد.

جدول ۴-۳. تعویض‌کننده‌های یونی که به‌صورت متداول مورد استفاده قرار می‌گیرند

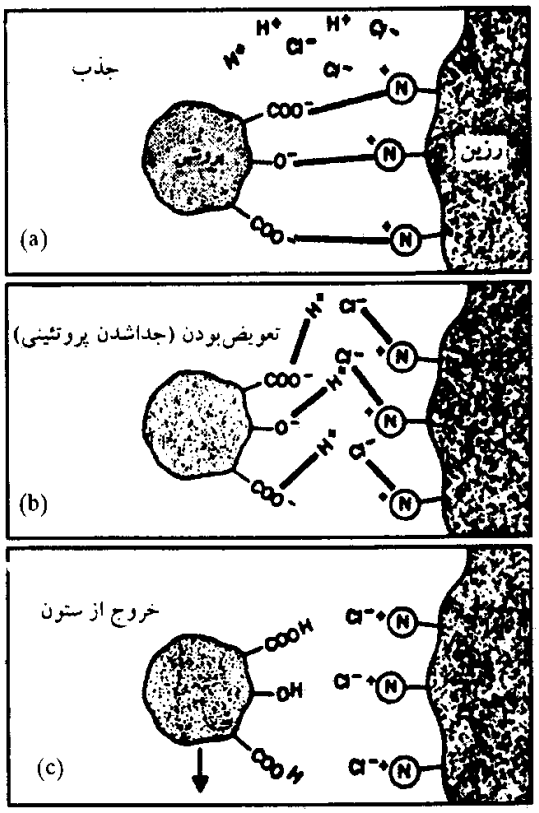
	پلیمر	گروه عمل‌کننده (یونی)
تعویض‌کننده‌های آنیونی		$-O-(CH_2)_2-N^+H-(CH_2H_5)_2$
دی‌اتیل آمینواتیل سولز	سلولز	$-_2-N^+-(C_2H_5)CH_2CHOHCH_3$
سفادکس	سلولز	CH
دوکس - ۲؛ بیو - راد AG_2	پلی‌استرین - دی وینیل - بنزن	$-N^+-(CH_3)_2C_2H_5OH$
پلی‌لیزین - کیزلگور (PLK)	پلی لیزین	$-(CH_2)_4-NH^{+3}$
آمبرلیت IRA - ۴۰؛ بیو - راد AG_1	پلی استرین - دی وینیل - بنزن	$-N^+(CH_3)_3$
تعویض‌کننده‌های کاتیونی		
کربوکسی‌متیل‌سلولز	سلولز	$-O-CH_2-COO^-$
زوکارب ۲۲۵، بیو - راد AG_{50}	پلی استرین	$-SO_3^-$
هیدروکسیل آپاتیت	-	$-PO_4^{-3}$
آمبولیت IRC_{50}	پلی متاکریلات	$-COO^-$
سفادکس SE	دکستران	$-(CH_2)_2-SO_3^-$

عقیده بر این است که کنش متقابل بین رزین و پروتئین به تشکیل پیوندهای الکترواستاتیک بین محل‌های باردار ذرات رزین و زنجیره‌های جانبی بعضی از اسیدهای امینه موجود در پروتئین که بار مخالف بار رزین دارند، منجر می‌گردد و چون تعداد زیادی پیوند تشکیل می‌شود، پروتئین‌ها به‌طور محکم‌تری نسبت به ذرات تک‌باری تشکیل پیوند می‌دهند. برای مثال، در یک PH قلیایی مناسب DEAE - Cellulose قادر به تشکیل پیوند با زنجیره‌های جانبی اسید امینه‌هایی مانند اسید اسپاراتیک، اسید گلوتامیک و تیروزین که دارای بار منفی هستند، می‌باشد. البته میل ترکیب پروتئین برای رزین را می‌توان با تغییرات PH تغییر داد. کاهش متوالی PH تشکیل پیوند بین پروتئین و DEAE - Cellulose را کاهش می‌دهد زیرا یون‌های هیدروژن به زنجیره‌های جانبی منفی پروتئین پیوسته و رزین را جدا می‌سازند. نتیجه مشابهی را می‌توان به وسیله اضافه نمودن یون‌های نمک به‌دست آورد، زیرا افزایش غلظت یون‌ها

1- Ion - Exchange 2- DEAE - Cellulose 3- CM - Cellulose

باعث رقابت آن‌ها با پروتئین‌ها برای محل‌های باردار رزین‌ها می‌گردد (شکل ۴-۵۱).

جداسازی پروتئین‌ها توسط کروماتوگرافی تبادل یونی بدین نحو انجام می‌گیرد: رزین را به‌صورت سوسپانسیون غلیظی در بافر یا محلول نمک تهیه نموده و ستون کروماتوگرافی را با آن پر می‌کنیم. در این زمان بارهای رزین توسط یون‌های موجود در محلول خنثی می‌گردند.نمونه که خود نیز در همان بافر یا محلول نمک حل شده است را بر روی ستون رزین به‌صورت لایه نازکی قرار می‌دهیم. بر طبق PH و غلظت نمک محلول، بعضی از پروتئین‌ها با جدا کردن یون‌ها از محل‌های باردار رزین، جایگزین آنها گشته و با رزین تشکیل پیوند می‌دهند و بقیه پروتئین‌ها در محلول باقی می‌مانند. اگر در این موقع مقداری بافر یا محلول نمک را از داخل ستون عبور دهیم، پروتئین‌های باند نشده با جریان با ضربه طرف پایین ستون حمل می‌گردند. برای جدا کردن بقیه پروتئین‌ها لازم است که PH بافر مورد استفاده و یا غلظت نمک را تغییر دهیم. این عمل باعث تغییر در درجه یونی شدن زنجیره‌های جانبی اسیدهای امینه گشته و یا به نحو مؤثرتری با پروتئین‌ها برای محل‌های باردار رزین رقابت می‌نمایند. در موردی که پروتئین‌ها توسط DEAE - Cellulose یا تبادل‌کنندگان آنیونی دیگر جذب می‌گردند، کاهش PH و افزایش غلظت نمک در محلول می‌تواند منظور ما را برآورده سازد. اگر محلول دوم به مقدار جزئی با محلول اول تفاوت داشته باشد فقط گروه کوچکی از پروتئین‌ها از ناحیه نمونه آزاد شده و به طرف پایین حرکت می‌کنند. در خلال عبور از طول ستون پیوندهای موقتی زیادی بین پروتئین و رزین تشکیل می‌گردد و بنابراین پروتئین‌های مختلف که میل ترکیبی متفاوتی با رزین دارند در زمان‌های متفاوت به پایین لوله می‌رسند. بنابراین به کارگیری محلول‌هایی با PH و غلظت یونی متفاوت نه تنها باعث آزاد شدن گروه دیگری از پروتئین‌های موجود در نمونه می‌گردد بلکه در خلال عبورشان از ستون آنها را به دسته‌های متفاوتی نیز تقسیم می‌نماید (شکل ۴-۵۲).

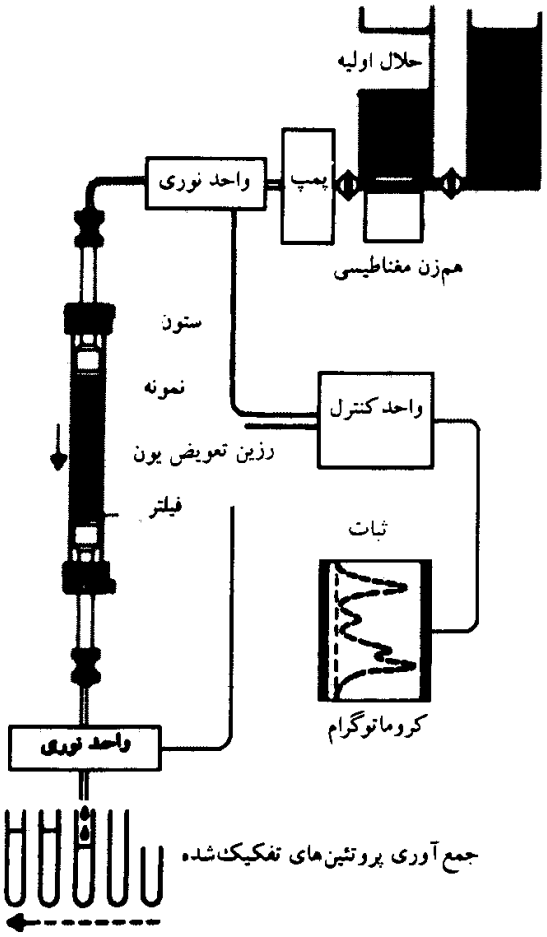


شکل ۴-۵۱. دفع پروتئین از یک رزین تعویض‌کننده آنیونی به وسیله کم نمودن PH حلال. a) یک مولکول پروتئین فرضی به وسیلهٔ تشکیل پیوندهای الکترواستاتیک بین برخی از زنجیره‌های جانبی آزاد اسیدهای امینه و محل‌های با بار مخالف رزین، جذب رزین گردیده. b) با کاهش PH محلول تفکیک‌کننده، یون‌های هیدروژن به نحو مؤثرتری با زنجیره‌های جانبی اسیدهای امینه در ایجاد پیوندهای الکترواستاتیک رقابت می‌کنند و پیوند آنها را با رزین می‌شکنند. c) آنیون‌ها در محلول تفکیک‌کننده (در این مورد Cl^- به رزین باند شده و پروتئین آزاد شده با جریان محلول تفکیک‌کننده به طرف پایین حرکت داده می‌شود. با افزایش غلظت نمک محلول تفکیک‌کننده نیز اثر مشابهی ایجاد می‌گردد. عموماً تغییر PH و افزایش غلظت نمک به‌طور همزمان به کار گرفته می‌شوند تا اثرات توأم آنها به جدا شدن پروتئین بینجامد.

شرایط مورد نیاز برای جدا شدن پروتئین از رزین و خروج آن از ستون به تعداد پیوندهای که بین پروتئین و رزین تشکیل می‌شود بستگی دارد. بنابراین، دو پروتئین با بار خالص سطحی (net surface charge) یکسان (و در نتیجه تحرک الکتروفورزی مشابه) ممکن است در زمان‌های متفاوتی از ستون خارج گردند، به شرط آن که بار مطلق سطحی (absolute surface charges) آنها متفاوت باشد. برای مثال پروتئینی را در نظر می‌گیریم که در شرایط

آزمایش دارای ۸ زنجیره جانبی منفی و ۵ زنجیره جانبی مثبت بر روی اسیدهای امینه خود باشد. بنابراین بار خالص آن ۳- می‌باشد و پروتئین دیگر اگر دارای ۴ بار منفی و ۱ بار مثبت باشد با این که دارای بار خالص مشابهی با پروتئین اول می‌باشد ولی به‌صورت بسیار سست‌تری به رزین اتصال یافته و زودتر نیز جدا می‌گردد، ولی چون هر دو دارای بار خالص یکسان (۳-) است تحرکت الکتروفورزی برابری دارند.

اگرچه بحث بیشتر به جداسازی پروتئین‌ها توسط کروماتوگرافی تبادل یونی اختصاص یافته بود اما با این فن، مخلوطی از اسیدهای نوکلئیک مختلف را نیز می‌توان به نحو مطلوب تفکیک نمود.



شکل ۴-۵۲. دیاگرامی از اجزاء مورد استفاده در کروماتوگرافی تبادل یونی بر روی ستون. حلال قبل از وارد شدن به ستون به میان یک واحد نوری جاذب نور ماوراء بنفش پمپ می‌شود. جذب نوری جریان خروجی ستون نیز مونیتور می‌شود تا با مقایسه جذب نوری حلال قبل و بعد از ورود به ستون آن قسمت از پروتئینی که خارج می‌گردد شناسایی شود. جذب‌های نوری روی صفحه ثبات ترسیم می‌شوند. قله‌های منحنی، پروتئین‌های خارج شده از ستون را نشان می‌دهد.

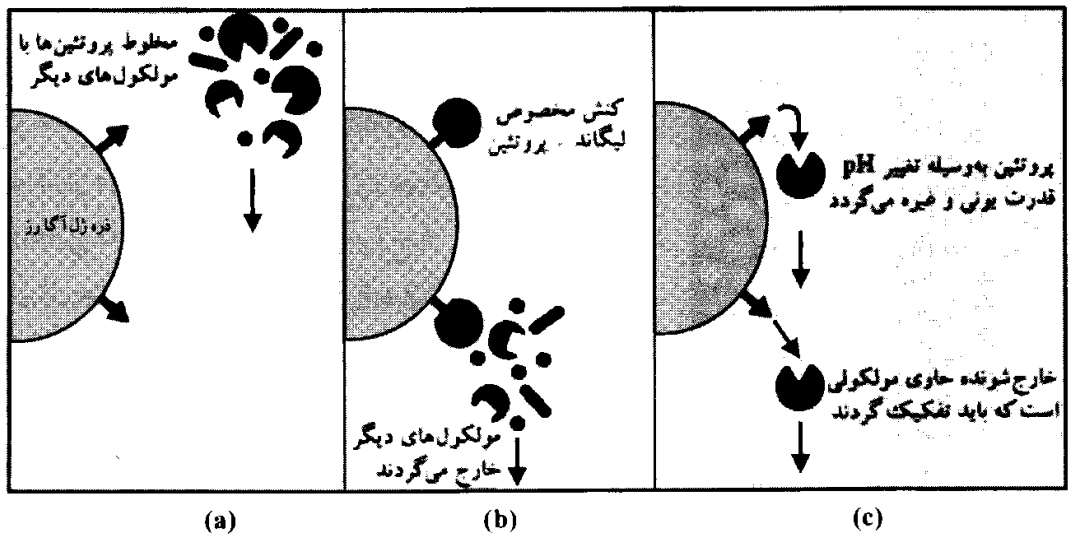
کروماتوگرافی میل ترکیبی

کروماتوگرافی میل ترکیبی[1] نوعی از کروماتوگرافی ستونی می‌باشد که در آن اجزاء موجود در نمونه به واسطه واکنش زیستی با موادی که ستونی را با آن پر نموده‌ایم، عبورشان کند شده و به تعویق می‌افتد. واکنش زیستی که اساس کار این نوع کروماتوگرافی را تشکیل می‌دهد و ممکن است به‌صورت‌های مختلفی د رنظر گرفته شود که عبارتند از: ۱) واکنش پادگن - پادتن ۲) واکنش آنزیم - سوبسترا، و ۳) پیوندهای هیدروژنی بین پلی‌نوکلئوتیدهای مکمل.

ستونی را از ماده متخلخلی مانند ژل (عموماً آگارز یا سلولز) که به آن لیگاندهای به خصوصی به‌صورت کووالانس متصل نموده، پر می‌سازند. زمانی که نمونه از ستون عبور می‌نماید فقط اجزایی از آن که میل ترکیبی بالایی با لیگاند دارند با آن ترکیب شده و بقیه اجزاء به سرعت از ستون خارج می‌گردند. در نهایت اجزاء باند شده با لیگاند را با تغییرات شدید PH یا غلظت یونی از لیگاندها مجزاکرده و به پایین ستون هدایت می‌نمایند (شکل ۴-۵۳).

کروماتوگرافی میل ترکیبی در جداسازی ایمونوگلوبولین‌های به‌خصوص از آنتی‌سرم روش بسیار موفقی می‌باشد. برای این کار ابتدا ژل را با پادگن‌ها ممزوج نموده و زمانی که آنتی‌سرم از ستون عبور می‌نماید، ایمونوگلوبولین‌های به خصوصی با ذرات ژل که به وسیله پادگن پوشیده شده‌اند واکنش نموده و در ستون باقی می‌مانند در صورتی که عناصر دیگر خارج می‌گردند. ژل‌هایی که هورمون انسولین به‌صورت کووالانس به آنها باند شده است برای جداسازی رسپتورهای مخصوص انسولین موجود بر روی سطح غشاء پلاسمایی به کار گرفته

1- affinity chromatography



شکل ۴-۵۳. کروماتوگرافی میل ترکیبی

می‌شوند. آنزیم‌های مخصوص سلولی را نیز می‌توان به وسیله عبور دادن عصاره بافت از ستونی که در آن ذرات ژل توسط سوبسترای آنزیمی و یا موادی از این قبیل پوشیده شده‌اند، تفکیک و استخراج نمود. برای جداسازی mRNA از هموژنات بافت از آگارزی که با پلی‌اوریدیلیک اسید (Poly U) اشباع شده است استفاده می‌گردد، به خاطر وجود انتهای پلی‌آدنیلاتی (Poly A) در بسیاری از mRNAهای یوکاریوتی، پیوندهای هیدروژنی بین آدنین و اوراسیل تشکیل و باعث نگهداشتن مولکول‌های mRNA در ستون می‌گردد.

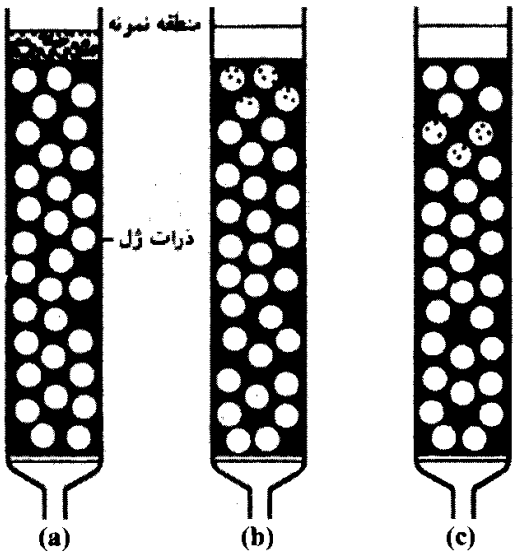
صاف‌کردن به وسیله ژل

در سال ۱۹۵۹ پورات و فلودین[1] صاف‌کردن به وسیله ژل را که یک نوع کروماتوگرافی است ابداع کردند. این روش برای جداسازی مولکول‌های مختلف براساس تفاوت‌های موجود در اندازه یا وزن مولکولی آنها به کار گرفته می‌شود و با نام‌های دیگری از قبیل کروماتوگرافی تخریبی[2]، غربال نمودن مولکولی[3] و یا کروماتوگرافی تراوایی بر روی ژل[4] نیز شناخته می‌شود. در این روش از ستون شیشه‌ای که به وسیله دانه‌های ژل متخلخل و غیریونی پر گشته است استفاده می‌نمایند. چون ژل فاقد گروه‌های یونی می‌باشد بنابراین جداسازی مولکول‌ها صرفاً بر مبنای اندازه مولکولی خواهد بود و ایجاد پیوندهای موقت بین گروه‌های باردار که در بعضی از انواع کروماتوگرافی بدان اشاره شد، در اینجا صدق نمی‌نماید. ژلی که برای این منظور به‌طور متداول از آن استفاده می‌گردد شبکه دکستران[5] است که به واسطه واکنش بین دکستران و اپی‌کلروهیدرین یا اکریل‌آمید ایجاد می‌گردد. دانه‌های ژل با اندازه منافذ متفاوتی را برای این منظور می‌توان تهیه و استفاده نمود. دانه‌های ژل خشک را ابتدا در آب یا بافر قرار داده تا هیدراته و متورم گردد و سپس ستون را از آنها پر می‌نمایند. فضای داخل ستون در این حالت به دو فاز تقسیم می‌گردد یکی محلولی که اطراف دانه‌های ژل را فراگرفته است که به آن فاز حلال[6] گفته می‌شود و دیگری محلولی که در داخل دانه‌های ژل وجود دارد و به آن فاز ژل[7] اطلاق می‌گردد. عبور مولکول‌ها از بین این دو فاز به وزن مولکولی آنها و اندازه منافذ ژل بستگی دارد. هر عنصری که اندازه‌ای درشت‌تر از بزرگ‌ترین منافذ ژل داشته باشد، نمی‌تواند به فاز ژل نفوذ کند و در این

1- J.Porath and P.Flodin
2- exclution chromatography
3- molecular sieving
4- gel permeation chromatography
5- cross - linked dextrans
6- solvent phase
7- gel phase

حالت آن را بالاتر از حد قابل خروج از ژل می‌گویند مولکول‌های کوچکتر تا درجات مختلفی می‌توانند وارد فاز ژل گردند.

اگر مخلوطی از مولکول‌های با اندازه متفاوت را بر روی ستون قرار دهیم و محلولی را از روی آنها عبور دهیم، مولکول‌هایی که بزرگتر از حد قابل خروج از ژل باشند از بین دانه‌های ژل عبور نموده و سریع‌تر از بقیه از پایین ستون خارج می‌گردند. مولکول‌هایی که کوچک‌تر از حد قابل خروج از ژل باشند از طریق هر دو فاز ژل و حلال عبور می‌نمایند و بنابراین خروجشان با تأخیر صورت می‌پذیرد. در نتیجه مولکول‌های موجود در نمونهٔ اصلی سریعاً به دو گروه مجزا تفکیک می‌گردند (مولکول‌های بزرگ‌تر و کوچک‌تر از حد قابل خروج از ژل، شکل ۴-۵۴). در شرایطی که دو مولکول هر دو کوچک‌تر از حد قابل خروج از ژل باشند ولی یکی بزرگ‌تر از دیگری بوده، مولکول بزرگ‌تر سریع‌تر از ستون عبور می‌نماید، زیرا مدت زمان کمتری را نسبت به مولکول کوچک‌تر در فاز ژل صرف می‌کند. بنابراین در این روش حتی مولکول‌هایی که کوچک‌تر از حد قابل خروج از ژل می‌باشند نیز از یکدیگر مجزا گشته و در حقیقت خروجشان برحسب کوچکی اندازه صورت می‌پذیرد، بدین معنی که بزرگ‌ترین مولکول‌ها سریع‌تر و کوچک‌ترین آنها دیرتر از ستون خارج می‌گردند. این روش که وسیله مفیدی برای جداسازی طیف متنوعی از مولکول‌ها نظیر پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، پلی‌ساکاریدها و لیپیدها می‌باشد، برای تعیین وزن مولکولی عناصر ناشناخته نیز به‌طور متداول مورد استفاده قرار می‌گیرد.



شکل ۴-۵۴. جداسازی مولکول‌ها براساس صاف‌کردن به وسیله ژل a) ستون شیشه‌ای دارای ذرات ژل فشرده شده و نمونه که شامل مولکول‌هایی با اندازه‌های متفاوت (ذرات بزرگ و کوچک) می‌باشد به‌صورت لایه‌ای بر روی آن قرار گرفته. b) مولکول‌های با وزن مولکولی بیش از حد قابل خروج از ژل از بین دانه‌های ژل عبور می‌کنند، در صورتی که مولکول‌های کوچک ممکن است وارد فاز ژل گردند. c) در نتیجه مولکول‌ها برحسب اندازه خود به ترتیب به پایین ستون می‌رسند (درشت‌ترین مولکول‌ها سریع‌تر و ریزترین آنها دیرتر خارج می‌گردند).

همان‌طوری که در رابطه با کروماتوگرافی تبادل یونی و الکتروفورز اشاره شد که برای حصول اطمینان از خلوص اجزاء جداگشته، آنالیزهای اضافی موردنیاز می‌باشد، این مسئله در مورد فیلتراسیون به وسیله ژل نیز صادق است، زیرا در مواردی مولکول‌های متفاوت ممکن است دارای اندازه یکسان بوده و با سرعت یکسانی از ستون خارج گردند.

کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا

کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا[1] که اغلب با نام مخففش HPLC شناخته می‌شود، روشی ویژه و بسیار با ارزشی می‌باشد. این روش برحسب ترکیب موادی که برای پر کردن ستون استفاده می‌کنیم و حلال به کار برده شده می‌تواند برطبق اصول کروماتوگرافی‌های سهمی، تبادل یونی، تخریجی و یا میل ترکیبی عمل نماید. ستونی که برای این نوع از کروماتوگرافی به کار برده می‌شود اغلب کوتاه‌تر و باریک‌تر از انواعی است که در فنون دیگری که شرح آنها داده شد، به کار گرفته می‌شوند (معمولاً طولی برابر ۱۰ تا ۲۰ سانتیمتر و قطری برابر ۱ تا ۵ میلیمتر) و همچنین از دانه‌های بسیار ریزتری نظیر مواد جاذب، رزین یا ژل پر شده‌اند. ذرات مورد استفاده برای پر کردن

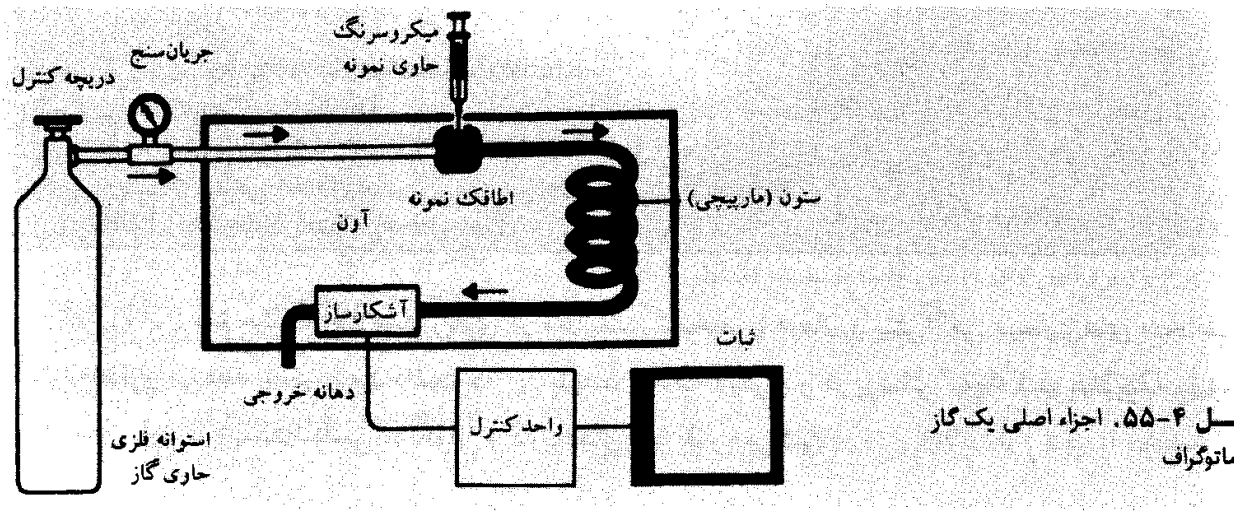
1- high - performance liquid chromatography

کردن ستون‌ها را معمولاً به نحو کاملاً فشرده‌ای در آنها قرار می‌دهند و در این حالت حلال با سختی بسیاری می‌تواند از ورای ستون عبور نماید وبنابراین با استفاده از فشار زیادی برابر با ۵ تا ۸ هزار بر هر اینچ مربع، حلال را از ورای ستون پمپ می‌کنند.

گاز کروماتوگرافی

این فن نوع ویژه‌ای از کروماتوگرافی ستونی می‌باشد که در آن فاز متحرک از گاز تشکیل شده است و برای فاز ثابت محیط مایع یا جامد در نظر گرفته می‌شود. زمانی که فاز ثابت را مایع انتخاب می‌کنیم فن را کروماتوگرافی گاز - مایع[1] می‌خوانند و جداسازی به‌طور عمده بر مبنای تسهیم مولکول‌های موجود در نمونه بین فاز ثابتِ مایع و فاز متحرک گاز صورت می‌پذیرد. در نوع دیگر که به آن کروماتوگرافی گاز - جامد[2] اطلاق می‌گردد، جداسازی بر مبنای جذب تمایزی مولکول‌های نمونه که در حال حمل به وسیله گاز هستند، توسط فاز ثابت جامد می‌باشد. از دو حالت مذکور GLC متداول‌تر است و بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد.

همان‌طوری که در شکل ۴-۵۵ نشان داده شده است اجزای تشکیل دهنده گاز کروماتوگرافی عبارتند از: منبع گاز، اتاقک نمونه، ستون کروماتوگراف، قسمت آشکار ساز و دستگاه ثبّات. گاز که معمولاً نیتروژن، دی‌اکسیدکربن، هلیوم یا آرگون می‌باشد به‌طور فشرده در سیلندری جای داده شده که این سیلندر توسط لوله فلزی به اتاقک نمونه متصل گردیده است. برای تنظیم دقیق جریان گاز، در سر راه خروج گاز از سیلندر ابزارهای اندازه‌گیری دقیقی نصب گردیده است . نمونه توسط میکروسرنگی به داخل اتاقک نمونه تزریق می‌شود. این تزریق از طریق دیافراگمی انجام می‌گیرد که به واسطه خاصیت اتّساعی که دارد سوراخ ایجاد شده در اثر ورود سوزن، خودبه‌خود بسته می‌شود. اتاقک در محفظه‌ای با حرارت بالا قرار داده شده تا اگر نمونه به‌صورت گاز نباشد، در اثر حرارت زیاد به سرعت تبخیر شده و توسط جریان گاز به قسمت بعد که ستون کروماتوگرافی است حمل گردد. جنس ستون از شیشه، مس یا استیل ضد زنگ در نظر گرفته شده و در درجه حرارت بالا درون یک آون[3] قرار گرفته است. معمولاً برای این که لوله تشکیل دهنده ستون را که طویل می‌باشد در فضای کمی جای دهند، آن را به شکل مارپیچ تهیه می‌کنند. موادی که برای پرکردن ستون در نظر گرفته می‌شوند به حسب اینکه جداسازی بر مبنای تسهیم یا جذب صورت پذیرد، متفاوت هستند. در GLC، ستون را از مواد جامد خنثی که توسط مایع غیرفراری اشباع و پوشیده شده است پر



شکل ۴-۵۵. اجزاء اصلی یک گاز کروماتوگراف

1- GLC = gas - liquid chromatography 2- GSC = gas - solid chromatography 3- oven

می‌سازند، در صورتی که فاز ثابت در GSC را مواد جامد جاذبی مانند ذغال یا ژل سیلیکا تشکیل می‌دهد. مولکول‌های گوناگون به‌حسب میزان جذبشان توسط مواد جاذب با سرعت‌های مختلفی توسط فاز متحرک حمل می‌شوند و در زمان‌های مختلفی از انتهای ستون خارج می‌گردند. در نزدیکی خروجی ستون، آشکارسازی که در درون آونی با درجه حرارت بالا جای گرفته است، قرار دارد. این قسمت ترکیب گازهای خروجی را مشخص می‌کند و به وسیله دستگاه ثبّات آنها را به‌صورت قله‌هایی متناسب با مقدار اجزاء جدا شده، رسم می‌کند.

گاز کروماتوگرافی برای جداسازی لیپیدها، اولیگوساکاریدها و اسیدهای امینه پس از تبدیل آنها به مشتقات فرار کاربرد دارد. این فن برای تفکیک اسیدهای چرب متفاوت بسیار موفقیت‌آمیز بوده است. برحسب این که از فاز مایع غیرقطبی یا قطبی استفاده نماییم، اسیدهای چرب برطبق نقطه جوش و اندازه یا میزان اشباع بودنشان تفکیک می‌گردند.

متدهایی که برای جداسازی، استخراج و مطالعه ماکرومولکول‌ها و اجزاء تشکیل دهنده‌شان در این فصل بدان‌ها اشاره شد، به نحو گسترده‌ای در تحقیقات زیست‌شناسی سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرند. کسانی که علاقمند به کار در زمینه زیست‌شناسی سلولی می‌باشند برای کسب اطلاعات کامل‌تر می‌توانند به منابع قید شده در پایان کتاب مراجعه نمایند.

فنون جدید پیرامون پیشرفت‌های مهم در زیست‌شناسی مولکولی

پیشرفت‌های عظیمی که در دهه‌های اخیر در رشته‌های مختلف علوم پایه رخ داد موجب گردید که علم نوبنیاد زیست‌شناسی مولکولی پایه گذاری شود و در طی دو دهه گذشته پیشرفت‌های شایان توجهی بکند. در جدول زیر سیر تکوینی رشد این شاخه از علوم پایه به خوبی معلوم می‌شود.

جدول ۴-۴. برخی از اطلاعات مهمی که در زیست‌شناسی مولکولی بدست آمده است.

پیشرفت‌های مهم در زیست‌شناسی مولکولی	
استخراج DNA	۱۸۶۹
کشف انتقال اطلاعات ژنتیکی به وسیلهٔ DNA	۱۹۴۴
شکل دو رشته مارپیچی DNA	۱۹۵۳
کشف DNA پلیمراز	۱۹۵۷
کشف رمز داکترانسیون که اساس همینداسیون اسیدهای نوکلئیک گردید	۱۹۶۱
تشخیص ژن‌های ژنتیکی	۱۹۶۶
کشف DNA لیگاز	۱۹۶۷
جداسازی آنزیم Rotavirus Reverse Transcriptase	۱۹۷۰
ایجاد دودمان (Clone) برای DNA	۱۹۷۳ و ۱۹۷۴
تعیین سریع توالی‌ها DNA	۱۹۷۷ و ۱۹۷۵
کشف نمایت کتلیکی DNA و همچنین تکامل سیستم‌های موثر Transgenic	۱۹۸۱
روش PCR (Polymerase Chain Reaction)	۱۹۸۵

امروزه این علم جدید، اطلاعات زیادی در مکانیسم، تشخیص، درمان و پیش‌آگهی بیماری‌های مختلف در اختیار ما قرار می‌دهد. شکی نباید داشت که این پدیده، انقلاب دیگری را در پزشکی ایجاد کند. در زیر به مهم‌ترین روش‌های رایج در زیست‌شناسی مولکولی و کاربردهای آنها اشاره می‌شود.

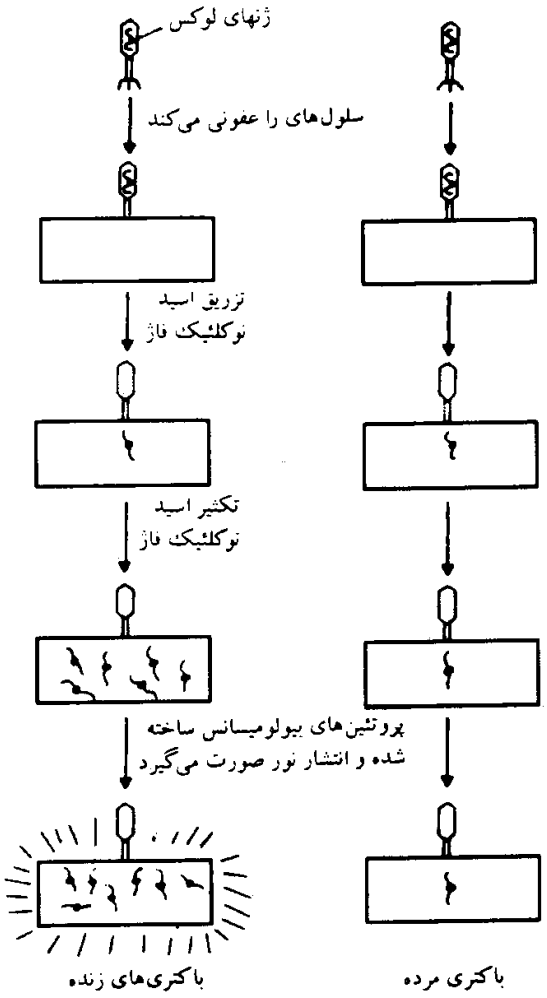
۱- مهندسی ژنتیک

مطالعات بر روی ویروس x۱۷۴ و sv۴۰ از این جهت ممکن گردیده است که کروموزوم‌های آنها کوچک بوده و

می توان آنها را به‌صورت خالص به‌دست آورد. اما یک کروموزوم یوکاریوت دارای مولکول DNAی خیلی بزرگی بوده و در نتیجه مطالعه آن بسیار مشکل‌تر است. در هر حال این مشکل به وسیلهٔ روش‌هایی (که مجموعاً با عنوان مهندسی ژنتیک[1] شناخته می‌شوند) که امکان جداسازی قسمت‌های کوچکی از DNAی یوکاریوت‌ها و پیوند آن به کروموزوم باکتری‌های کوچکی به نام پلاسمید را ایجاد کرده، بر طرف شده است. این DNA سپس می‌تواند به مقادیر زیاد در اشریشیا کلی همانندسازی کند. اگرچه مهندسی ژنتیک اصولاً یک دستاورد فنی است اما اکنون به‌طور وسیعی مورد استفاده قرار گرفته و در پزشکی و صنعت به منظور تولید پروتئین‌های مفید کاربرد دارد. در حقیقت مهندسی ژنتیک مجموعه روش‌هایی است که همانندسازی و ساخت قطعاتی از DNA به منظور مقاصد صنعتی، پزشکی و تحقیقاتی را تسهیل می‌کند.

۲- روش لکّه گذاری و سترن[2]

روش لکّه گذاری و سترن عبارتست از انتقال باندهای پروتئین‌های الکتروفورز شده از روی ژل پلی‌اکریل‌امید به روی یک غشاء. پروتئین‌هایی که بدین ترتیب به‌دست می‌آیند از طریق شیوه‌های مختلف تداخل ویژهٔ پروتئین - لیگاند[3] قابل بررسی می‌باشند. غالباً از پادتن‌ها برای شناسایی پادگن‌های اختصاصی استفاده می‌شود اگرچه از لکتین‌ها[4] نیز برای شناسایی گلیکوپروتئین‌ها استفاده شده است. از این روش به‌طور وسیعی توسط زیست شناسان مولکولی استفاده شده است، ولی هنوز این روش به‌عنوان روشی که بتوان از آن در تشخیص استفاده کرد نیاز به تکامل دارد و در مرحلهٔ نوزادی خود بسر می‌برد. این روش در حال حاضر به‌عنوان روشی بسیار قوی، حساس و غیررادیواکتیو مبتنی بر «لومینسانس شیمیایی[5]» برای شناسایی در اختیار است و بیوشیمیست‌های بالینی باید آن را جهت مصارف خود تعدیل کنند. به‌عنوان مثال از چنین روشی برای تشخیص ورم ماهیچهٔ قلب (میوکاردیت[6]) انسان استفاده می‌شود. با استفاده از روش لکه‌گذاری و سترن نشان داده شده است که بیش از ۷۵٪ از بیماران مبتلا به میوکاردیت و تنها ۴٪ از بیماران مبتلا به انفارکتوس قلبی دارای پادتن‌های خودی برعلیه پروتئین‌های اصلی قلب هستند. (شکل ۴-۵۶).



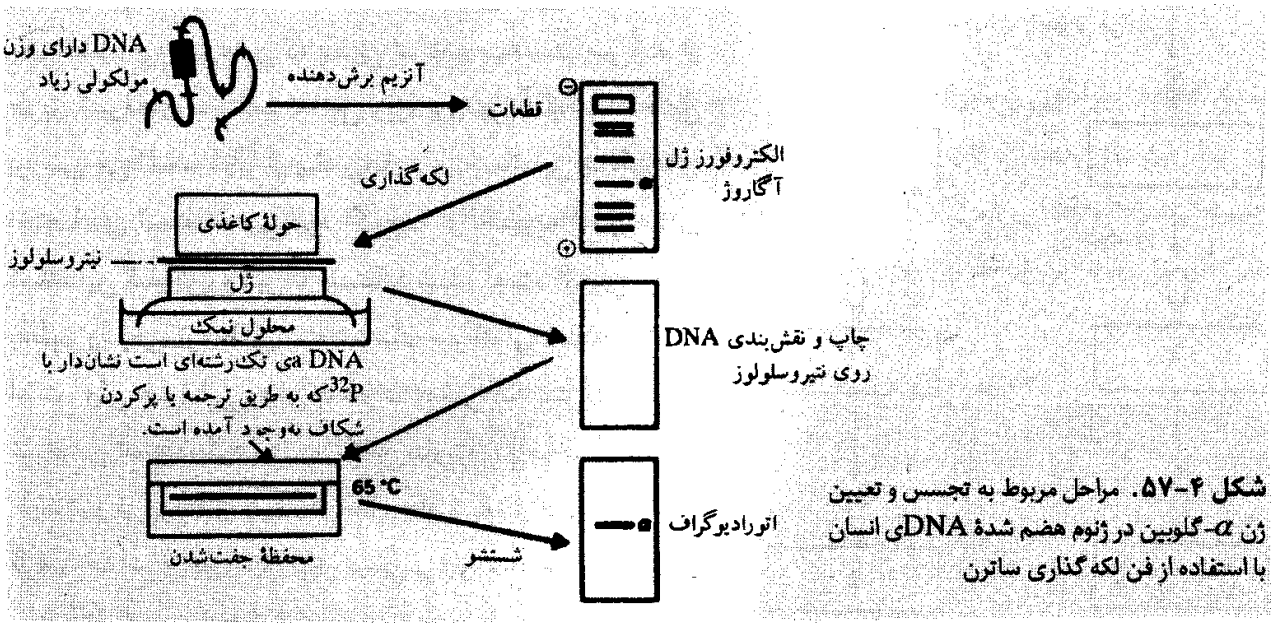
شکل ۴-۵۶. شناسایی باکتری‌های زنده با استفاده از باکتریوفاژهایی که از نظر ژنتیکی طوری تغییر یافته‌اند که پس از آلوده ساختن سلول‌های مستعد، قادر به انتشار نور هستند. برای اطلاع از جزئیات بیشتر ، به متن رجوع کنید.

۳- روش لکه گذاری ساترن[7]

با استفاده از روش «لکه گذاری ساترن»، توان تشخیصی

1- Gentic Enginecring
2- Western Blotting
3- Ligand
4- Lectin
5- Chemiluminescence
6- Myocarditis
7- Southern Blotting

جفت شدن DNA – DNA را می‌توان تا حد زیادی افزایش داد. این روش را به نام ساترن، که در سال ۱۹۷۵ آن را ابداع کرد، نامگذاری کرده‌اند. اصول اساسی این روش در شکل ۵۷-۴ نشان داده شده است. نمونه‌ای از DNA را با یک آنزیم نوکلئاز درونی محدودکننده، برش داده و قطعات ایجاد شده را با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگاروز و براساس اختلاف اندازهٔ آنها از هم جدا می‌کنند. سپس قطعات را با قرار دادن ژل در یک محلول قلیایی به‌صورت تک رشته‌ای در می‌آورند. به دنبال آن ژل را روی دسته‌ای از کاغذ صافی که یک انتهای آن در یک بافر غوطه‌ور است قرار می‌دهند. سپس صفحه‌ای از غشای نیتروسلولزی را روی قسمت فوقانی ژل قرار داده و روی آن (غشاء) مقدار زیادی کاغذ آب خشک کن (یا دستمال کاغذی) می‌گذارند. محلول بافر به وسیلهٔ کاغذ صافی بالا کشیده می‌شود و از ژل و غشای نیتروسلولزی عبور کرده و همراه خود، DNA را به آرامی از ژل خارج می‌کند و روی غشاء نیتروسلولزی منتقل می‌سازد. در مرحلهٔ بعد غشاء نیتروسلولزی را در گرم‌خانهٔ خلأدار خشک کرده و DNA را روی آن ثابت می‌کنند. نتیجهٔ کلی عمل، انتقال مقداری از DNA به همان ترتیب که روی ژل آگاروز قرار داشته بر روی غشای نیتروسلولزی است.



شکل ۴-۵۷. مراحل مربوط به تجسس و تعیین ژن α-گلوبین در ژنوم هضم شدهٔ DNAی انسان با استفاده از فن لکه‌گذاری ساترن

مثال: تجسس جنینی نواقص موروثی و ژنتیکی

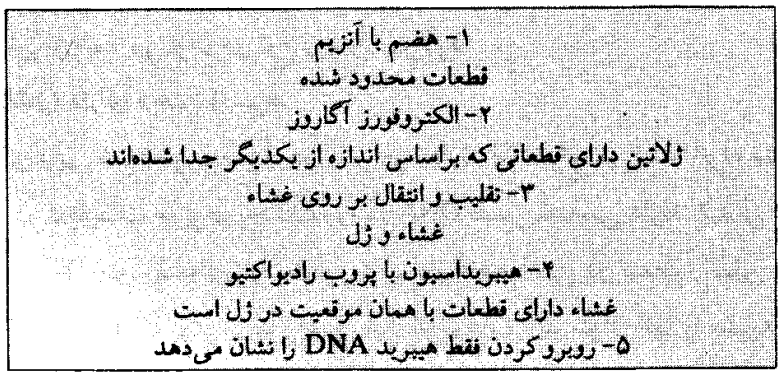
امنیوسنتزیس فنی است که در آن سرنگی را بدقت به درون شکم زن باردار وارد می‌کنند و با آن مقداری از مایع امنیونی (امنیوتیک) اطراف جنین را می‌کشند. مایع جنینی دارای تعدادی سلول (امنیوسیت‌ها[1]) است که از جنین در حال تکامل مشتق شده‌اند و در صورت لزوم می‌توان آنها را کشت داد تا تعدادشان افزایش یابد. از آن جا که DNAی موجود در تمامی سلول‌های سوماتیک به استثنای لنفوسیت‌های B تولید کنندهٔ پادتن یکسان است، سلول‌های امنیونی، تشکیلات ژنتیکی جنین را دقیقاً نشان می‌دهند (اقتباس از کتاب زیست‌شناسی مولکولی گروه مترجمین).

بعد از کشف این نکته که می‌توان مولکول‌های DNA را بر روی غشاهای خالص انتقال داد ساترن توانست قطعات DNA ژنوم انسانی (که از لکوسیت، مایع آمنیوتیک یا هر بافت دیگر استخراج کرده بودند) را جدا و به روی

1- Amniocytes

این غشاها منتقل کند. سپس به وسیلهٔ قطعاتی (به نام پروب) که دارای ترادف اختصاصی نسبت به ژن موردنظر بودند به شناسایی و کشف آن ژن بپردازند. هنگامی که این روش در کنار روش‌های نوترکیبی DNA قرار گیرد، می‌تواند اطلاعاتی در تعیین تعداد نسخ و محل عمل آنزیم بر روی ژن در اختیار قرار دهد. از لحاظ فنی به‌طور خلاصه در این روش بعد از استخراج DNA آن را تحت تأثیر آندونوکلئاز ویژه‌ای قرار می‌دهند. قطعات DNA به‌دست آمده را به وسیلهٔ الکتروفورز بر روی ژل از یکدیگر مجزا کرده و بر روی غشاهای تجارتی‌خاصی‌انتقال می‌دهند (عمل انتقال براساس خاصیت موینگی و یا به کمک الکتروفورز انجام می‌گیرد). مولکول‌های DNA که بر روی غشاء انتقال می‌یابند درست نقطه مقابل خود بر روی آگارز در الکتروفورز می‌باشد. در مرحله بعد این غشاها را با محلول دارای پروبی که قبلاً به روش رادیواکتیو یا غیررادیواکتیو نشاندار شده‌اند مجاور کرده، قطعات همگون[1] (پروب و DNA استخراج شده) با یکدیگر هیبرید می‌شوند. با شستشوهای متوالی می‌توان پروب‌های اضافی را خارج کرده و سپس به بررسی رَد و یا اثر[2] رادیواکتیو (به روش اتورادیوگرافی) و یا غیر رادیواکتیو (با استفاده از آنزیم و پادتن) پرداخت. وجود این علایم دلیل‌بر وجود قطعات DNA دارای ژن موردنظر می‌باشد. روش ساترن بلات روشی بنیادین در تعیین الل‌ها RFLP(Restriction Fragment Lenght Polymorphism) می‌باشد با این حال، روش نسبت به PCR(Polymerase Chain Reaction) پر زحمت‌تر و کندتر می‌باشد. شکل ۴-۵۸ به‌طور ساده مراحل این روش را نشان می‌دهد.

شکل ۴-۵۸. روش Southern Blott



۴- واکنش زنجیری پلیمراز (PCR)[3] و کاربردهای آن

- PCR فنی است که اخیراً توسعه یافته است و متدی است برای تکثیر DNA در in Vitro که در این رابطه از یک آنزیم DNA پلیمراز پایدار به حرارت که از یک باکتری ترموفیل به‌دست می‌آید استفاده می‌شود.
- در مدت زمان کوتاهی میلیون‌ها نسخه از DNA موردنظر را می‌توان تولید کرد.

این روش سریع، نسبتاً ارزان و ساده می‌باشد و فقط نیازمند یک پلیمراز DNA مقاوم به حرارت است.

- از حرارت برای جدا کردن دو رشته مولکول DNA از یکدیگر استفاده می‌شود و هر رشته با استفاده از یک الیگونوکلئوتید کوتاه که به‌عنوان آغازگر[4] عمل می‌کند مورد کپی برداری قرار می‌گیرد.
- در این روش مجموعه‌ای از آنزیم‌ها و مواد موردنظر را در داخل لولهٔ[5] مخصوص ریخته و دستگاه را با

1- Homologous 2- Signal 3- PCR (Polymerase Chain Reaction) 4- Primer
5- Tube

برنامه‌های مشخص کامپیوتری تنظیم[1] می‌کنند. مقدار بسیار کمی در حدود نانوگرم از DNA ژنومی تعداد کمی سلول برای شروع کار کافی هستند.

از حرارت برای جدا کردن دو رشته مولکول DNA از یکدیگر استفاده می‌شود.

- در واقع توسعه و شناخت PCR در سال ۱۹۸۵ یک حادثهٔ بزرگ فنی بود که بسیاری از آزمایشگاه‌های سراسر دنیا را تشویق به مطالعه درباره اسیدهای نوکلئیک کرد.
- اکنون PCR جهت ایجاد دودمان نسخ کمیاب در پروژه ژنوم انسانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش برای تعیین پلی‌مورفیسم‌ژنی در جایی که یک ناحیه از DNA باید مرتباً مورد آزمایش قرار بگیرد لازم است. با این وجود برای PCR باید اطلاعات اولیه از ترادف ژن را در دست داشت و همچنین باید آزمایشاتی برای تعیین شرایط مناسب انجام گیرد. بعلاوه آلودگی‌های کوچک از ترادف‌های دیگر موجب نتایج بسیار اشتباهی می‌شود. وجود کنترل منفی فاقد DNA جهت کشف آلودگی‌های DNA نامربوط برای هر آزمایش PCR لازم است.
- کاربردهای PCR: دامنهٔ وسیعی دارد. PCR غالباً در شناسایی بیماری‌های ژنتیکی که تعیین و شناخته شده‌اند به کار می‌رود. در واقع این ابزار در شناسایی عوامل عفونی، اختلالات سرطان‌زای پلی‌ژنتیکی انقلابی برپا کرده است. همچنین در پزشکی قانونی جهت تشخیص منشأ نمونه اسپرم، خون و مانند آن مورد استفاده قرار می‌گیرد.
- عصای دست محققان در انجام مراحل حساس و تعیین‌کنندهٔ این تحقیقات آنزیم‌های فراوان و متنوعی است که از میان آنها پیش از همه می‌توان دو نوع زیر را ذکر کرد:

الف - آنزیم‌های (آندونوکلئاز) دارای «حد» و شرط

این آنزیم‌ها را از باکتری‌هایی که به‌طور معمول در آن وجود دارند استخراج می‌کنند. انواع متعددی از آنها وجود دارد. اما نوع معینی از آن در تحقیقات مربوط به‌دست‌ورزی DNA نقشی اساسی دارند. بدین ترتیب که قادرند پیوندهای درونی مولکول DNA (دو رشته‌ای) را به‌صورت بسیار اختصاصی (و به‌طور کلی به دو روش) و در محل‌های معینی برش دهند [برای درک بهتر از طرز عمل این آنزیم‌ها، شاید بتوان آنها را مشابه عمل برش توسط قیچی‌هایی دانست که آگاهانه طوری طرح‌ریزی و ساخته شده‌اند که به شکل بسیار اختصاصی (و نه بی‌هدف و تصادفی) به نحوی بسیار ماهرانه در قسمت‌های معینی از پارچه که دارای «بافت خاصی» است برش ایجاد کنند - آنزیم‌های قیچی گونه]. در مورد عمل بسیار اختصاصی این آنزیم‌ها توضیح بیشتر آن که محل تشخیص در توالی بازهای DNA توسط اکثریت بسیار بالا (ولی نه همه) این آنزیم‌ها (بسته به نوع آنزیم) مشتمل بر چهار تا شش (و بندرت هفت) جفت باز است که اتصال فسفودی‌استر را در مولکول DNA دو رشته‌ای (و به‌صورت بسیار ویژه‌ای) می‌شکنند.

امروزه از این آنزیم‌ها که به لحاظ تاریخی از سال ۱۹۷۰ به بعد اولین نمونهٔ آن را محققی به نام هامیلتون اسمیت از باکتری هموفیلوس آنفلونزا استخراج کرد بیش از چهارصد نوع استخراج شده و به‌طور متوسط هر هفته یک عدد بر تعداد آن افزوده می‌شود. محققی به نام رابرت در سال ۱۹۸۴ از ۴۷۵ آنزیم که دست کم به‌طور نسبی تعیین هویت شده‌اند نام برده است.

نظر به نقش کلیدی این آنزیم‌ها در «بیوتکنولوژی» و به‌خصوص قلمرو «مهندسی ژنتیک» به سه نفر از کاشفین

1- Optimise

آنها به نام‌های هامیلتون اسمیت، دانیل‌ناتنز و ورنرآربر جایزه نوبل پزشکی سال ۱۹۷۸ تعلق گرفت.

ب - *آنزیم نسخه‌برداری معکوس*

در سال ۱۹۷۰ دو آزمایشگاه به سرپرستی محققانی آمریکایی به نام‌های: هوواردتیمین و دیویدبالتیمور به‌طور همزمان استخراج آنزیمی ویروسی را گزارش دادند. این آنزیم را از ویروس‌های معینی (ویروس‌ها دارای RNA تومورزا) که در عمل همانندسازی این ویروس‌ها نیز نقشی حیاتی دارد به‌دست آورده‌اند. این آنزیم قادر است با الگو قرار دادن مولکول RNA مولکول DNAای (به نام DNA مکمل یا CDNA) را سنتز کند.

این کشف نیز آنچنان مهم بود که به کاشفان آن (هوواردتیمین، می‌زوتانی و دیویدبالتیمور) جایزه نوبل داده شد. بدین ترتیب وسیله‌ای به‌دست آمد که در نوع خود بسیاری از تحقیقات غیرممکن را عملی گردانید و چنین بود که دیری‌نپایید تا در سال ۱۹۷۰ برای مولکول RNA پیک مربوط به گلوبین با استفاده از این آنزیم مولکول DNA مکمل آن نیز ساخته شد. به زودی این روش به دیگر RNAهای پیک نیز تعمیم داده شد.

۵ سازمان فرامولکولی[1] ساختمان‌های غشایی ابتدایی و لیپوزوم‌ها

بسیاری از مولکول‌های سازنده سلول‌ها که در فصل سوم شرح داده شد، می‌توانند بین خود وارد عمل شده و واحدهای فرامولکولی را بسازند که به نوبه خود، ساختمان‌هایی را به وجود می‌آورند که آنها را می‌توان به کمک میکروسکوپ الکترونی در سلول‌ها شناخت.

این ساختمان‌های ابتدایی (بنیادی) وقتی که مولکول‌های سازنده آنها به حالت زنجیره‌ای قرار گرفته باشند، به حالت تک زنجیره‌ای یا رشته‌ای هستند و وقتی که مولکول‌ها در دو بُعد قرار گرفته باشند، ساختمان دو بُعدی دارند و غشاهای نازکی را می‌سازند. وقتی این ساختمان‌ها به حالت سه بُعدی درآیند، ذرات بلوری یا بی‌شکل را به وجود می‌آورند.

بسیاری از این ساختمان‌ها، خود به‌صورت پلیمرها هستند (برای مثال پروتئین‌ها، پلیمرهایی از اسیدهای امینه هستند)، اما ممکن است مونومرهایی با واحدهای بسیار بزرگی باشند که می‌توانند نوک به نوک پلیمریزه شوند یا می‌توانند به‌صورت جانبی با هم وارد عمل شده ساختمان‌های رشته‌ای، غشایی یا بلوری را به وجود آورند.

در برخی سیستم‌ها، سازمان‌های فرامولکولی می‌توانند با برهم‌کنش‌های خود انواعی از ساختمان‌های بسیار گسترده وقابل مشاهده با میکروسکوپ‌های نوری و حتی با چشم غیرمسلح را به وجود آورند. در بافت‌های جانوری و گیاهی، تعداد زیادی ازاین نوع ساختمان‌های سازمان یافته وجود دارند که می‌توان آنها را به سه گروه تقسیم کرد: یک گروه زیر (فرو) سلولی[2] که، شامل اجزایی مثل غشاها، مژک‌ها و کروموزوم‌ها هستند؛ گروه دوم، برون سلولی[3] که در بیرون از سلول‌ها قرار گرفته‌اند مثل رشته‌های کُلّاژن و رشته‌های کشدار و دیواره‌های سلولزی یا کیتینی؛ گروه سوم، فراسلولی[4] که دارای ساختمان‌های قابل رؤیت با چشم می‌شوند مثل موها، استخوان‌ها، ماهیچه‌ها که دارای سازمان فرامولکولی بسیار پیچیده‌اند.

در تمامی کتاب از نقش چنین ساختمان‌های فراسلولی در جانداران بحث می‌شود. بسیاری از این ساختمان‌های مولکولی در اعمال مکانیکی دخالت دارند مثل: رشته‌های کلاژن که رباط‌های مفصلی، رشته‌های فیبرین که عامل انعقاد خون است و پروتئین‌های ماهیچه‌ای که هنگام انقباض موجب کوتاه شدن ماهیچه می‌شوند. بسیاری از این سازمان‌های فرامولکولی ویژگی‌های آنزیمی دارند و می‌توانند مجموعه‌های چند آنزیمی را بسازند.

یکی از این مجموعه‌های جالب توجه ذخیره (رمزبندی) انتقال آگاهی‌های وراثتی است. اغلب نقش‌های بنیادی این سیستم‌های زیستی، مثل کار اسمزی، اشتراک سلول‌ها، نفوذپذیری‌ها و اکسایش‌ها به‌صورتی بنیادی با این ساختمان‌های پایه‌ای ارتباط دارند.

شکل مولکول‌های پروتئینی

پراکنش پیوندهای کووالانسی، شکل مولکول‌های کوچک را مشخص می‌کند؛ در عین حال برای مولکول‌های

1-supramolecular organization 2- subcellular 3- extracellular 4- supracellular

پلیمر مثل پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک، پیوندهای ثانوی (مثل پیوندهای یونی، هیدروژنی و واندروالس) در مشخص کردن ساختمان سه بُعدی دخالت دارند. برای مثال، در یک مولکول خطی (زنجیره‌ای)، پیوندهای ثانوی درونی می‌توانند موجب چین‌خوردگی مولکولی روی خود و تشکیل شکل گویچه‌ای متراکم شوند. اگر پیوندها مثل حالت زنجیر آلفا(αhelix) بیرونی باشند، مولکول تمایل به حالت کشیده یا رشته‌ای دارد.

از آنجا که پروتئین‌ها در بیشتر موارد در تشکیل ساختمان‌های فرامولکولی موجود در جانداران واردند، بررسی ابعاد و شکل آنها اهمیت دارد (جدول ۱-۵). در مورد پروتئین‌های محلول که، بخش مهمی از مواد سازندهٔ بافت‌های زیستی را تشکیل می‌دهند، لازم به ذکر است که مقدار زنجیرهٔ آلفا در زنجیر پلی‌پپتیدی از ۱۰۰ تا ۳۰٪ تغییر می‌کند. به‌طور معمول، عدم تقارن مولکول تابعی از مقدار زنجیره آلفا در آن است. برای مثال پروتئین‌های ماهیچه‌ای (مثل تروپومیوزین، مرومیوزین سبک، پارامیوزین، میوزین و مرومیوزین سنگین) مقدار زنجیرهٔ آلفا بیش از ۵۰٪ دارند و مولکول‌هایی کشیده (طویل) هستند. برعکس پروتئین‌های گویچه‌ای مقدار زنجیره آلفای کمتری دارند و شکلی کم‌وبیش کروی دارند.

پروتئین‌های گویچه‌ای و رشته‌ای می‌توانند برای تشکیل ساختمان‌های بنیادی با میزان‌های متفاوتی از پیچیدگی، مشترک شوند. برای مثال، انقباض ماهیچه وابسته به تشکیل مجموعه‌هایی است که در آنها بسیاری از پروتئین‌های مشخص شده در جدول ۱-۵ در سازمان ماکرومولکولی پیچیده‌ای دخالت دارند.

جدول ۱-۵. ساختمان مولکولی آلفا پروتئین‌ها (اقتباس از Cohen و دیگران ۱۹۶۶)

نام	مقدار درصد ساختمان مارپیچی	وزن مولکولی	طول تقریبی (نانومتر)
تروپومیوزین	> ۹۰	۵۳۰۰۰۰	۴۰
مرومیوزین سبک (بخش ۱)	> ۹۰	۱۳۵۰۰۰۰	۸۰
پارامیوزین	> ۹۰	۲۰۰۰۰۰۰	۱۲۰
میوزین	۶۵	۵۳۰۰۰۰۰	۱۴۰
مرومیوزین سنگین	۵۰	۳۵۰۰۰۰۰	۴۰
فیبرینوژن	۳۰	۳۴۰۰۰۰۰	۴۶
پرکراتین	۲۰ —	۶۴۰۰۰۰۰	
فلاگرین	۴۰ — (پروتئین‌های گویچه‌ای)	۲۰۰-۴۰۰۰۰۰	۴۱۳
میوگلوبین	۷۰	۱۷۰۰۰۰	۳
آلبومین سرم گوساله	۴۵	۶۸۰۰۰	۵

تجمع ماکرومولکول‌ها

در بحث مربوط به ساختمان چهارم پروتئین‌ها دیدیم که این حد ساختمان دارای توانایی «خودآرایی» است که در نتیجه آن، تعداد زیادی از زیر واحدهای پروتئینی می‌توانند مجموعه‌های بسیار پیچیده‌تری را بسازند. برای مثال، در هموگلوبین، دو زنجیره آلفا و بتا، برای تشکیل یک مولکول کامل (یک تترامر) اندرکنش دارند.

ساختمان‌های چند آنزیمی نمونه‌های دیگری از چنین آرایش‌هایی هستند. برخی انواع این ساختمان‌ها به حالت آزاد در سیتوپلاسم وجود دارند (مثل مجموعه بسیار بزرگ پیرووات دئیدروژناز باسیل‌کولی که دارای سه گروه آنزیمی و در مجموع ۸۸ زیر واحد پروتئینی است). برخی دیگر از آنها در ساختمان غشاءها وجود دارند مثل زنجیر تنفسی در غشاء داخلی میتوکندری.

در پدیدهٔ «خودآرایی» زیر واحدهای پروتئینی دارای اطلاعات لازم برای تشکیل یک مجموعه بسیار بزرگ را به

کمک پیوندهای ثانوی دارند. پدیده «خودآرایی» می‌تواند ماکرومولکول‌هایی پیچیده و نیز ساختمان‌های زیر (فرو) سلولی موجود در سلول را بسازد. علاوه بر این حالتِ سادهٔ «خودآرایی» که در آن هیچ ترکیب دیگری وارد عمل نمی‌شود، اصل «تجمع پایدار شده» نیز وجود دارد که در آن برخی آنزیم‌ها می‌توانند ماکرومولکول‌های لازم برای تجمع را بسازند (برای مثال فیبرین).

در نهایت، حالت «خودآرایی هدایت شده» نیز وجود دارد که در آن ساختمانی از پیش موجود، برای سازمان یافتن ماکرومولکول‌های جدید لازم است. خاطرنشان کنیم که در همانندسازی مولکول DNA و در پدیدهٔ رونویسی (الگوبرداری) RNA، یک چارچوب لازم است که تجمع ماکرومولکول‌های دیگر را هدایت کند.

تجمع (فرآهم‌آیی) ویروسی

ویروس‌ها ساختمان سلولی ندارند و آنها را انگل‌های اجباری سلول‌های یوکاریوتی یا پروکاریوتی می‌دانند[1] بیرون از سلول‌ها، ویروس‌ها فعالیت سوخت‌وسازی ندارند و حتی می‌توان آنها را به حالت متبلور درآورد.

وقتی ویروس‌ها به سلول میزبان نفوذ می‌کنند، همانندسازی ذرات جدید ویروسی را آغاز می‌کنند که اغلب مشابه ماده ژنتیکی خودشان هستند، همچنین ماشین سنتزی (مثلاً ریبوزوم‌های) سلول میزبان را برای اجرای اطلاعاتی که به آنها منتقل می‌کنند، به خدمت می‌گیرند. ویروس‌ها گروهی ناهمگن هستند که ابعادشان بین ۳۰ تا ۳۰۰ نانومتر تغییر می‌کند. به‌عنوان ماده ژنتیکی دارای DNA یا RNA هستند (برخی از آنها مثل انکورناویروس‌ها[2] و پوکس ویروس‌ها[3] هم DNA و هم RNA دارند)؛ عده‌ای دارای پوشش یا پاکت پروتئینی به اسم کپسید[4] هستند و برعکس برخی پوشش پروتئینی ندارند مثل عده‌ای از ویروس‌های RNAی گیاهی.

ویروس‌ها مثال بسیار جالبی برای ساختمان‌هایی هستند که در آنها اصول تجمع ماکرومولکولی وارد عمل است.

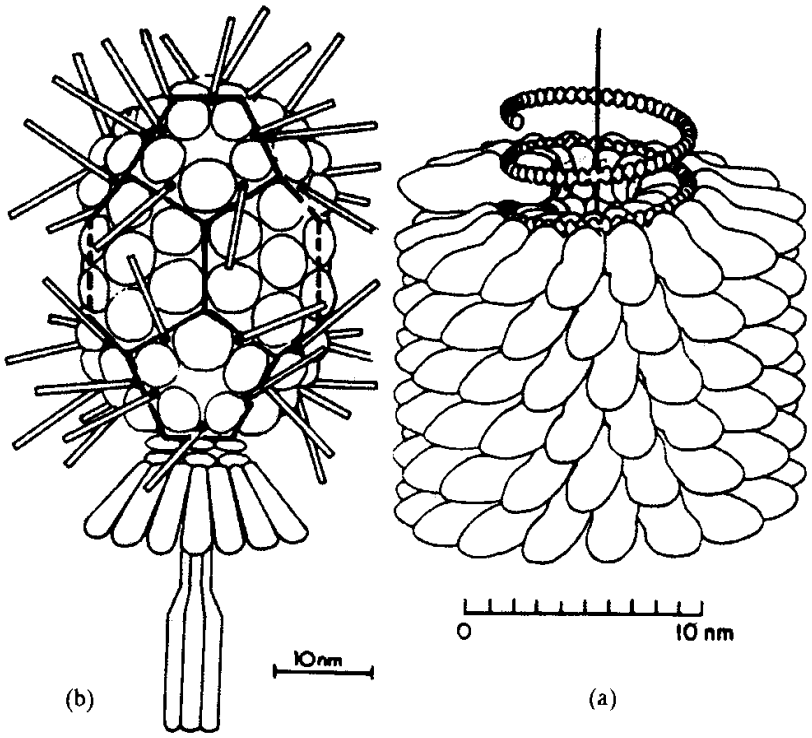
برای مثال ویروس موزائیک توتون، ذرّه‌ای (جرم 10^6 × ۴۰ دالتون) است استوانه‌ای شکل به ابعاد ۳۰۰ × ۱۶ نانومتر. این استوانه دارای یک مولکول تک زنجیره‌ای RNA است که دارای ۶۵۰۰ نوکلئوتید است و مارپیچی را به شعاع ۴ نانومتر و حفره میانی استوانه‌ای ۲ نانومتر می‌سازد؛ ۲۱۳۰ زیر واحد پروتئینی مشابه دارد که جرم مولکولی هر کدام ۱۸۰۰۰ دالتون است (شکل ۱-۵). این زیر واحدها به مارپیچ RNA متصل هستند و پوشش پروتئینی خارجی آن را تشکیل می‌دهند. می‌توان RNA و زیر واحدهای پروتئینی را به صورتی برگشت‌پذیر از همدیگر جدا کرد و سپس دوباره آنها را به حالت ذرهٔ ویروسی فعال بازگرداند. به‌نظر می‌رسد مولکول RNA تمایل به تجمع با زیر واحدهای پروتئینی دارد.

عده زیادی از ویروس‌ها دارای تقارن ۲۰ وجهی هستند. این تقارن وابسته به این است که تجمع زیر واحدهای پروتئینی (کپسومرها) به کپسید ویروسی امکان دهند که در حالت انرژی حداقل بماند. چنین تقارن ۲۰ وجهی در ویروس بسیار کوچکی مثل ۱۷۴ × ϕ هم که تنها دارای ۱۲ کپسومر است و نیز در ویروس بزرگی مثل آدنوویروس که دارای ۲۵۲ کپسومر است وجود دارد.

باکتریوفاژها ویروس‌هایی هستند که به باکتری‌ها متصل شده و ماده ژنتیکی خود را به آنها تزریق می‌کنند. باکتریوفاژ کوچک ۲۹ ϕ که میزبانش باسیلوس سوبتیلیس است و ساختمان ماکرومولکولیش در (شکل ۱-۵ ب) نشان داده شده، مثال جالبی از ویروسی پیچیده است. این باکتریوفاژ دارای هفت پروتئین ساختمانی اصلی است.

۱- هم‌اکنون با توجه به امکان کشت و تکثیر ویروس‌ها در شرایط آزمایشگاهی، تصور انگل اجباری بودن ویروس‌ها مورد بحث است (مؤلفین).

2- Oncorna viruses 3- Poux viruses 4- Capside



شکـــل ۵-۱. a) طرح سازمان مولکولی ویروس موزائیک توتون. مرکز ویروس دارای یک مارپیچ RNA است که به زیر واحدهای پروتئینی متصل شده است. به ازای هر سه باز (نوکلئوتید) زنجیره RNA یک مونومر پروتئینی وجود دارد (اقتباس از Caspar و دیگران، ۱۹۶۲). b) طرح باکتریوفاژ کوچک ϕ۲۹ که میزبانش باسیلوس سوبتیلیس است و دارای ۱۷۲ مولکول پروتئین است که ۱۴۵ تای آن در ساختمان کپسید واردند.

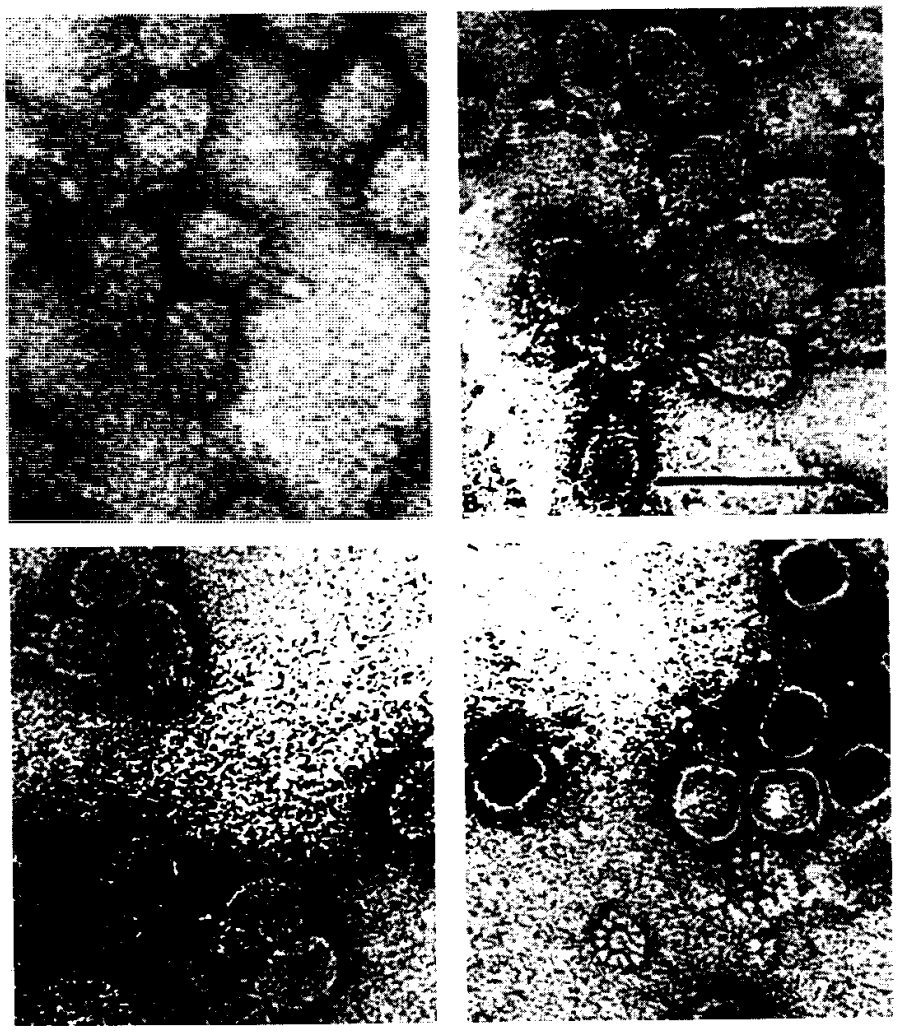
سر آن یک ۲۰ وجهی طویل است که از دو نوع زیر واحد پروتئینی با ساختمان ۵ مونومری و ۶ مونومری تشکیل شده و دارای یک مولکول DNA دو زنجیره‌ای به طول ۵/۷ میکرومتر است. سر به وسیله رشته‌های پروتئینی دیگری پوشیده شده است. بقیه از سه نوع زیر واحد دوم دارای تنها یک نوع زیر واحد، به سر چسبیده‌اند. هر فاژ دارای ۱۷۲ مولکول پروتئین است که ۱۴۵ تای آن در بخش سر قرار دارند. استفاده از اتیلن‌دی‌آمیدتترااستات (EDTA) یا از دی‌متیل - سولفوکسید امکان جداسازی تدریجی قسمت‌های مختلف این باکتریوفاژ را به‌دست می‌دهد. با این ترتیب می‌توان رشته‌های پروتئینی سر، دم و قطعات یقه را از هم تفکیک کرد. همچنین می‌توان DNA را جدا کرد و کپسیدهای خالی را برجای گذاشت.

با میکروسکوپ الکترونی می‌توان این ساختمان‌های مختلف جداشده را مورد بررسی قرار داد (شکل ۲-۵) و با الکتروفورز بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید می‌توان پروتئین‌های سازنده هر کدام را تفکیک کرد. این روش‌های مختلف امکان شناسایی کامل ویژگی‌های زیست فیزیکی و زیست شیمی ترکیبات سازنده این باکتریوفاژ را فراهم ساخته است.

کُلّاژن - تجمع‌های فرامولکولی تروپوکلّاژن[1]

ساختمان کلاژن را به‌عنوان نمونه‌ای از واحدهای رشته‌ای مطالعه می‌کنیم. بررسی این ساختمان به درک اصول تشکیل ساختمان‌های پیچیده مولکولی کمک می‌کنند. کلاژن یکی از پروتئین‌های فراوان در سلسله جانوری است. کلاژن اصولاً به وسیله فیبروبلاست‌ها سنتز می‌شود و بخش مهمی از ساختمان‌های رشته‌ای اساسی جاندار، مثل پوست، زردپی‌ها، غضروف و استخوان‌ها را می‌سازد. توده‌های بزرگ آن با چشم و زیر میکروسکوپ نوری قابل رؤیت هستند؛ اما ساختمان درونی آن تا حد مولکولی تنها با همراه‌کردن مطالعات به وسیله میکروسکوپ الکترونی پراش پرتوهای X، تجزیه‌های شیمیایی و روش‌های مختلف دیگر امکان‌پذیر است. کشف راه‌های مختلف جداسازی رشته‌های کلاژن به واحدهای خیلی کوچک‌تر، به وسایل مختلف (مثل اثر اسیدها) و به دنبال آن تجمع

1- Tropocollagene



شکـــــل ۵-۲. میکروگراف‌های الکترونی از باکتریوفاژ ۲۹ϕ که میزبان آن با سیلوس سوبتیلیس است و تفکیک تدریجی بخش‌های مختلف ویروس‌ها را نشان می‌دهد. A، فاژهای عادی؛ B، فاژهایی که رشته‌های سری را از دست داده‌اند؛ C، فاژهایی که دُم خود را از دست داده‌اند و D، فاژهایی که یقه را از دست داده‌اند. در حالت آخر، بعضی کپسیدها محتوای DNAی خود را از دست داده‌اند. اندازه‌ای که در تصویر B نشان داده شده برابر ۵۰ نانومتر است. (اقتباس از Vasquez)

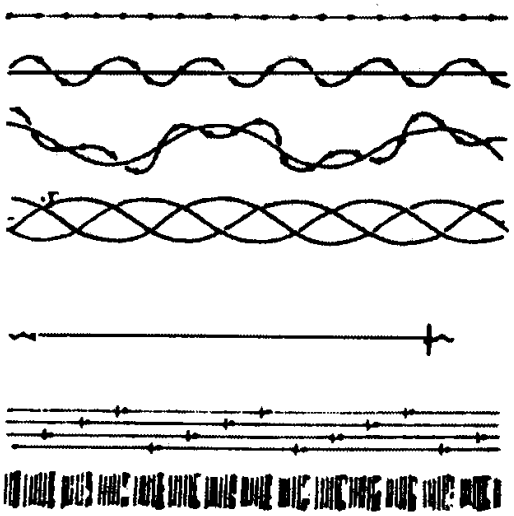
دوبارهٔ این واحدها با یکدیگر یکی از مسائل مهم زیست‌شناسی سلولی است.

وزن مولکولی مولکول کلاژن ۳۶۰۰۰۰، طول آن حدود ۲۸۰ نانومتر و عرض آن ۱/۴ نانومتر است. مولکول کلاژن از سه زنجیر که به صورتی مارپیچی به‌هم پیچیده‌اند (مطابق آنچه در شکل ۳-۵ دیده می‌شود)، ساخته شده است. جالب است یادآور شویم که ترکیب کلاژن از اسیدهای امینه ترکیبی ساده است: حدود $\frac{1}{3}$ آن از گلیسین، $\frac{1}{3}$ از پرولین و هیدروکسی پرولین و $\frac{1}{3}$ باقیمانده از اسیدهای امینه دیگر ساخته شده است.

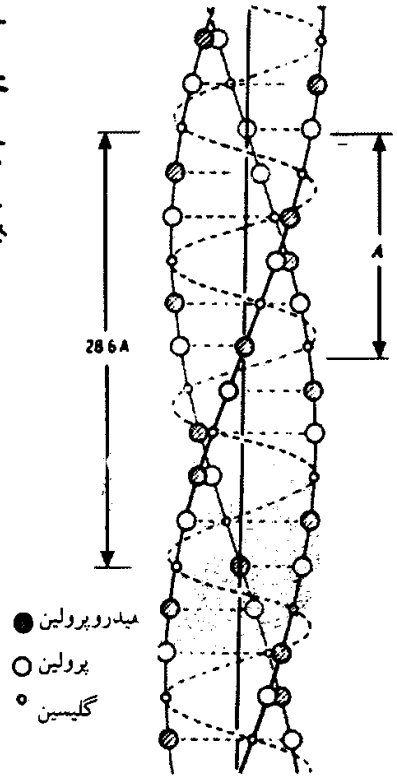
این واحد مولکول کلاژن، که به آن «تروپوکلاژن» نیز می‌گویند را می‌توان یک مونومر ماکرومولکولی در نظر گرفت، زیرا در نتیجه عمل متقابل می‌تواند «به دور خود بپیچد» یا ساختمان‌های مختلف دیگر کلاژن را به وجود آورد.

تصور می‌شود که مولکول تروپوکلاژن، با ابعادی که مشخص شد، مولکولی قطبی شده (پلاریزه) باشد، یعنی مولکول‌های اسیدهای امینه با ترتیب خطی مشخص در شاخه‌های درون مولکول قرار گرفته باشند. بالاخره در نتیجه برهم‌کنش درونی، مولکول تروپوکلاژن به‌صورت مولکولی دارای یک «سر» و یک «دُم» در نظر گرفته می‌شود (شکل ۵-۳).

پراش پرتوهای X و میکروسکوپ الکترونی نشان داده‌اند که رشته‌های کلاژن به حالت طبیعی از رشته‌های با تناوب حدود ۷۰۰ A° تشکیل شده است. پس از خشک‌شدن، این تناوب‌ها به ۶۴۰A° کاهش می‌یابند. توجیه ارتباط بین مولکول تروپوکلاژن با طول ۲۸۰۰A° و این تناوب‌های ۷۰۰ آنگستروم‌ی رشته‌ها دشوار بوده است. برای بیان این ارتباط لازم بوده است که کلاژن با حضور تعداد زیادی از گلیکوپروتئین‌ها، یا ATP بازسازی شود. با این روش تشکیل دو نوع دیگر از رشته‌ها نیز عملی شده است (شکل ۵-۴). یکی از آنها از رشته‌های طویلی با طول حدود ۲۸۰۰ A° و دیگری از قطعات کوتاهی که دارای

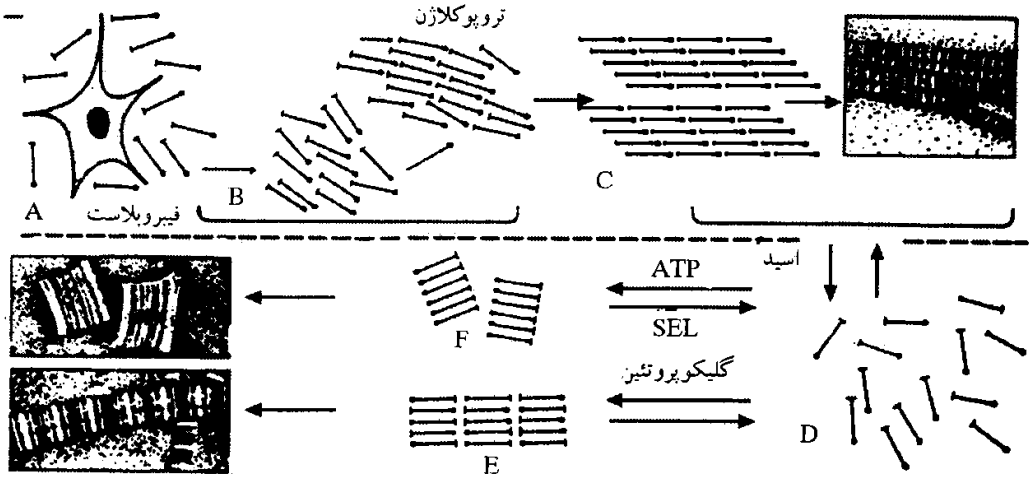


شکل ۵-۴. نشان‌دهنده سازمان کلاژن با درشت‌نمایی‌های مختلف؛ در قسمت بالا: مولکول پروتوکلاژن با ساختمان «سر»، «دُم». در قسمت پایین: رشته کلاژن با تناوب ۷۰۰A° و پراکنش مولکولی این ساختمان.



شکل ۵-۳. ساختمان مولکول کلاژن با مارپیچ دارای سه پَر (انشعاب)

تناوبی همانند هستند ولی پلیمریزاسیونی نشان نمی‌دهند، ساخته شده است. محتمل‌ترین طرز بیان این نتایج در اشکال ۵-۴ و ۵-۵ مشخص شده است. فنرهای کلاژن به حالت طبیعی با تناوب ۷۰۰ A°، از اشتراک جانبی مولکول‌های تروپوکلاژن که با فواصلی به اندازهٔ $\frac{1}{4}$ طول مولکولشان درهم رفته‌اند ایجاد می‌شود. در چنین شرایطی (حالتی)، در نظر می‌گیرند که مولکول‌ها از جهت طولی مشترک می‌شوند و سر یک مولکول با دُم مولکول دیگر مشترک می‌گردد. کلاژن رشته‌ای دارای فضایی (فاصله‌ای) طولانی است که با برهم‌کنش یک گلیکوپروتئین پر شده است، درهم‌رفتگی جانبی وجود ندارد و مولکول‌های تروپوکلاژن در کنار یکدیگر مجتمع شده و به‌طور تصادفی در جهتی خطی به‌هم مربوط می‌شوند. در قطعات دارای فضای (فاصله) طولانی که با برهم‌کنش ATP پر شده است، تصور بر اینست که مولکول‌های پروتوکلاژن از جهت جانبی درهم‌رفتگی ندارند و از جهت طولی نیز به دلیل این که همه در یک حالت هستند نمی‌توانند به‌هم متصل شوند (شکل ۵-۵).



شکل ۵-۵. طرح تشکیل و بازسازی کلاژن یک فیبروپلاست a) مولکول تروپوکلاژن b) را می‌سازد که کلاژن به حال طبیعی c) را تشکیل می‌دهد. رشته‌های کلاژن در یک محلول اسیدی حل شده‌اند d) و تروپوکلاژنی که از آن به‌دست می‌آید، با حضور یک گلیکوپروتئین، یک کلاژن رشته‌ای با فاصله طولانی (فضای زیاد) را می‌سازد e)؛ در حضور ATP، یک کلاژن قطعه‌قطعه با فاصله طولانی f) را به وجود می‌آورد. فاصله زیاد ۲۸۰۰ A° از توده‌های جانبی مولکول‌های تروپوکلاژن بدون درهم‌رفتگی ایجاد می‌شود. فضای (فاصلهٔ) ۷۰۰ A° رشته‌های کلاژنِ طبیعی از درهم‌رفتن مولکول‌های تروپوکلاژن ایجاد می‌شود.

پدیده برهم‌کنش ماکرومولکولی کلاژن یکی از پدیده‌های مهم زیستی است زیرا به احتمال در سایر مجموعه‌های (سیستم‌های) پروتئینی نیز وجود دارد. بالاخره، نتایج مشابهی از برخی پروتئین‌های ماهیچه‌ای مثل پرامیوزین و ترمبوزین نیز به‌دست آمده است.

انعقاد خون

پروسه جالب انعقاد خون یکی دیگر از اعمال مکانیکی است که به وسیله ترکیبات مولکولی پیچیده صورت می‌گیرد. مولکول فیبرینوژن نامتقارن و دارای وزن مولکولی ۳۴۰۰۰۰ است. با میکروسکوپ الکترونی به‌نظر می‌رسد که این مولکول دارای ۳ غلاف است (با ضخامت حدود A° ۶۵ برای هر یک) که به وسیله رشته باریکی به قطر A° ۱۵ به‌هم متصلّند. به حسب PH، طول کلی آن بین ۲۳۰ تا A° ۴۶۰ تغییر می‌کند. تحت تأثیر ترومبین، فیبرینوژن با از دست دادن پپتید کوچکی فعال می‌شود و به این ترتیب می‌تواند با مونومرهای دیگری وارد عمل شود. اتصال نوک به نوک (دنبال هم) موجب پیدایش رشته‌های طویل فیبرین می‌شود. اما به‌نظر می‌رسد که اتصال‌های جانبی دیگر و اتصال‌های افقی نیز به‌طور ایجاد یک شبکه تشکیل می‌شوند. به‌تدریج که عمل انعقاد پیش می‌رود، با دخالت پلاکت‌های خون، فیبرین دوباره ساخته می‌شود، سرم خون جداشده و لخته خون، به وجود می‌آید.

نیروهای فیزیکوشیمیایی

ماهیت نیروهای فیزیکوشیمیایی که در این اعمال متقابل مولکولی مختلف وارد می‌شوند بسیار متنوع است. برای مثال، این که رشته‌های کلاژن در اسیدهای آلی ضعیف حل می‌شوند ایجاب می‌کند که پیوندهای یونی و پیوندهای هیدروژنی در کار باشند. در انعقاد خون، پدیده پیوند مولکول‌ها، خیلی پیچیده‌تر است زیرا عمل متقابل نیاز به فعالیت آنزیمی دارد.

در پروتئین‌های دیگر، نظیر آنهایی که انواع مختلف رشته‌های کراتین را می‌سازند، پیوندهای خیلی قوی‌تر S − S وجود دارند. در سلول توده‌های شُل (سست) و بازگشت‌پذیری از پروتئین‌ها یافت می‌شوند. این تغییر و تبدیل‌های پروتئین‌های گویچه‌ای و پروتئین‌های رشته‌ای در برخی پدیده‌ها (مثل حرکت آمیبی، سیکلوز یاتشکیل دستگاه تقسیم) دیده می‌شود که ضمن آنها بخش‌هایی از زمینه سیتوپلاسمی جابه‌جا می‌شود. تشکیل ریز لوله‌ها و ریز رشته‌ها اغلب مستلزم این تغییر و تبدیل‌ها است.

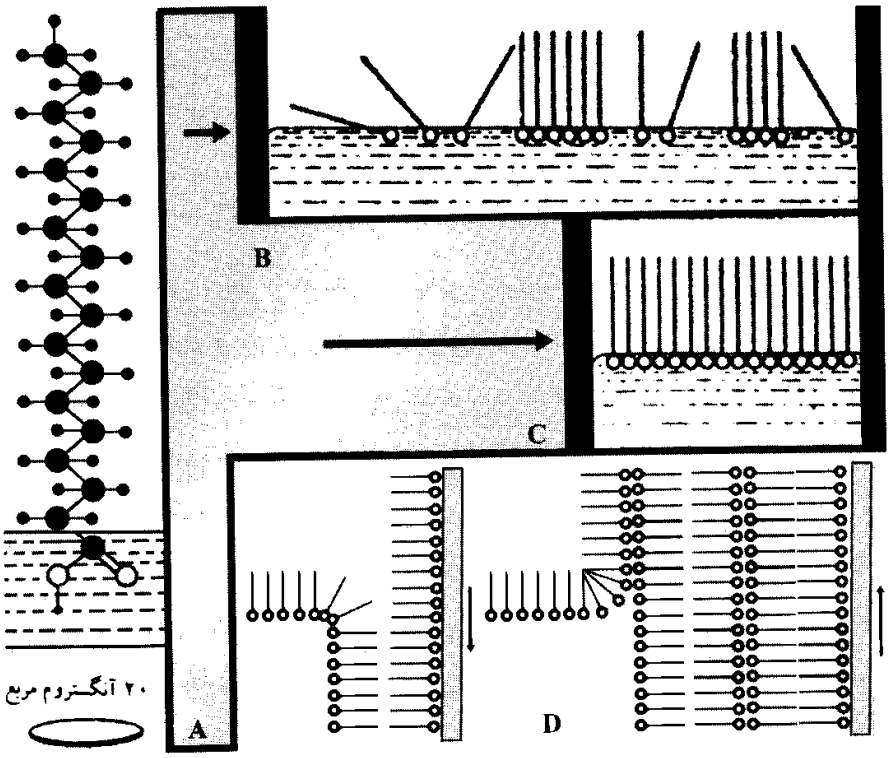
ساختمان‌های غشایی اولیه

غشاءهای زیستی از برهم‌کنش لیپیدها و پروتئین‌ها حاصل می‌شوند، اما مشخص کردن آرایش مولکولی این مواد سازندهٔ غشاءها دشوار است. کاربرد مدل‌ها و لایه‌های یک مولکولی مصنوعی امکان درک بهتری از این ساختمان‌های طبیعی را فراهم می‌سازد.

لایه‌های یک مولکولی[1]

تاکنون به اهمیت ساختمان برخی لیپیدها اشاره کرده‌ایم. اسیدهای چرب، فسفولیپیدها، کلسترول و استرهای کلسترول می‌توانند به‌صورت لایه‌های متّحد (واحد) با ضخامت ثابت انباشته شوند. در چنین ساختمانی طرز قرارگرفتن (جهت) لیپیدها به ساختمان دو قطبی: گروه‌های قطبی و زنجیر هیدروکربنی غیرقطبی آنها بستگی دارد (شکل ۵-۶).

1- films monomolecular

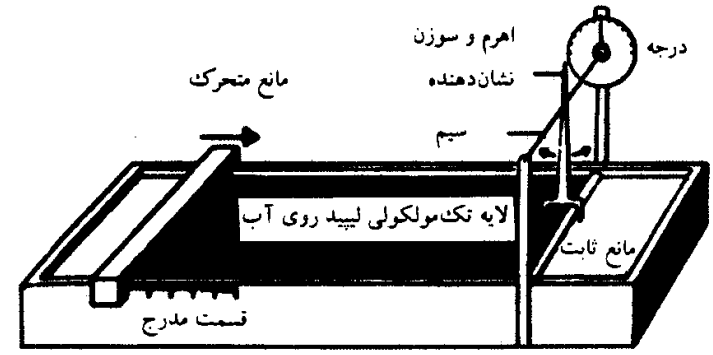


شکل ۵-۶. طرح روش مورد استفاده برای ساختن لایه‌های یک مولکولی. a)، مولکول اسید استئاریک با گروه قطبی غوطه‌ور در آب. b)، در فشار کم، مولکول‌ها در جهات مختلف قرار می‌گیرند یا به‌صورت توده‌های فشرده درمی‌آیند. c)، در فشار زیاد مولکول‌های خیلی نزدیک به‌هم قرار می‌گیرند حالت قائم دارند. قسمت‌های دایره‌ای بخش قطبی مولکول‌ها و قسمت‌هایی که به‌صورت خط مستقیم نشان داده شده، بخش هیدروکربوری غیرقطبی آنها را مشخص می‌سازد. d)، روش ساختن لایه‌های یک مولکولی در سطح تماس هوا - آب. در سمت چپ، یک لام شیشه‌ای که از قبل لایه‌ای یک مولکولی در سطح آن قرار گرفته در داخل تشتکی از آب غوطه‌ور می‌شود و در مقابل آن، لایه یک مولکولی دیگری قرار می‌گیرد. لایه یک مولکولی دوم با بخش‌های انتهایی غیرقطبی به لایه اول متصل می‌شود. در سمت راست، تعداد زیادی از لایه‌های دو مولکولی استئارات باریم که روی لام‌های شیشه‌ای غوطه‌ور در آب قرار داشته‌اند به‌تدریج در مقابل هم قرار گرفته‌اند.

با تشکیل لایه‌ای بر سطح آب می‌توان این خصوصیات لیپیدها را مطالعه کرد. روش تشکیل لایه‌های یک مولکولی یکی از مسائل بسیار جالب زیست‌شناسی است. ترازوی لایه‌ها، که در ۱۹۱۷ به وسیله لانگ‌موئیر[1] ابداع شده است، هنوز ابزار اصلی در مطالعه این لایه‌هاست. این ترازو از تشتک پرآبی ساخته شده که بر روی آن ماده موردنظر گسترده می‌شود. یک محور یا سدّی می‌تواند سطح را به منظور حصول لایه موردنظر کم‌کند. کشش سطحی برقرار شده به وسیله لایه را می‌توان به کمک یک ترازوی حساس که به غوطه‌ورکننده‌ای در سطح آب ارتباط دارد، اندازه‌گیری کرد. برای مثال، چنانچه اسیداستئاریک در حلّال فرّاری حل شده و در سطح آب، قرار گیرد، مولکول‌ها تا کسب یک حالت توازن گسترده (پخش) خواهند شد. تبخیر حلّال موجب تشکیل لایه‌ای با ضخامت یک مولکولی می‌شود. از آنجا که مولکولی دوقطبی است، گروه قطبی (COOH −) به وسیله مولکول آب گرفته شده و زنجیر هیدروکربنی غیرقطبی تمایل دارد به صورتی مستقیم، در سطح قرار گیرد. در آغاز، تعدادی از مولکول‌ها کاملاً کشیده و مستقیم نیستند زیرا سطح زیاد است. به‌تدریج که سد یا محور به سوی طرف دیگر تشتک فشرده می‌شود، سطح کاهش می‌یابد و مولکول‌ها تا ایجاد یک لایه کاملاً متراکم فشرده می‌شوند (شکل ۵-۷).

در چنین شرایطی، به دلیل جنبش افقی و دافعه الکتریکی، مولکول‌ها فشاری اعمال می‌کنند که می‌توان آن را به

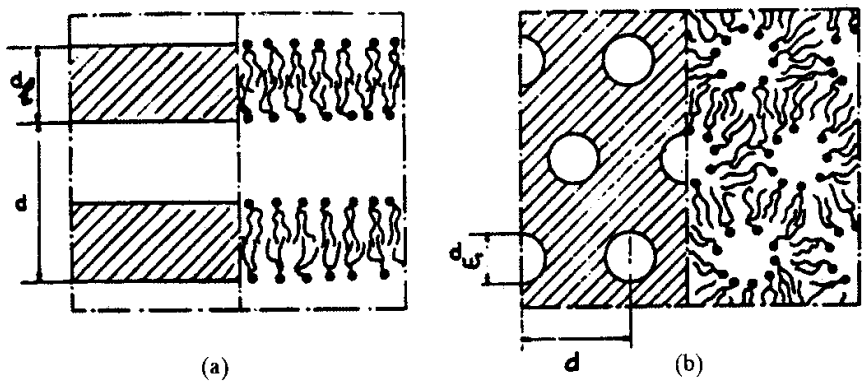
1- Longmuir



شکل ۵-۷. ظرف لانگ‌موئیر

ظرف کم‌عمق

کمک ترازوی لانگ‌موئیر اندازه‌گیری کرد. وقتی تعداد مولکول‌ها و سطح کل اشغال شده به وسیله لایه در لحظه فشار حداکثر مشخص باشند، سطح متوسط هر مولکول را می‌توان محاسبه کرد. برای مثال، مولکول اسیداستئاریک تقریباً ۲۰ A° مربع را اشغال می‌کند (شکل ۵-۸).



شکل ۵-۸. ساختمان بلور مایع در فازهای فسفولیپید - آب a) ساختمان لایه‌ای و b) ساختمان شش وجهی است؛ dp ضخامت لایه لیپیدی؛ dw ضخامت لایه آب؛ d تناوب آب - لیپید

این روش همچنین امکان می‌دهد که ضخامت لایه یک مولکولی اندازه‌گیری شود (۲۵ A° برای اسیداستئاریک). ضخامت با تعداد اتم‌های کربن بستگی دارد. لایه یک مولکولی را می‌توان بر سطح یک لام شیشه‌ای غوطه‌ور در آب قرار داد. با غوطه‌ور ساختن‌های تدریجی و دنبال هم (به صورتی که در شکل ۵-۶، D نشان داده شده) می‌توان لایه‌های دو یا چند مولکولی را ساخت. جالب است ذکر کنیم که گروه‌های قطبی یکدیگر را به خود گرفته و همین حالت برای گروه‌های غیرقطبی نیز صادق است، به این ترتیب می‌توان لایه‌های دو مولکولی شبیه لایه‌های زیستی ساخت.

تاکنون از این روش برای اندازه‌گیری ضخامت غشاء گویچه سرخ به وسیله مقایسه آن، با نوری که از لایه‌های یک مولکولی استئارات باریم با ضخامت مشخص منعکس می‌شود استفاده شده است. دستگاه نوری که بدین منظور مورد استفاده قرار می‌گیرد لپتوسکوپ[1] است که در حال حاضر کاربرد زیادی ندارد زیرا با میکروسکوپ الکترونی می‌توان اطلاعات مستقیم‌تری را در این زمینه به‌دست آورد. با استفاده از روشی که توضیح داده شد می‌توان مجموعه‌های (سیستم‌های) چند لایه‌ای را ساخت که در ارتباط با پراش پرتوهای X نتایج زیادی به‌دست می‌دهد و از این راه می‌توان فاصله یا تناوب بین لایه‌ها را اندازه‌گیری کرد.

1- Leptoscope

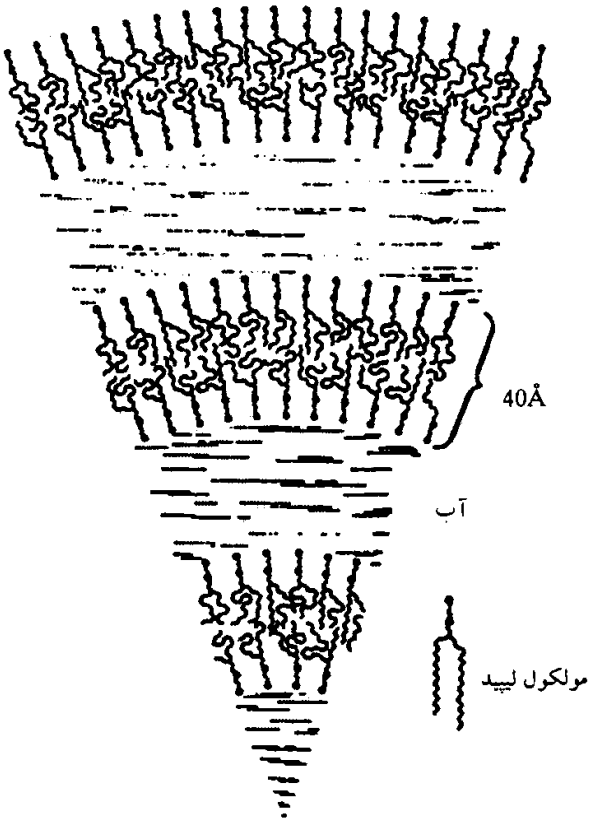
مجموعه (سیستم) لیپید - آب

اشتراک مولکولی لیپیدها در آب بستگی به دما و غلظت مواد متشکله دارد و می‌توان آن را با استفاده از پراش پرتوهای X بررسی نمود. اگر مقدار آب کم و درجه حرارت پایین باشد، مولکول‌های چربی‌به حالت بلوری درمی‌آیند (کریستال می‌شوند). در غلظت‌های متوسطِ چربی‌ها، مولکول‌های چربی به‌صورت میسل‌های پراکنده در آب درمی‌آیند که شکل آنها ممکن است متفاوت باشد. با فسفولیپیدها تشکیل دو بخش مایع - بلوری (کریستالی) مختلف پیش می‌آید: ۱) بخش لایه‌ای[1] (شکل ۵-۸، a) که از لایه‌های متفاوت چربی و آب ساخته شده است. گرچه در این مجموعه ضخامت لایه لیپیدی همواره یکسان است اما ضخامت آب می‌تواند به حسب غلظت از ۱۰ A° تا بیش از ۶۰ A° تغییر کند؛ ۲) فاز ۶ وجهی[2] (شکل ۵-۷، b) که از یک توده ۶ وجهی در دو بُعد ساخته شده است. درون محورها از آب پر شده و محورها نیز در یک زمینه مایع پنهان شده‌اند.

اشکال میلینی[3]

حالت لایه‌ای یک ساختمان لیپید - آب، اَشکالی را می‌سازد که به آن اَشکال میلینی گویند. اگر فسفولیپیدهای استخراج شده از مغز یا سایر بافت‌ها با آب مخلوط شوند، ساختمان‌های کرمی شکل، متحدالمرکز و نیمه مایعی پدیدار می‌شوند که از بخش لیپیدی جدا می‌شوند.

این ساختمان‌ها قدرت انکسار مضاعفِ نورِ شدیدی دارند و در امتداد محوری شعاعی قرار می‌گیرند. مولکول‌های لیپیدی آنها به‌صورت لایه‌های دو مولکولی قرار گرفته‌اند که از سوی سطح متقابل غیرقطبی خود به‌هم مربوط هستند (شکل ۵-۹).



شکل ۵-۹. آرایش مولکولی لیپیدها و آب در یک شکل میلینی. گروه‌های قطبی به وسیله دایره‌ها مشخص شده‌اند. ضخامت لایه‌های لیپیدی دو مولکولی تقریباً یکسان است، در حالی که ضخامت لایه‌های آب به حسب آب‌گیری نمونه‌ها تغییر می‌کند.

به‌منظور مطالعهٔ اشکال میلینی، می‌توان از پراش پرتوهای X استفاده کرد یا آنها را به کمک تتراکسیداسمیوم تثبیت کرد و یا میکروسکوپ الکترونی مشاهده نمود. این مدل‌ها برای تفسیر تصاویری که میکروسکوپ الکترونی به‌دست می‌دهد بسیار دقیق‌اند. عکس‌هایی که با این روش به‌دست می‌آیند، نوارهای متناوب تیره روشنی را نشان می‌دهند که تقریباً در هر ۴۰ A° تکرار می‌شوند. از آنجا که تصاویر مربوط به میکروسکوپی الکترونی با پراکندگی اتم‌های سنگین موجود در ساختمان بستگی دارند، نوارهای تیره بایستی نتیجه رسوب‌اسمیوم در ساختمان چند لایه‌ای باشند. گرچه مشخص است که اسمیوم بر پیوندهای مضاعف غیر اشباع لیپیدها اثر می‌کند، اما به‌نظر می‌رسد که قسمت اعظم اسمیوم به وسیله گروه‌های قطبی لیپیدهاجذب شده باشد. به همین دلیل اغلب تأیید شده که خطوط متراکم (بخش‌های تیره) با بخش‌های

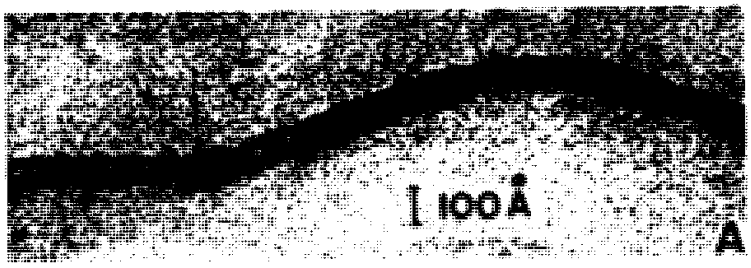
1- lamellar phase 2- hexagonale 3- firgures myeliniques

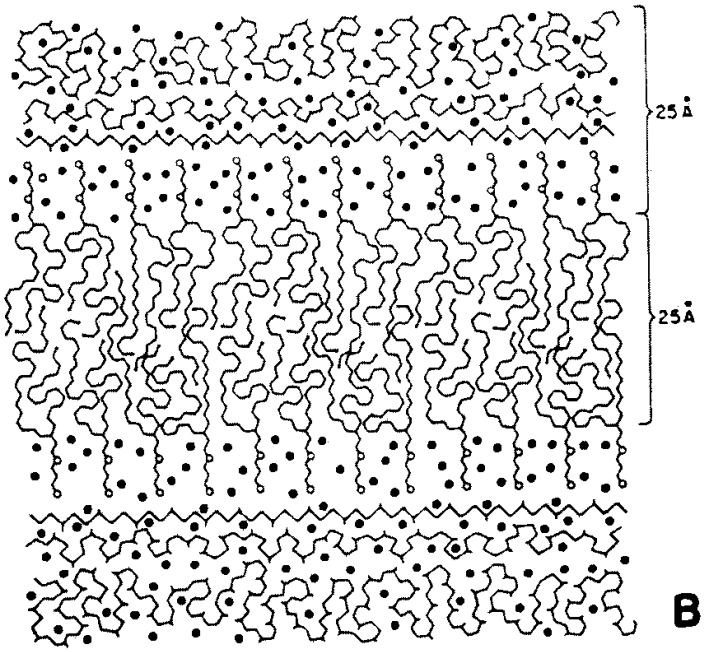
انتهایی قطبی این مولکول‌ها مطابقت می‌کند.

میکروسکوپ الکترونی امکان داده است که در نوع شش وجهی که قبلاً از آن بحث شد (شکل ۸-۵، b) منظره‌ای مشابه با نقاط متراکم در فاز مایع دیده شوند که این نیز نشان می‌دهد که اسمیوم با گروه‌های قطبی ارتباط پیدا می‌کند.

با داخل کردن پروتئین‌ها در ساختمان میلینی، می‌توان مدل‌های خیلی پیچیده‌تری از ساختمان‌های غشایی را ساخت. در چنین شرایطی، تصویر قابل مشاهده شبیه تصویر قبلی است اما دارای نوارهای پهن‌تر و متراکم‌تری است که ساختمان لیپیدی را محدود می‌کنند.

همان‌طور که در شکل ۱۰-۵، B) مشخص شده، یک لایه مضاعف لیپیدی پروتئین‌ها را از دو طرف می‌پوشاند و منظره دو خط موازی متراکم به ضخامت ۲۵ تا ۵۰ A° را به وجود می‌آورد که به وسیله فضایی روشن به ضخامت ۲۰ تا ۲۵ Å از یکدیگر جدا شده‌اند؛ چنین ساختمانی در شکل ۵-۱۰، A) قابل مشاهده است.





شکل ۵-۱۰. میکروگراف الکترونی از کوچک‌ترین ساختمان لایه‌ای که در نمونه‌های لیپید - پروتئین - آب یافت شده است. a)، این ساختمان اساساً با ساختمان غشاء واحد که در غشاءهای سلولی به نظر می‌رسد، یکی است (به شکل ۵-۶ مراجعه کنید). درشت‌نمایی ۵۰۰/۰۰۰. b)، طرح نشان دهندهٔ آرایش احتمالی مولکول‌های لیپیدی و پروتئینی در یک چنین غشایی می‌باشد. نقاط تیره رسوب اسمیوم را مشخص می‌کنند که به‌خصوص در سطوح قطبی ایجاد می‌شود.

مجموعه‌ها (سیستم‌های) لیپوپروتئینی طبیعی، دارای لیپیدهای قطبی مثل، اسیدهای چرب، فسفولیپیدها، سربروزیدها و گانگلیوزیدها و همچنین لیپیدهای غیرقطبی مثل گلیسریدها و استرهای کلسترول هستند. اشتراک پروتئین‌ها با لیپیدها یا با ایجاد پیوندهای هیدروژنی یا پیوندهای یونی با بخش‌های قطبی لیپیدها (شکل ۵-۱۰) و یا در نتیجه برهم‌کنش با بخش‌های غیرقطبی آنها صورت می‌گیرد. آرایش لیپیدهای غیرقطبی با پروتئین‌ها به کمک پیوستن آنها با لیپیدهای قطبی صورت می‌گیرد.

لیپوزوم‌ها و حفره‌های فسفولیپیدی - کاربردها در زیست‌شناسی وپزشکی

در ۱۹۶۵، بنگهام[1] لیپوزوم را به‌صورت یک ساختمان لایه‌ای ویژه‌ای معرفی کرد که در آن آب وارد شده و یا متراکم شده است. هم‌اکنون لیپوزوم‌ها را به‌عنوان حبابچه‌های مصنوعی (آزمایشگاهی) لیپیدی می‌دانیم که درون آنها را می‌توان با آب یا مواد مختلف دیگری مثل هورمون‌ها و آنزیم‌ها، داروها و مثل آنها پُر کرد و با توجه به خواصشان که بیشتر ناشی از نوع لیپیدهای سازنده آنها است، آنها را به سلول‌هایی ویژه (سلول‌های هدف) فرستاد.

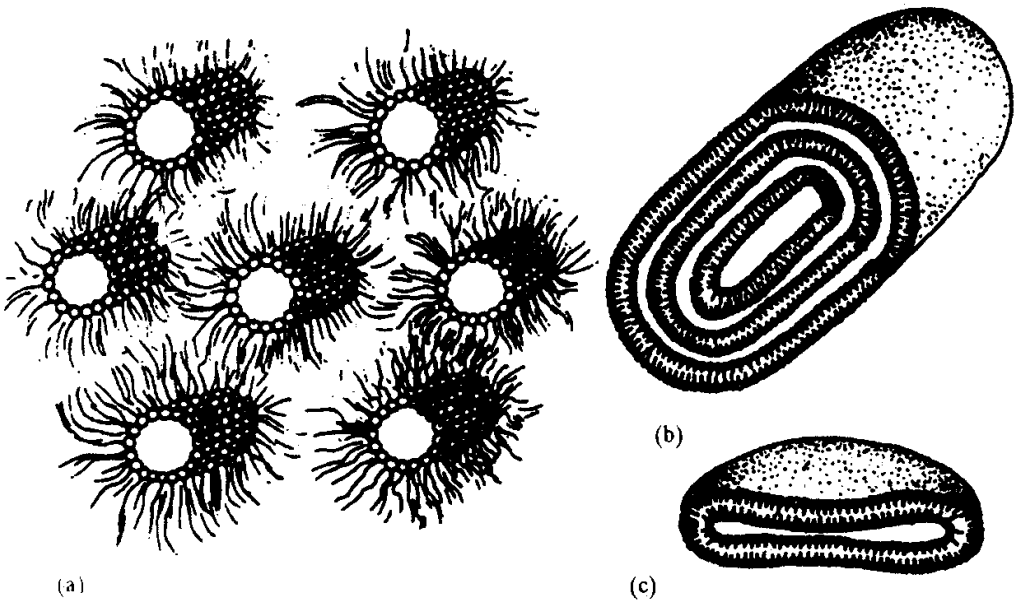
همان‌طور که شرح داده شد اگر فسفولیپیدهای استخراج شده از مغز یا سایر بافت‌ها را با آب مخلوط کنیم، ساختمان‌های کِرمی شکل، متحدالمرکز و نیمه مایعی ایجاد می‌شوند که از بخش لیپیدی جدا می‌گردند. این ساختمان‌ها قدرت انکسار مضاعف نور شدیدی دارند و با گذشت زمان و پس از به‌هم زدن مکانیکی (تکان دادن) محیط، این ساختمان‌های میلینی از هم می‌پاشند و ساختمان‌های کروی شکلی به قطر حدود ۲ میکرومتر را می‌سازند. این ساختمان‌ها از تعداد زیادی لایه‌های لیپیدی که به وسیله بخش‌های مایع (آب) از هم جدا شده‌اند، تشکیل شده‌اند (شکل ۵-۱۰، b). لیپوزوم‌ها را می‌توان با استفاده از پراش پرتوهای X یا پس از تثبیت آنها به وسیله اسمیوم، به کمک میکروسکوپ الکترونی بررسی کرد. میکروگراف‌های الکترونی به‌دست آمده از آنها نشان می‌دهد که از بخش‌های (باندهای) موازی تاریک و روشن متناوبی ساخته شده‌اند که با فاصله‌های حدود ۴ نانومتر از هم جدا شده‌اند. بخش‌های تیره به احتمال در نتیجه رسوب اسمیوم در این ساختمان‌های چند لایه‌ای ایجاد شده‌اند.

لیپوزوم‌ها ویژگی‌های زیادی شبیه غشاءهای زیستی دارند و دستکاری آنها آسان است؛ ترکیب شیمیایی آنها را به دلخواه می‌توان عوض کرد و آنها را از لیپیدهای مختلفی تهیه کرد؛ در فاصله لایه‌های سازنده آنها مواد مختلفی را می‌توان قرار داد. در این وضع به خاطر آوردن این مطلب قابل تجسّم است که یک فسفولیپید آب‌گیری شده، می‌تواند در نتیجه معلق شدن در یک محیط آبی دارای مولکولی که بایستی به دام افتد، متورم شود و آن را به دام اندازد. وقتی لیپوزوم تشکیل شد می‌توان با دیالیز یا صاف کردن روی ژل بخش به دام افتاده را از بخش‌های به دام نیافتاده محیط جدا کرد.

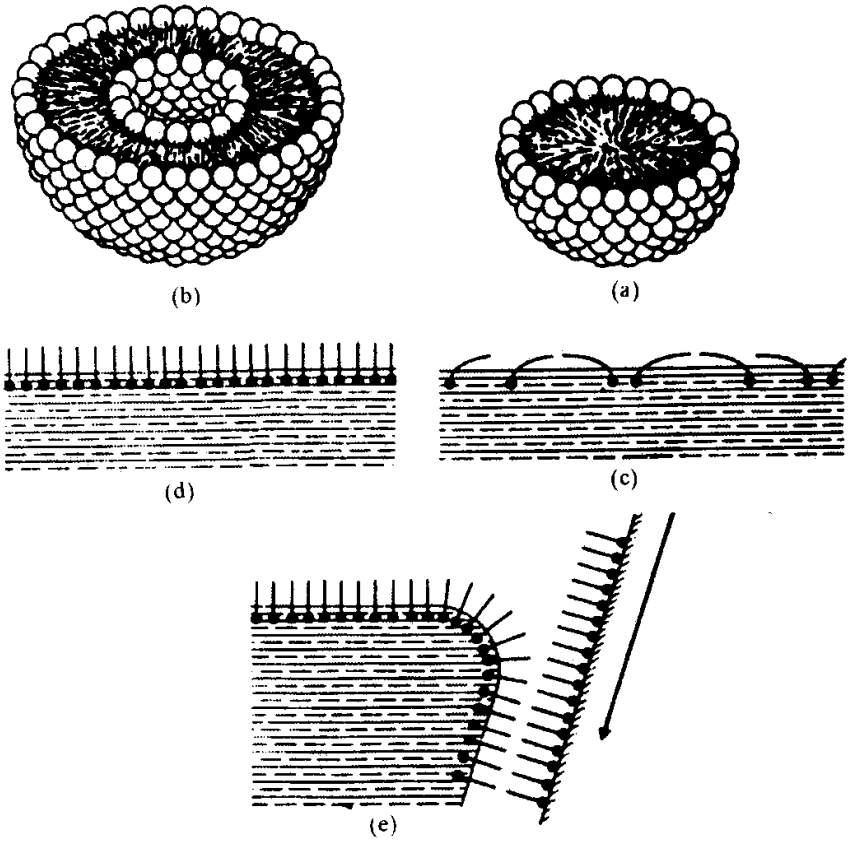
با قرار دادن سوسپانسیونی از لیپوزوم‌ها تحت تأثیر امواج فراصوت، می‌توان در برخی شرایط حفره‌های دو لایه‌ای مستقلی را که قطری حدود ۲ نانومتر دارند به‌دست آورد (شکل ۱۱-۵، c). حفره‌های فسفولیپیدی و لیپوزوم‌ها نمونه‌های مفیدی برای بررسی برخی مکانیسم‌های نفوذپذیری هستند و شناخت بهتری از شکل برهم‌کنش‌های پروتئین‌ها و لیپیدهای غشایی را فراهم ساخته‌اند.

در سال‌های اخیر، لیپوزوم‌ها کاربردهای وسیع پزشکی پیدا کرده‌اند. لیپوزوم‌ها ناقل‌های بسیار خوبی برای فرستادن مواد مختلف پوشیده شده در غشایی لیپیدی به سوی سلول‌ها و بافت‌ها هستند. برای مثال به کمک لیپوزوم‌ها می‌توان آنزیمی را به جانداری یا سلولی که به‌طور ارثی فاقد آن است انتقال داد. همچنین عوامل شیمی درمانی در معالجه سرطان را می‌توان به کمک لیپوزوم‌ها به راحتی به سلول‌های مشخصی فرستاد. هم‌اکنون پروژه‌های علمی بسیار متنوعی با استفاده از لیپوزوم‌ها طراحی و در دست اجرا است که حتی ممکن است تا ایجاد غشاءهای مصنوعی فتوسنتزکننده یا قادر به سنتز ATP (با افزودن مجموعه‌های پروتئینی به ساختمان‌های لیپوزومی) در آینده کشیده شود (شکل ۵-۱۲).

1- Bangham



شکل ۵-۱۱. انواع مختلفی از مجموعه‌های فسفولیپید - آب. a)، بخش (ساختمان) شش وجهی با فسفولیپیدهای تقریباً آب‌دار. خاطرنشان سازیم که آب درون استوانه‌ها را که به وسیله گروه‌های قطبی محدود شده‌اند، پر کرده است؛ b)، ساختمانی چند لایه قابل مقایسه با یک لیپوزوم. آب در بین دو لایه‌های لیپیدی محبوس شده است؛ c)، حفره فسفولیپیدی، ساختمان دو لایه‌ای ساده با قطر ۲ نانومتر.



شکل ۵-۱۲. آرایش مولکول‌های مختلف لیپیدی در آب. a) میسل b) لیپوزوم c) وضعیت فسفولیپیدها وقتی تعداد آنها کم باشد d) وضعیت فسفولیپدها وقتی تعداد آنها زیاد باشد e) وضعیت فسفولیپیدها بر روی سطح شیشه‌ای به‌صورت یک لایه‌ای

۶ غشاء سیتوپلاسمی و دیوارهٔ اسکلتی

غشاء سلولی و تراوایی[1]؛ میان‌کنش‌های بین سلولی

محیط درونی سلول از بیرون آن متفاوت است. برای مثال، مقدار یون‌ها در سلول‌های جانوری تا حد زیادی از مقدار یون‌های خونِ در گردش تفاوت دارد. این اختلاف در تمام مدت زیست سلول به وسیله یک غشاء نازک که سطح سلول را می‌پوشاند و آن را غشاء سلولی یا غشاء پلاسمایی نامند حفظ می‌شود که، ورود و خروج مولکول‌ها و یون‌ها را کنترل می‌کند. این کار غشاء پلاسمایی که مبادلهٔ بین سلول و محیط را تنظیم می‌کند تراوایی نامیده می‌شود.

غشاء پلاسمایی به اندازه‌ای نازک است که با میکروسکوپ نوری دیده نمی‌شود، اما در برخی سلول‌ها این غشاء از لایه‌های پشتیبان ضخیم‌تری پوشیده شده که در حد رؤیت میکروسکوپی می‌باشد. برای مثال، بسیاری از سلول‌های گیاهی دارای دیوارهٔ سلولزی ضخیمی هستند که غشاء پلاسمایی حقیقی را می‌پوشاند و آن را پشتیبانی می‌کند. برخی سلول‌های جانوری از مواد مشابه سیمانی احاطه شده و به این ترتیب دارای جدارهای سلولی قابل مشاهده با میکروسکوپ نوری شده‌اند. این قبیل پوشش‌های پشتیبان که آنها را پوشش‌های سلولی[2] نیز می‌نامند، به‌طور معمول نقشی در تراوایی سلول ندارند، اما دارای کارهای مهم دیگری هستند و برای مثال در شناسایی سلول - سلول[3]، اتصال‌های سلولی[4] و مانند آن دخالت می‌کنند.

در این فصل ابتدا به بررسی چگونگی سازمان یافتن غشاء سلولی در حد مولکولی می‌پردازیم و سپس مدل «موزائیک سیّال»[5] را که در زمان ما اهمیت بیشتری دارد مشخص می‌سازیم. با چنین ساختمانی به‌عنوان پایه، حالت‌های مختلف تراوایی سلول را بررسی می‌کنیم. از مسائل قابل توجه ارتباط‌های بین سلولی است. در آخر، همزمان با مطالعهٔ پوشش سلولی به تجزیه و تحلیل چند نمونه از مکانیسم‌هایی می‌پردازیم که سلول‌ها در شناسایی سلول‌های مجاور خود در یک بافت به کار می‌گیرند. یادآور می‌شویم تغییراتی که در ارتباط‌های بین سلولی و شناسایی مولکولی صورت می‌گیرد یکی از عوامل اصلی تحولاتی است که سلول‌های سرطانی متحمل می‌شوند. غشاء سلولی به‌صورت یکی از موارد دقیق و مهم بررسی زیست‌شناسی سلولی چه در سلول‌های عادی و چه در سلول‌های ویژه درآمده است.

برخی روش‌های مشخص کردن پلاسمالم

۱- همان‌طور که اشاره شد سلول دارای محتوایی متفاوت از محیطش می‌باشد. برای مثال محتوای یونی سلول جانوری با محتوای یونی خون کاملاً متفاوت است. یون‌هایی مثل K^+، Mg^{++} در سلول زیاد و یون‌های Cl^- و Na^+ در خارج سلول بیشتر می‌باشند. این اختلاف به دلیل وجود غشاء سیتوپلاسمی در سطح سلول است که

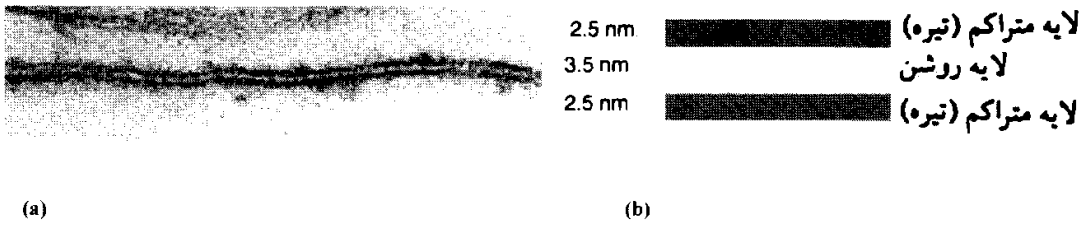
1- Permeability 2- Cell Coat 3- Cell to Cell Recognition 4- Cell Junction
5- Fluid mosaic

ورود و خروج مولکول‌ها و یون‌ها را کنترل می‌کند. مثلاً در جلبک نیتلا، K^+ درون سلول ۱۰۰۰ برابر بیرون سلول است. اگر پوششی در سطح سلول نمی‌بود می‌بایستی ترکیب درون سلول و محیط بیرون یکسان می‌شد.

۲- در گیاهان عالی که سلول‌ها دیوارهٔ اسکلتی دارند، پلاسمالم کاملاً در مقابل دیوارهٔ اسکلتی قرار می‌گیرد، در این سلول‌ها به راحتی وجود پلاسمالم را می‌توان تحقیق کرد. اگر سلول گیاهی را در محلول غلیظی از قند یا نمک قرار دهیم، پروتوپلاسم آن با از دست دادن آب بتدریج به طرف وسط سلول جمع می‌شود، سلول به حال پلاسمولیز می‌افتد ولی پروتوپلاسم تا مدتی همچنان به وسیلهٔ بخش‌های باریکی از پلاسمالم به دیوارهٔ اسکلتی چسبیده می‌ماند.

۳- اگر سلول نسبت به یک ماده رنگی غیرقابل نفوذ باشد، می‌توان با میکروپی‌پت‌پلاسمالم را سوراخ کرده ماده رنگی را به درون سلول تزریق کرد، این تجربه با ائوزین که پس از رسیدن به سیتوپلاسم آن را قرمز می‌کند به راحتی امکان‌پذیر است.

۴- غشاء سلولی در سطح سلول با میکروسکوپ الکترونی بعد از تثبیت با گلوتارآلدئید و فیکساسیون بعدی با اسمیوم قابل مشاهده می‌گردد. در این حالت پلاسمالم به‌صورت خط تیره‌ای بر سطح سلول به خوبی‌مشخص است. در درشت‌نمایی بالا با میکروسکوپ الکترونی غشاء سلولی سه لایه‌ای دیده می‌شود و دارای دو لایهٔ تیرهٔ کناری و یک بخش روشن میانی می‌باشد. مجموع این سه لایه یک غشاء را می‌سازند که اصطلاحاً آن را واحد غشایی یا غشاء واحد[1] و یا غشاء سه لایه[2] می‌نامند (شکل ۶-۱).



شکل ۶-۱. غشاء سه لایه a) با میکروسکوپ الکترونی گذاره پس از رنگ‌آمیزی با اسمیوم، نمک‌های اورانیل و سرب. درشت‌نمایی ۸۰۰۰۰ برابر. b) نمای تفسیری

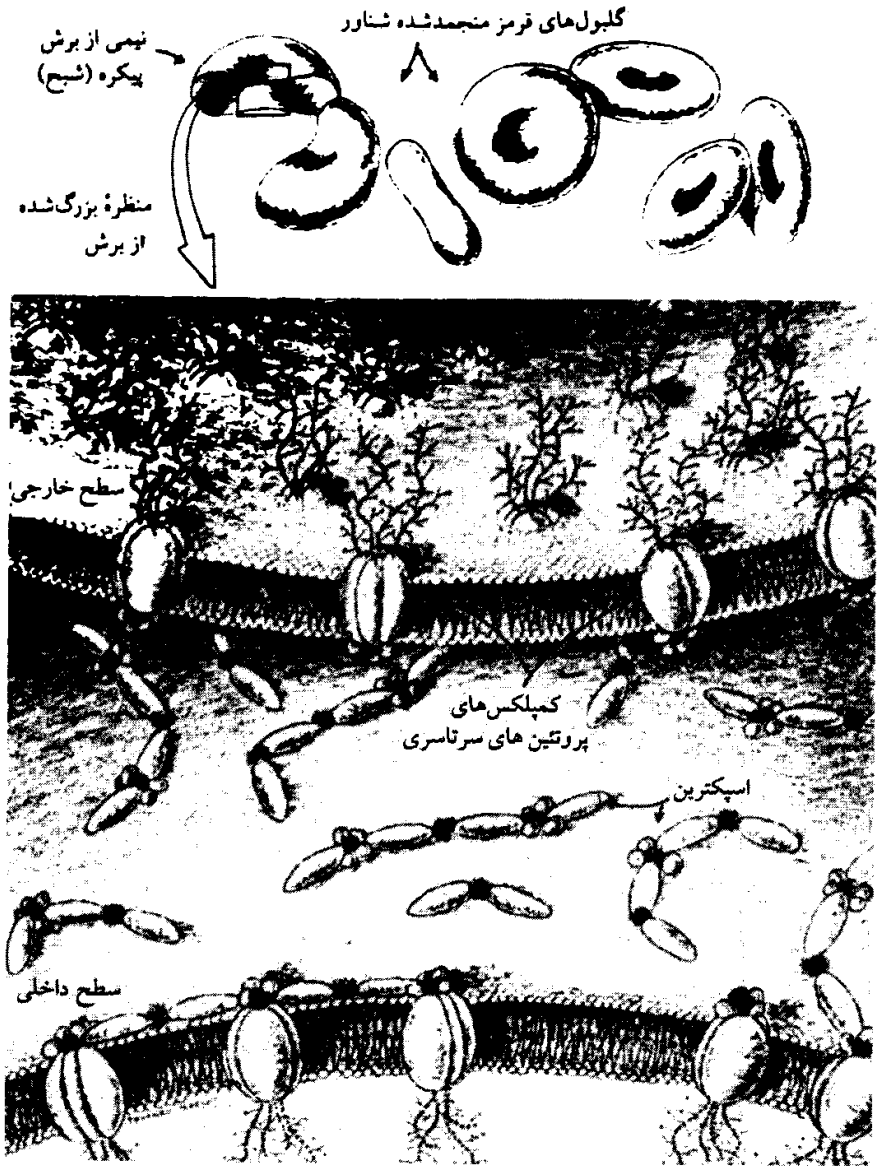
۵- آزمایش‌های مختلفی نشان می‌دهد که سطح سلول از بقیه قسمت‌های آن ساختمان متفاوتی دارد. اگر به کمک وسایل میکروسکوپی قطره آبی را در سطح پلاسمدیک میکسومیست قرار دهیم به سرعت جذب نمی‌شود. عمل با یک قطره روغن نتیجه عکس می‌دهد و به همین دلیل درنظر می‌گیرند که، به عکس بقیهٔ سیتوپلاسم، قسمت سطحی آن (پلاسمالم) آب‌گریز و چربی دوست است.

سازمان مولکولی غشاءسلولی

برای بررسی سازمان مولکولی غشاء سلولی بایستی ابتدا آن را تا حد امکان به حالت خالص از بقیه قسمت‌های سیتوپلاسم جدا کرد و به روش‌های متداول در بیوشیمی و بیوفیزیک بررسی کرد. فنون مختلفی برای جدا کردن غشاء از سلول‌های متفاوت مورد استفاده بوده است. در بسیاری از موارد، خلوص بخش جدا شده را به وسیلهٔ میکروسکوپ الکترونی، تجزیه آنزیمی، بررسی پادگن‌های سطح سلول بررسی کرده‌اند. غشاء پلاسمایی را به‌طور

1- Unit - membrane 2- Tri - layer

ساده‌ای از گویچه‌های سرخ با انجام همولیز جدا می‌کنند. این سلول‌ها رابه وسیله محلول‌های کم غلظت که موجب تورم، پارگی و بعد خروج هموگلوبین از آنها می‌شود (عمل همولیز) تیمار می‌کنند. غشایی را که به این ترتیب جدا می‌شود به‌طور معمول «پیکره[1]» یا شَبَح گویچه سرخ[2] می‌نامند. دو نمونه اصلی از پیکره‌ها را می‌توان به‌دست آورد: پیکره‌های پایدار[3] و پیکره‌های ناپایدار[4]. پیکره‌های پایدار وقتی تشکیل می‌شوند که همولیز سبک باشد. این پیکره‌ها را می‌توان با محلول‌هایی که اعمال تراوایی را حفظ می‌کنند (پایدارکننده‌ها) تیمار کرد. همولیز قوی موجب تشکیل پیکره‌های ناپایدار می‌شود. در این همولیزهای قوی، هموگلوبین به‌طور کامل جدا می‌شود و بنابراین پیکره‌ها نمی‌توانند پایدار باشند. این پیکره‌ها می‌توانند برای مطالعات بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گیرند، اما در بررسی‌های فیزیولوژیکی کاربردی ندارند. شکل ۶-۲ برخی ایده‌های مربوط به سازمان مولکولی غشاء گویچه سرخ را مشخص می‌سازد.



شکل ۶-۲. طرح نشان‌دهنده گویچه‌های سرخ، یک پیکره (شبح) گویچه سرخ که دو نیمه شده و نیز سازمان مولکولی غشاء بر بنای مدل «موزائیک سیال» دیده می‌شود. پروتئین‌های درون غشایی همراه زنجیره‌های اولیگوساکاریدی که به سوی سطح بیرونی غشاء کشیده شده‌اند، مشخص هستند. در سطح درونی، سپکترین که یک پروتئین حاشیه‌ای است، دیده می‌شود.

در این شکل گویچه‌های سرخی که به‌طور آزاد شناورند و یک پیکره گویچه سرخ که دو نیمه شده است، دیده می‌شود. همچنین در این شکل منظرهٔ سه بعدی غشاء بر بنای مدل (موزائیک سیال) دیده می‌شود. در شرایط

1- Stroma 2- ghost of erytrocyte 3- Constant Stroma
4- nonconstant Stroma

همولیز، گویچه سرخ با میکروسکوپ نوری اغلب به این حالت دو نیمه شده دیده می‌شود. اصولاً غشاء از دو لایهٔ تقریباً ممتد لیپیدی ساخته شده که در آن مجموعه‌های پروتئینی به‌صورت پراکنده وارد شده‌اند. علاوه بر این پروتئین‌های درون غشایی، پروتئین‌های دیگری که از پروتئین‌های حاشیه‌ای[1] هستند نیز در غشاء دو لایه و اغلب بر روی سطح داخلی قرار گرفته‌اند. از موارد فوق می‌توان نتیجه گرفت که غشاء بسیار نامتقارن[2] است. بخشی از عدم تقارن غشاء نتیجه وجود زنجیره‌های اولیگوساکاریدی است که تنها به سطح خارجی غشاء چسبیده‌اند.

غشاء سلولی از پروتئین‌ها، لیپیدها و گلوسیدها تشکیل شده است

ترکیب شیمیایی غشاء پلاسمایی گویچه‌های سرخ انسان را بهتر از غشاء سلول‌های دیگر می‌شناسیم (شکل ۶-۵). پروتئین‌ها حدود ۵۲ درصد، لیپیدها ۴۰ درصد و گلوسیدها ۸ درصد از وزن خشک غشاء را تشکیل می‌دهند، اولیگوساکاریدها بیشتر به لیپیدها چسبیده‌اند (گلیکولیپیدها) تا به پروتئین‌ها (گلیکوپروتئین‌ها). بر مبنای اطلاعات جدول ۶-۱ روشن است که نسبت لیپیدها به پروتئین‌ها در غشاءهای مختلف سلولی بسیار متغیر است. فراوانی بیشتر لیپیدها در غلاف میلین یک حالت استثنایی است؛ در سایر غشاءهای سلولی نسبت پروتئین به لیپید بیشتر است. از جدول ۶-۱ می‌توان نتیجه گرفت که در غلاف میلین، سطح اشغال شده به وسیله پروتئین‌ها برای پوشانیدن سطح اشغال شده به وسیله لیپیدها کافی نیست. در حالی که در پیکره‌های گویچه‌های سرخ، وضعیت برعکس است.

جدول ۶-۱. نسبت بین لیپیدها و پروتئین‌ها در چند نمونه از غشاءهای سلولی

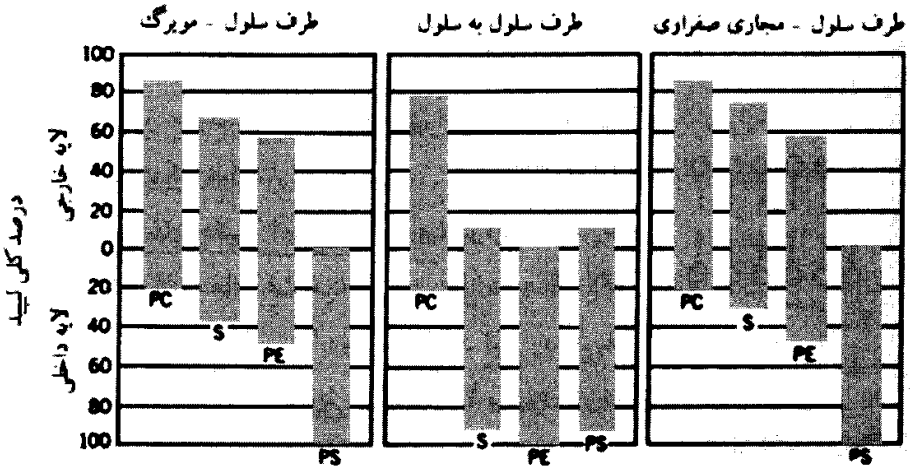
گونه‌ها و بافت‌ها	درصد پروتئین‌ها	درصد لیپیدها
انسان (غلاف میلین دستگاه عصبی مرکزی)	۲۰	۷۰
گاو (غلاف میلین دستگاه عصبی)	۲۳	۷۶
موش (عضله اسکلتی یا ماهیچه مخطط)	۶۵	۳۵
موش (کبد)	۶۰	۴۰
انسان (گویچهٔ سرخ)	۶۰	۴۰
موش (میتوکندری کبد)	۷۰	۳۷ - ۲۹

لیپیدها به حالت نامتقارن در دو لایه غشاء پراکنده‌اند

ترکیب‌های اصلی غشاء پلاسمایی عبارتند از: فسفولیپیدها، کلسترول و گالاکتولیپیدها. نسبت این مواد در غشاءهای مختلف سلولی متفاوت است. بخش اعظم فسفولیپیدهای غشایی قطبی هستند مثل فسفاتیدیل کولین، فسفاتیدیل اتانول آمین و اسفنگومیلین. هیچ یک از این ترکیب‌ها در PH خنثی بار الکتریکی ندارد (فسفولیپیدهای خنثی) و همگی تمایل دارند که به‌طور فشرده‌ای در یک لایه دو مولکولی گسترده شوند. (کلسترول نیز دارای این ویژگی است). ۲۰ تا ۵۰ درصد از فسفولیپیدها شامل: فسفاتیدیل اینوزیتول، فسفاتیدیل سرین، کاردیولیپین، فسفاتیدیل گلیسرول، سولفولیپیدها و فسفولیپیدهای اسیدی. فسفولیپیدهای اسیدی دارای بار منفی‌اند و اساساً در غشاء به وسیله اندرکنش‌های لیپید - پروتئین به پروتئین‌ها چسبیده‌اند (شکل ۶-۳).

یکی از ویژگی‌های عمدهٔ سازمان مولکولی غشاء پلاسمایی عدم تقارن تمام این ترکیبات شیمیایی در آن است. این عدم تقارن مربوط به پراکندگی نامتقارن این ترکیبات در بین دو سطح غشاء یعنی سطح پروتوپلاسمی یا سطح

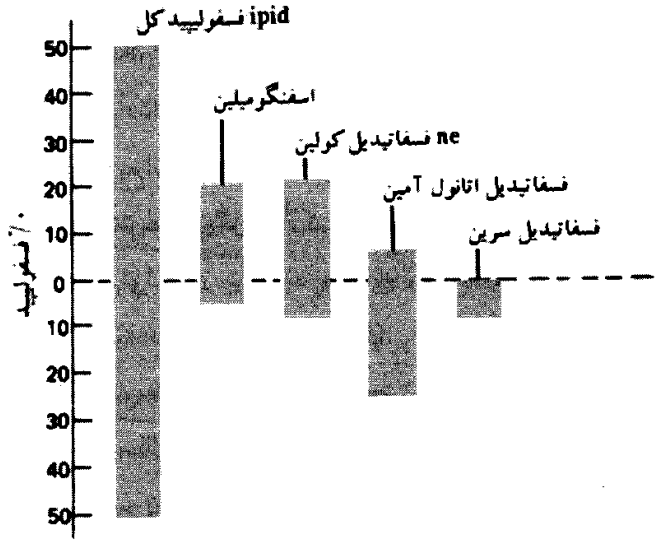
1- Periferal Proteins 2- assymetrical



شکل ۶-۳. پراکنش نسبی لیپیدها در نیمه‌های خارجی و داخلی سه طرف مختلف غشاء سلول کبدی. (S) اسفنگومیلین، (PE) فسفاتیدیل اتانول آمین، (PS) فسفاتیدیل سرین

داخلی (PS در تماس با سیتوپلاسم پایه) و سطح خارجی (ES در تماس با محیط مایع اطراف سلول) می‌باشد (شکل ۶-۴).

بررسی فسفولیپیدها با معرّف‌های نفوذناپذیر و به وسیله فسفولیپازهای مختلف (آنزیم‌هایی که بخش‌های مختلفی از مولکول فسفولیپیدی را هیدرولیز می‌کنند) نشان می‌دهد که پراکندگی فسفولیپیدهای غشایی بسیار نامتقارن است (شکل ۶-۴). لایه خارجی به ویژه دارای لسیتین و اسفنگومیلین است در حالی که لایه داخلی اساساً از فسفاتیدیل اتانول آمین و فسفاتیدیل سرین تشکیل شده است. به‌علاوه، گلیکولیپیدها بیشتر در نیمه خارجی دو لایهٔ غشاء وجود دارند. به‌طور خلاصه این عدم تقارن تا حد زیادی پایدار است و تبادل لیپیدها بین دو لایه غشاء صورت نمی‌گیرد.



شکل ۶-۴. پراکندگی نامتقارن فسفولیپیدها در بین دو لایه داخلی و خارجی غشاء گویچه سرخ انسان: TPL، کل فسفولیپیدها؛ Sph، اسفنگومیلین؛ PC، فسفاتیدیل کولین؛ PE، فسفاتیدیل اتانول آمین؛ PS، فسفاتیدیل سرین

در ارتباط با لیپیدهای غشایی موارد زیر را می‌توان مورد توجه قرار داد:

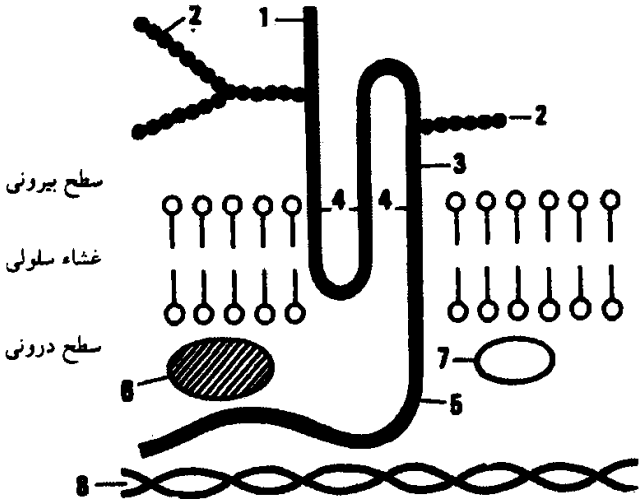
۱- تمام لیپیدهای غشایی آمفی‌پاتیک دارای بخش قطبی آب‌دوست و بخش غیرقطبی آب گریز هستند.

۲- لیپیدهای غشاء مقاومت الکتریکی زیادی دارند در نتیجه مقاومت الکتریکی پلاسمالم زیاد است.

۳- لیپیدهای غشایی نسبت به دما و الکتریسیته عایق هستند.

۴- مواد محلول در چربی بهتر از مواد محلول در آب از غشاء سلول عبور می‌کنند، بنابراین فرض بر اینست که غشاء سلول زیر بنای لیپیدی دارد.

۵- مهم‌ترین لیپیدهای غشاء سلول عبارتند از: فسفولیپیدها (۵۰ درصد)، کلسترول (۲۵ درصد)، گلیکولیپیدها، لیپیدهای مختلف دیگر، اسیدهای چرب اشباع شده و اشباع نشده (۲۵ درصد) (شکل ۶-۵).



شکل ۶-۵. گلیکوفورین (غشاء یک گویچهٔ سرخ) ۱- زنجیر پلی‌پپتیدی ۲- زنجیرهای هیدروکربنی ۳- تمام ترتیب‌های بیرون سلولی آب‌دوست هستند ۴- تمام ترتیب‌های میانی غشاء آب‌گریزند ۵- ترتیب آب‌دوست درون سلولی ۶- آنکیرین ۷- آکتین ۸- سپکترین

ویژگی‌های فسفولیپیدهای غشایی

جنبش‌های فسفولیپیدها: تاکنون چهار نوع جنبش در حرکت فسفولیپیدهای غشایی شناخته شده است که عبارتند از:

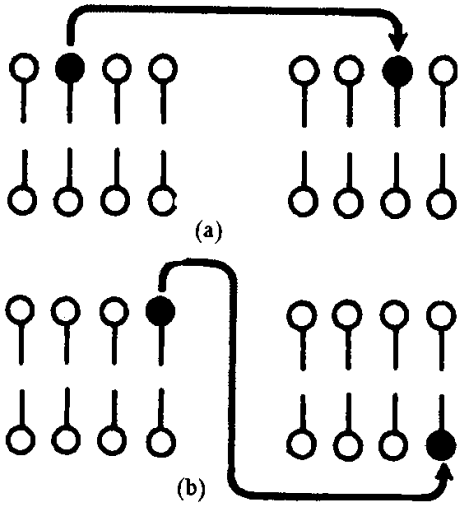
الف - نفوذهای جانبی[1] (عرضی - برداری): در این جنبش‌ها فسفولیپیدهای غشاء به‌طور مستقل در همان لایه و به‌طور عرضی جابه‌جا می‌شوند این جنبش‌ها تصادفی و بسیار سریع هستند (۱۰ میلیون بار در ثانیه) (شکل ۶-۶).

ب - جنبش‌های چرخشی[2]: در این جنبش‌ها مولکول‌های فسفولیپیدی در دو لایه به‌صورت چرخشی جابه‌جا می‌شوند. این جنبش‌ها نیز سریع‌اند و نیاز به مصرف انرژی زیستی ندارند.

ج - جنبش‌های زیگزاک[3]: که ضمن آن فسفولیپیدها می‌توانند از نیمه خارجی به نیمه داخلی غشاء و برعکس جابه‌جا شوند (شکل ۶-۶).

د - جنبش‌های خمشی[4]: در این جنبش‌ها بخش دُم فسفولیپیدها بین دو حالت سیس و ترانس همانند تا و باز شدن ساعد نسبت به آرنج تغییر وضع می‌دهند.

با توجه به این اشکال مختلف جنبش، می‌توان نتیجه گرفت که فسفولیپیدها در غشاء پیوسته در حرکتند (شکل ۶-۶).



شکل ۶-۶. جنبش مولکول‌های لیپیدی در غشاء سلول. a) جنبش نفوذ جانبی b) جنبش زیگزاک (همانند شاهین ترازو)

یکی از دلایل مهم حرکت فسفولیپیدها، حالت سیال یا روان غشاء است که به عوامل مختلف از جمله دمای محیط وابسته است. بدن نیاز دارد که غشاء سلول همیشه امکان حرکت داشته باشد لذا غشاء همیشه به حالت سیال است تا بتواند حرکت کند.

به‌منظور امکان مبادلات گستردهٔ غشایی لازم است غشاء حالت سیال داشته باشد، اگر غشاء جامد فرض شود از سویی فسفولیپیدهای آن حالت سوزن‌هایی را پیدا می‌کنند که موجب تخریب سلول می‌گردند و از سویی دیگر در غشاء جامد انرژیِ کلی با کم شدن امکان جنبش مولکول‌ها، کاهش می‌یابد. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که برای مقابله با حالت جامد غشایی و افزایش سیالیت آن تغییرات مهمی در غشاء صورت می‌گیرد از جمله در سرما اسیدهای چرب اشباع نشدهٔ غشاء افزایش چشمگیری دارد. از طرفی برای آن که سیالیت غشاء متعادل باشد در گرما (تابستان) اسیدهای چرب اشباع شده غشاء افزایش می‌یابد.

1- Lateral diffusion
2- Rotary movement
3- Flip flop
4- Flexion

مجموعه‌ای از روش‌های فیزیکی و زیستی را می‌توان به منظور بررسی سیالیت غشاء به کار گرفت. روش‌های فیزیکی دو نوع‌اند:

الف - آنهایی که موجب حداقل تخریب در غشاء می‌شوند مثل پراش پرتوهای ایکس.

ب - آنهایی که افزودن برخی مولکول‌ها را برای کشف جایگاه‌های ویژه‌ای از غشاء ضروری می‌سازد. از جمله این روش‌ها، میکروسکوپی فلوئورسانس را نام می‌بریم.

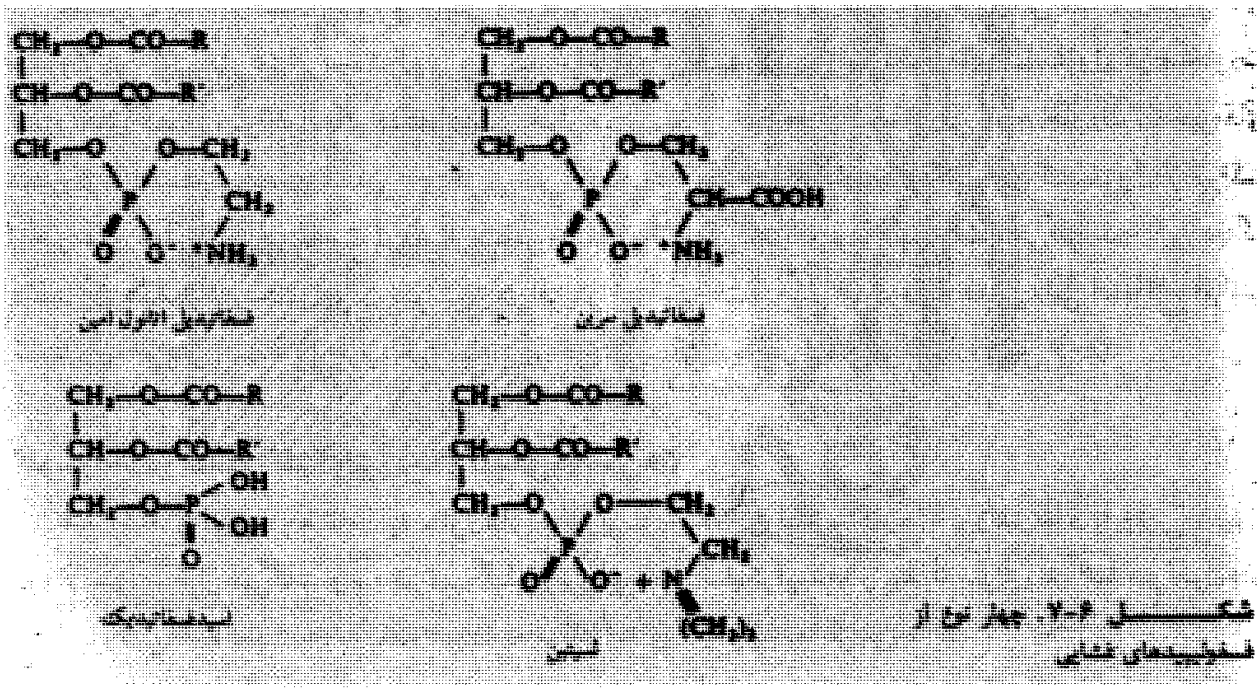
(شرح این روش‌ها از محدوده اهداف این کتاب می‌گذرد، برای آگاهی‌های بیشتر در این مورد به مقالهٔ نیکُل و همکارانش ۱۹۷۷ مراجعه نمایید).

در عمل این روش‌های فیزیکی را به ویژه برحسب این که بتوان به کمک آنها مواد متشکله لیپیدی یا پروتئینی و یا هر دو را مشاهده کرد، تقسیم‌بندی کرده‌اند. اسپکتروسکوپی تشدید الکترونی نیاز به سوندهای ضد مغناطیسی دارد (مثل نیتروکسید دارای مولکول‌های آمفی‌پاتیک که در دو لایهٔ لیپیدی داخل می‌شود. این کار هم در مورد غشاءهای طبیعی و هم برای غشاءهای مصنوعی امکان‌پذیر است.

نتایج حاصل، اطلاعاتی را در مورد تجمع لیپیدها، پروتئین‌ها، انتشار جانبی (عرضی) لیپیدها، اندرکنش لیپیدها - پروتئین‌ها، سیالیت غشاء و سرعت جنبش زیگزاکی درون غشایی، به‌دست می‌دهد.

روش‌های زیستی نیاز به میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ فلوئورسانس دارد. میکروسکوپ الکترونی استفاده از روش‌های انجماد و شکستگی و نشانه گذاری به کمک رادیوایزوتوپ‌ها را میسّر می‌سازد.

یکی از ساده‌ترین روش‌ها در زمینه روش‌های زیستی بر بنای افزودن ذرات ریز طلا یا کربن بر سطح سلولی و مشاهده حرکت این ذرات بر سطح سلول با میکروسکوپ نوری است. بررسی اندرکنش‌های موادی که به‌هم می‌چسبند مثل پادتن‌ها، لکتین‌های گیاهی و گیرنده‌های سطح سلول اطلاعات زیادی را به‌دست داده است (ادیدین[1]، ۱۹۷۴؛ نیکسون[2] و همکارانش، ۱۹۷۷). اگر مواد به وسیله رنگ‌های فلوئورسان نشانه گذاری شده باشند، می‌توان آنها را به وسیله میکروسکوپ فلوئورسان دنبال کرد. (شکل ۶-۷).



شکل ۶-۷- چهار نوع از فسفولیپیدهای غشایی

1- Edydin 2- Nickson

فسفولیپیدها از نظر تقارن به دو صورت سیس و ترانس در غشاء قرار دارند. چون در نوع سیس در بین مولکول‌ها فضای بیشتری داریم، در نتیجه فسفولیپیدها بیشتر می‌توانند جابه‌جایی و حرکت داشته باشند. در بین مولکول‌های چربی که موجب عدم تقارن در غشاء سلول هستند و به ویژه در غشاء پلاسمایی سلول‌های جانوری، گلیکولیپیدها بیش از همه نقش آفرین به نظر می‌رسند. مولکول‌های گلیکولیپید تنها در لایه بیرونی وجود دارند و گروه قندی آنها در سطح غشاء به‌صورت برجسته قرار گرفته است.

کلسترول در غشاء

کلسترول به‌طور معمول در غشاء سلول‌های پستانداران وجود دارد. در جهت عکس دمای محیط عمل می‌کند و همچنین به‌عنوان یک مهارکننده جنبش‌های فسفولیپیدهای غشایی منظور می‌گردد. چون کلسترول تنها یک پیوند دو گانه دارد حرکاتش کند است و همانند یک صفحه در بین فسفولیپیدهای غشایی قرار گرفته، نقش مهارکنندگی حرکات آنها را ایفا می‌کند. مقدار کلسترول در لایه خارجی نسبت به لایه داخلی غشاء بیشتر است.

در غشاء باکتری‌ها کلسترول و اسیدهای چرب غیراشباع وجود ندارد. در نتیجه غشاء باکتری‌ها به حرارت خیلی حساس است و در دمای پایین در مدت کوتاهی حدود ۵ دقیقه منجمد می‌شود. به‌طور کلی هرچه مقدار کلسترول غشاء بیشتر باشد میزان سیالیت غشاء بیشتر می‌شود زیرا نقش کلسترول در غشاء عکس درجه حرارت است.

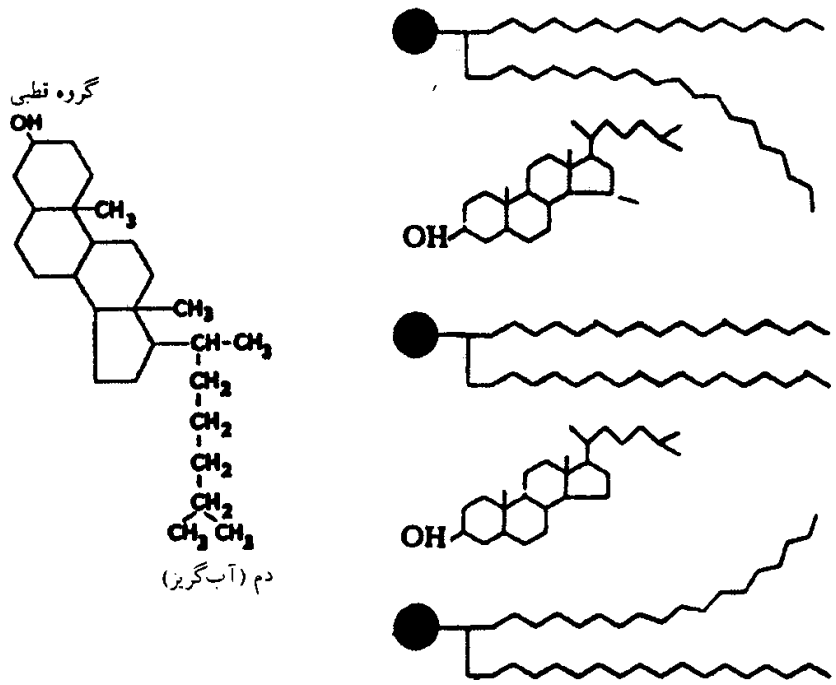
کلسترول علاوه‌بر این که از غلظت غشاء دو لایه می‌کاهد به غشاء استقامت می‌بخشد، ضمناً مولکول‌های کلسترول چنان آرایشی به خود می‌گیرند که ریشه‌های هیدروکسیل آنها در جوار گروه‌های قطبی مولکول‌های فسفولیپید استقرار می‌یابد در حالی که حلقه‌های کلسترول در همسایگی مناطقی از زنجیره‌های هیدروکربن که نزدیک‌ترین فاصله را با گروه‌های قطبی داشته باشند جایگزین می‌گردند. کلسترول با توجه به میزان غلظتی که غشاء سلول‌های یوکاریوت از آن بهره‌مندند مانع می‌شود که زنجیره‌های هیدروکربن به یکدیگر فشرده شده، متبلور شوند، لذا از این طریق در صورت حضور کلسترول، غشاء در برابر کاهش یا افزایش دما از خود واکنش نشان می‌دهد.

کلسترول با ساختمان خود و آرایش ویژه‌اش در غشاء، از فشرده شدن و کریستالی شدن زنجیره‌های هیدروکربنی ترکیبات غشایی جلوگیری می‌کند. بخش‌های هیدروکسیل مولکول‌های کلسترول در مجاورت گروه‌های قطبی مولکول‌های فسفولیپیدی قرار می‌گیرند و حلقه‌های کلسترولی در مجاورت زنجیره‌های هیدروکربنی فسفولیپیدهای غشایی جایگزین می‌گردند. با این طرز آرایش، مولکول‌های کلسترول از تراکم زنجیره‌های هیدروکربنی ممانعت کرده، از غلظت غشاء دو لایه می‌کاهند و بر سیالیت غشاء می‌افزایند. از این دیدگاه کلسترول همانند اسیدهای چرب غیراشباع در افزایش سیالیت غشاء مؤثر است و به همین دلیل اصطلاح افزایش کلسترول، افزایش اسیدهای چرب غیراشباع برابر افزایش سیالیت به کار گرفته می‌شود. (شکل ۶-۸).

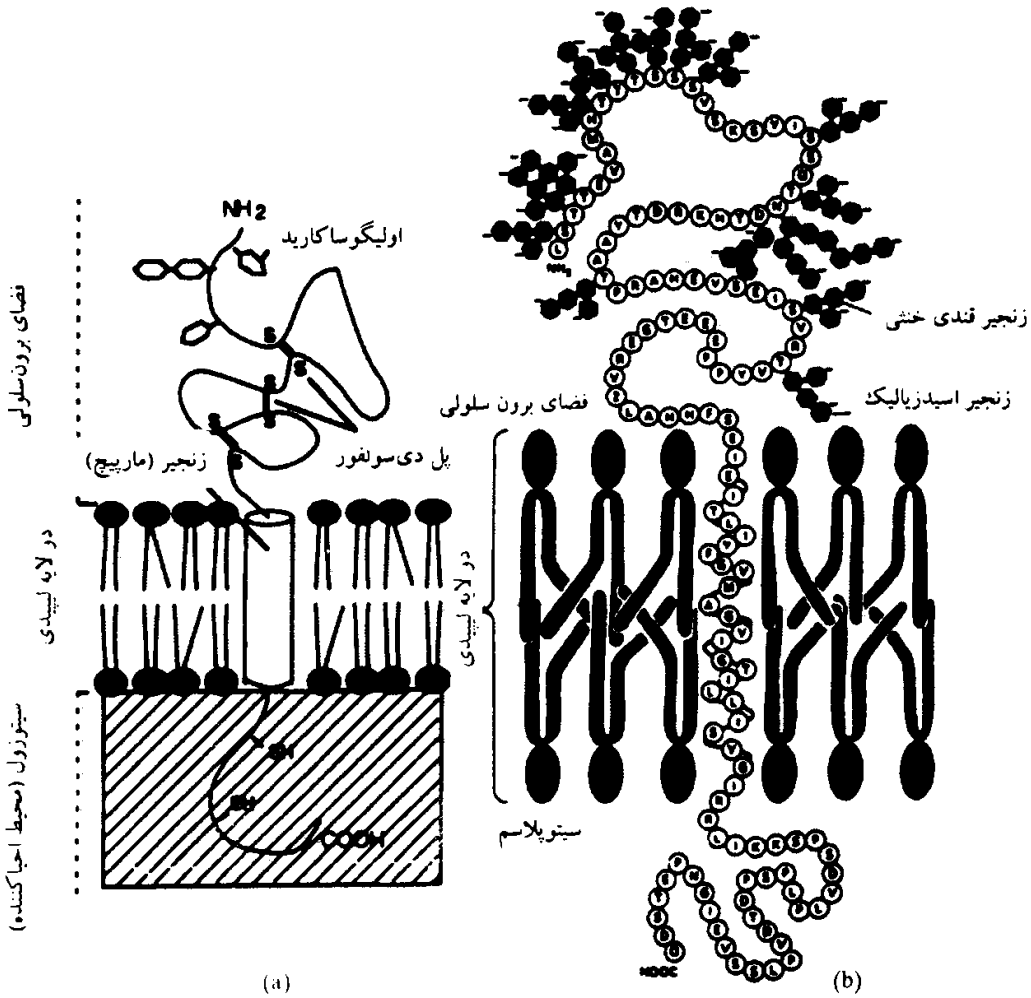
گلوسیدها در غشاء (گلیکولیپیدها و گلیکوپروتئین‌ها)

هیدرات‌های کربن در غشاء کلیه سلول‌های یوکاریوت به شکل اولیگوساکارید با پروتئین‌ها و یا چربی‌ها پیوند کووالانسی برقرار می‌کنند و به ترتیب گلیکوپروتئین‌ها و گلیکولیپیدها را پدید می‌آورند. اما مولکول‌های گلیکوپروتئین‌ها به نسبت ده به یک، نسبت به مولکول‌های گلیکولیپیدها فزونی دارند.

مولکول‌های دو گروه از سمت بیرونی غشاء برجسته به‌نظر می‌رسند. در ضمن در حالی که هر مولکول گلیکوپروتئین شاخه‌های جانبی زیادی به شکل اولیگوساکارید دارد (شکل ۶-۹)، گلیکولیپیدها تک شاخه‌ای



شکل ۶-۸. ساختمان کلسترول و قرار گرفتن آن بین مولکول‌های فسفولیپیدی غشاء



شکل ۶-۹. گلیکوپروتئین‌ها در غشاء سلولی a) عدم تقارن در سازمان غشایی b) مثالی از گلیکوپروتئین‌ها

هستند. میزان نسبی هیدرات‌های کربن موجود در غشاء سلول بین ۲ تا ۱۰ درصد محاسبه گردیده است. عدم تقارن

غشاء نه تنها دو لایه چربی بلکه پلی‌پپتیدها را نیز شامل می‌شود اما هیدرات‌های کربن حتی بیش از مولکول‌های چربی و پروتئینی، در غشاء نامتقارنند زیرا همیشه در سوی بیرونی نیمه خارجی غشاء قرار دارند. این امر در مورد غشاءهای درون سلولی نیز صادق است (جز در غشاء واکوئل‌ها).

در غشاء گویچه سرخ، هگزوز آمین، فوکوز و اسیدزیالیک[1] به ویژه به پروتئین‌ها چسبیده‌اند به‌طوری که عملاً تمام پروتئین‌های سطح خارجی گلیکوزیله‌اند. (Steck و Hainteld ۱۹۷۷). به دلیل وجود زنجیره‌های اسیدزیالیک، گروه‌های کربوکسیل و فسفات، سطح آزاد و بیرونی گلیکوپروتئین‌ها و گلیکولیپیدهای غشایی دارای بار منفی است، در نتیجه پروتئین‌های دارای بار مثبت می‌توانند با اندرکنش‌های الکتروستاتیکی به این سطح غشاء بچسبند.

در غشاء سلول‌های کبدی تنها بخش کمی از اسیدزیالیک به حالت گانگلیوزیدها (گلیکولیپیدها) است، در حالی که گانگلیوزیدها از مواد متشکله قابل توجه در سطح سلول‌های عصبی هستند و به احتمال در انتقال یون‌ها دخالت می‌کنند.

مواد گلوسیدی اصلی موجود در پوشش‌های سلولی موجودات عالی عبارتند از:

۱- گلیکواسفنگولیپیدها

۲- موکوپلی‌ساکاریدهای اسیدی

۳- گلیکوپروتئین‌ها

گلیکواسفنگولیپیدها

غشاء دارای گلیکواسفنگولیپیدهای خنثی و اسیدی (گانگلیوزیدها) می‌باشد. اسفنگولیپیدها یعنی لیپیدهای مرکبی که اسکلت ساختمانی آنها را اسفنگوزین یا بازهای مربوط به آن تشکیل می‌دهد از اجزا مهم تشکیل‌دهنده غشاء سلول‌های گیاهی و جانوری هستند. این ترکیب‌ها به خصوص در بافت عصبی و مغز به مقدار زیاد وجود دارند. تمام اسفنگولیپیدها سه جزء ساختمانی مشترک دارند:

الف - یک مولکول اسید چرب

ب - یک مولکول اسفنگوزین (سرآمیدی ساختمان اولیهٔ تمام اسفنگولیپیدهاست)

ج - یک گروه قطبی (سر)

گلیکولیپیدهای خنثی: این اسفنگولیپید دارای یک یا چند واحد قندی خنثی (به جای گروه سرقطبی) است که، بار الکتریکی ندارند و گلیکولیپید خنثی نامیده می‌شوند. ساده‌ترین آنها (سربروزیدها) هستند که گروه سرِ غیرقطبی (خنثی) آنها منوساکارید است که از طریق پیوند گلیکوزیدی β، به گروه هیدروکسیل سرآمید متصل است. سِربروزیدهای موجود در مغز و سایر بخش‌های دستگاه عصبی به علت داشتن D - گالاکتوز، گالاکتوسربروزید خوانده می‌شوند. سربروزیدهای موجود در بافت‌های غیرعصبی جانوران به علت داشتن D - گلوکز، گلوکوسربروزید خوانده می‌شوند. بعضی از اسفنگولیپیدهای خنثی در سطح خارجی گویچه‌های سرخ خون وجود دارند که مشخص کننده گروه خونی‌اند. (این ترکیبات تا حدی در هماهنگ بودن خون‌های دهنده و گیرنده مؤثرند) گلیکواسفنگولیپیدهای خنثی برحسب نوع قندنی که به واحد سرآمیدشان متصل است، توالی قرار گرفتن قندها و طول زنجیره‌های اولیگوساکاریدی طبقه‌بندی می‌شوند.

گلیکولیپیدهای اسیدی (گانگلیوزیدها): به علت داشتن اسید زیالیک (اسید سیالیک) در گروه سرقطبی خود در PH = ۷ دارای بار الکتریکی منفی هستند. در ماده خاکستری مغز به مقدار فراوان یافت می‌شوند؛ بیش از ۲۰ نوع

1- Sialic acid

گانگلیوزید شناسایی شده است که تفاوت آنها براساس تعداد و موقعیت اسیدسیالیک آنها می‌باشد.

عملکرد گلیکواسفنگولیپیدها

۱- از اجزای ترکیبات غشاء هستند و از آن جایی که گانگلیوزیدها خصوصاً به مقدار فراوان در انتهای رشته‌های عصبی یافت می‌شوند این احتمال وجود دارد که این ترکیبات در انتقال جریان‌های عصبی بین سیناپسی دخالت داشته باشند. همچنین در نقاط گیرنده استیل کولین و سایر ناقل‌های عصبی نیز وجود دارند.

۲- بعضی گلیکواسفنگولیپیدهای سطح سلولی نه تنها در ویژگی گروه خون نقش دارند بلکه در سایر ویژگی‌های بافت‌ها و اندام‌ها نیز دخالت دارند.

۳- در ایمنی بافتی و جایگاه‌های تشخیص سلول - سلول[1] که برای رشد و شکل‌گیری بافت‌ها اساسی است دخالت دارند.

۴- بسیاری از نقایص ژنتیکی و سرطان‌ها منجر به ذخیرهٔ ناهنجار گلیکواسفنگولیپیدهای مختلف می‌شوند.

گیکوپروتئین‌ها

درصد وزنی گروه‌های قند در گلیکوپروتئین‌ها از کمتر از ۱ درصد از آلبومین تا ۸۰ درصد در موکوپروتئین تغییر می‌کند. از جمله گلیکوپروتئین‌هایی که نسبت قند در آنها خیلی بالاست (پروتئوگلیکان‌ها)، گلیکوکالیکس است که از زنجیره‌های جانبی غشاء پلاسمایی است.

در مهره داران گلیکوپروتئین‌ها از نظر محل تشکیل و وظیفه اغلب خارج سلولی هستند و یا به وسیلهٔ سلول‌ها ترشح می‌شوند. به همین علت می‌توان فکر کرد که باقیمانده‌های قندها برای خروج از سلول به پروتئین متصل می‌گردند.

در میان گلیکوپروتئین‌هایی که دارای مکان و وظیفه خارج سلولی هستند می‌توان گلیکوپروتئین‌های پوشش سلولی، گلیکوپروتئین‌های خون، اشکال موجود در گردش خون، بعضی از هورمون‌های پروتئینی، پادتن‌ها، آنزیم‌های گوارشی مختلفی که در داخل روده ترشح می‌شوند، موکوپروتئین‌های ترشحات مخاطی و گلیکوپروتئین‌های ترشّح شده از غشاءهای پایه به خارج سلول را نام برد.

گلیکوپروتئین‌های پوشش سلولی را گلیکوکالیکس نامند. این پوشش در برخی بخش‌های غشاء سلولی از جمله سطح آزاد غشاء میکروویلی‌ها در روده باریک ضخامت بیشتری دارد و در مشاهده با میکروسکوپ الکترونی دارای بخش ذره‌ای و بخش رشته‌ای است. شکل ۶-۱۰ نمایی از ساختار گلیکوکالیکس را نشان می‌دهد.

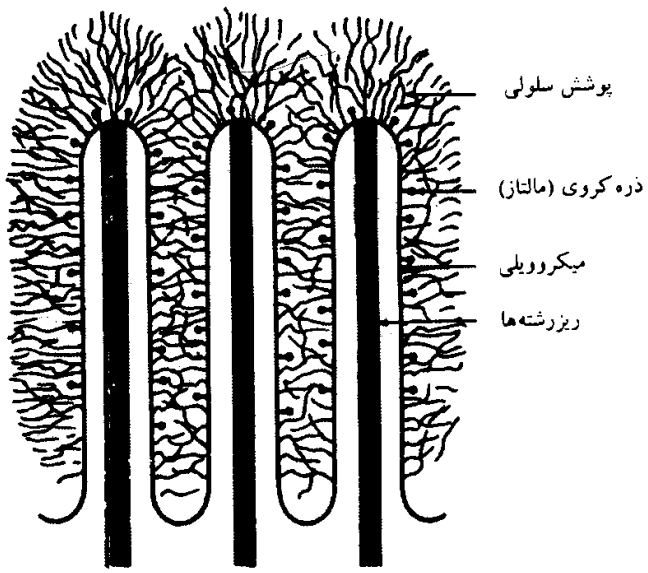
گلیکوکالیکس علاوه‌بر نقش پشتیبانی، اعمال دیگری هم دارد از جمله برخی ویتامین‌ها و قندها (دی ساکاریدها) برای ورود به سلول‌ها در منطقه گلیکوکالیکس تغییراتی را متحمل می‌شوند (مثلاً تبدیل دی‌ساکارید به مونوساکاریدها).

گرچه ترکیب کلی گلیکوکالیکس، گلیکوپروتئینی است اما در سلول‌های مختلف، ساختمانی اختصاصی دارد که بیشتر به نوع قندهای آن وابسته است. همین ساختمان اختصاصی در شناسایی سلول - سلول و امکان برقراری اتصال‌های سلولی مؤثر است. همچنین به دلیل تفاوت نوع پوشش گلیکوپروتئین سطح سلول‌ها است که، سلول‌ها نسبت به مواد حساسیت متفاوتی نشان می‌دهند. این وضع می‌تواند زیر بنایی برای حساسیت و عکس‌العمل متفاوتِ دستگاه گوارش در افراد مختلف نسبت به مواد غذایی و دارویی باشد. در برخی ناراحتی‌های دستگاه گوارش مثل زخم معده یا روده، کاهش ضخامت و تحلیل رفتگی گلیکوکالیکس عامل مهمی برای بروز ناراحتی‌ها است.

1- Cell to Cell recognition sites

اسید هیالورونیک[1]، کوندروئیتین[2] و هپارین از ترکیبات موکوپلی‌ساکاریدی هستند. موکوپلی‌ساکاریدهای اسیدی گروهی از هتروپلی‌ساکاریدها را شامل می‌شوند که از یک خانواده‌اند و به‌طور متناوب از دو نوع واحد مونوساکاریدی که حداقل یکی از آنها دارای عامل اسیدی می‌باشند، تشکیل شده‌اند.

هنگامی که موکوپلی‌ساکاریدها با پروتئین‌های مخصوصی ترکیب شوند مجموعه‌ای به نام موسین (موکوپروتئین) را می‌سازند که در این نوع از گلیکوپروتئین‌ها پلی‌ساکارید بیشترین قسمت از وزن ماده را تشکیل می‌دهد. موکوپروتئین‌ها ترکیبات ژلوزی، چسبنده و لغزنده‌ای هستند بعضی از آنها موجب لغزندگی و روانی محیط بین سلولی می‌شوند و بعضی دیگر به‌عنوان یک سیمان بین سلولی قابل انعطاف به کار می‌روند.



شکل ۶-۱۰. تجسمی از پوشش سلولی (گلیکوکالیکس). پوشش سلولی روده دارای ذراتی کروی به قطر ۵ نانومتر که هر یک با پایه‌ای به اندازه ۲ نانومتر به غشاء سلولی چسبیده است. بخش کروی دارای مالتاز است.

فراوان‌ترین موکوپلی‌ساکارید اسیدی، اسیدهیالورونیک است که در پوشش سلولی (غشاء) و مادهٔ زمینه خارج سلولی بافت‌های پیوندی مهره‌داران وجود دارد به‌علاوه در مایع زلال مفاصل و در زجاجیه چشم به‌صورت یک پلیمر خطی است. اسیدهیالورونیک PH = ۷ دارای بار منفی است در آب حل می‌شود و محلول‌های بسیار چسبنده‌ای را به وجود می‌آورد آنزیم هیالورونید از آن را هیدرولیز نموده و این هیدرولیز با کاهش چسبندگی همراه است.

کوندروئیتین: از نظر ساختمان شباهت زیادی به اسیدهیالورونیک دارد. به مقدار کم در ماده خارج سلولی دیده می‌شود (به‌طور آزاد) ولی مشتقات آن یعنی ترکیب آن با اسید سولفوریک مانند کوندروئیتین ۴ سولفات (کوندروئیتین A) و کوندروئیتین ۶ سولفات (کوندروئیتین C) مواد اصلی ساختمانی پوشش‌های سلولیِ غضروف، استخوان، قرنیه و برخی بافت‌های دیگر مهره‌داران را تشکیل می‌دهد.

هپارین: از خانواده موکوپلی‌ساکارید اسیدی است که از انعقاد خون جلوگیری می‌کند این ماده در ماستوسیت‌ها[3] و دیواره‌های سرخرگ‌ها وجود دارد.

پروتئین‌های غشاء

پروتئین‌ها ترکیب اصلی اغلب غشاءهای زیستی‌اند که نه تنها در ساختمان غشاء دخالت دارند بلکه به‌عنوان ناقل‌ها در هدایت و انتقال مواد به کار گرفته می‌شوند؛ در مکانیسم‌های تنظیم ویژه شناسایی اتصال دخالت دارند و به‌علاوه، غشاءهای پلاسمایی دارای آنزیم‌های زیاد، آنتی‌ژن‌ها و مولکول‌های گیرنده مختلف هستند.

جداسازی پروتئین‌ها از پلاسمالم و کشش سطحی ضعیف پلاسمالم از دلایل وجود پروتئین‌ها در غشاست. حدود ۵۲٪ از ماده خشک غشاء گلبول‌های قرمز از پروتئین است و در سایر غشاها مقدار پروتئین به‌طور متوسط

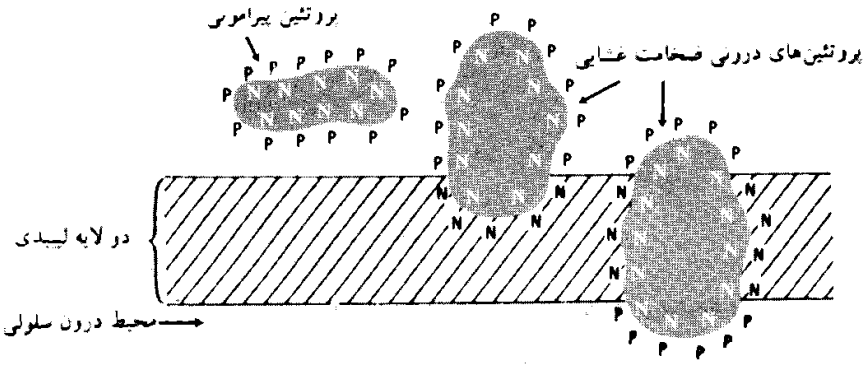
1- Hyaluronic acid 2- Chondroitine 3- Mastocyte

حدود ۶۵ - ۶۰٪ است. این پروتئین‌ها هم پروتئین‌های ساختمانی و هم پروتئین‌های آنزیمی هستند بنابراین به دو شکل در پلاسمالم وجود دارند. پروتئین‌های ساختمانی رفتار آنزیمی ندارند بلکه تنها نقش ساختمانی دارند.

پروتئین‌های غشایی را برحسب میزان پیوستگی آنها با غشاء و نیز روش‌های انحلال آنها (جدول ۶-۲) به دو گروه شامل: پروتئین‌های درونی (تداخل یافته[1]) و حاشیه‌ای (پیرامونی[2]) تقسیم‌بندی می‌کنند (شکل ۶-۱۱).

جدول ۶-۲. معیارهای تشخیص پروتئین‌های غشایی حاشیه‌ای و درونی

ویژگی‌ها	پروتئین‌های حاشیه‌ای	پروتئین‌های درونی
شرایط تفکیک از غشاء	تیمارهای نمکی ملایم نیروی یونی قوی یا عوامل شکنندهٔ یون‌های فلزی	لزوم عوامل قادر به شکستن پیوندهای آب‌گریز: پاک‌کننده‌ها، حلال‌های آلی، عوامل مخرّب
پیوستن با لیپیدها وقتی که به‌صورت محلول باشند	به‌طور معمول محلول - بدون لیپیدها	به‌طور معمول در حالت محلول پیوسته به لیپیدها
قدرت حل شدن بعد از تفکیک از غشاء	محلول و پراکنده به‌صورت مولکول‌ها در تامپون‌های آبکی خنثی	به‌طور معمول نامحلول یا پیوسته به‌هم‌اند در تامپون‌های آبکی خنثی
مثال‌ها	سیتوکروم C میتوکندری‌ها سپکترین گویچه‌های سرخ	بسیاری از آنزیم‌های پیوسته به غشاءها، آنتی‌ژن‌های ویژه هر بافت، گیرنده‌های داروها و هورمون‌ها



شکل ۶-۱۱. موقعیت پروتئین‌های درونی و پیرامونی: پراکنش اسیدهای امینه قطبی (P) و غیرقطبی (N) برای این دو نوع پروتئین مشخص شده است.

پروتئین‌های حاشیه‌ای به وسیله تیمارهای ملایمی از غشاء جدا می‌شوند، در محلول‌های آبکی حل می‌شوند و به‌طور معمول به لیپیدها پیوستگی ندارند. برای مثال از این پروتئین‌ها سپکترین را نام می‌بریم که می‌توان آن را به وسیله عوامل جداکننده از پیکره گویچه‌های سرخ جدا کرد؛ نمونه دیگر پروتئین‌های حاشیه‌ای سیتوکروم C در میتوکندری و استیل کولین استراز در غشاءهای الکتروپلاک‌ها است. همه این پروتئین‌ها به سهولت به وسیله محلول‌های نمکی غلیظ از غشاء جدا می‌شوند.

پروتئین‌های درونی ۷۰ درصد از دو نوع پروتئین غشایی را تشکیل می‌دهند و جداسازی آنها از غشاء پیچیده‌تر است. پروتئین‌های درونی به‌طور معمول در محلول‌های آبکی حل نمی‌شوند و به منظور جداسازی آنها به پاک‌کننده‌ها نیازمندیم.

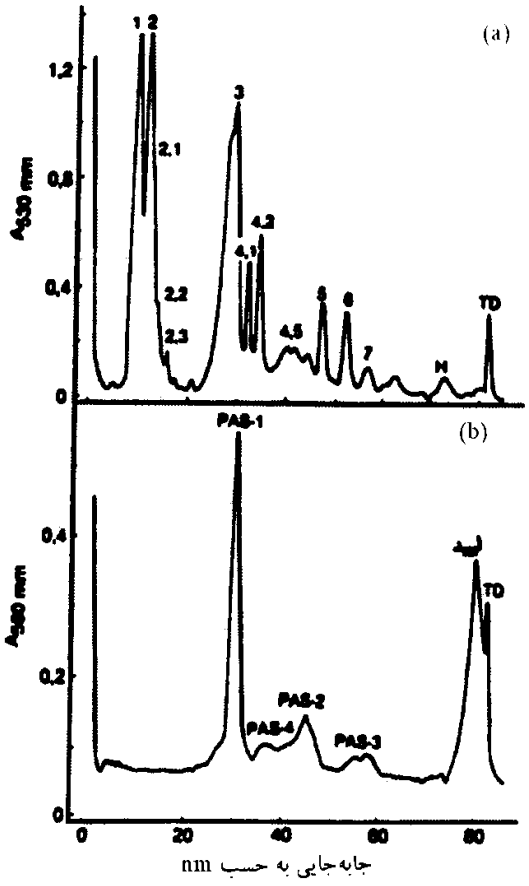
1- Integral protein 2- Peripheral protein

بررسی پروتئین‌های درونی غشاءهای مختلف نشان داده است که این پروتئین‌ها از نظر وزن مولکولی تقریباً ناهمگن‌اند. این پروتئین‌ها می‌توانند با اولیگوساکاریدها ترکیب شوند و به این ترتیب گلیکوپروتئین‌ها را به وجود آورند.

پلی‌پپتیدهای غشاء گویچه سرخ

روش متداول برای تفکیک پلی‌پپتیدهای غشایی حل کردن پیکره گویچه‌های سرخ در دوسیل‌سولفات‌سدیم (SDS) (یک شوینده یونی) و الکتروفورز محلول به‌دست آمده بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید است. به منظور مشخص کردن پروتئین‌ها می‌توان ژل را با آبی کوماسی[1] رنگ کرد. برای مشخص کردن گلوسیدها رنگ‌آمیزی ژل با معرف PAS صورت می‌گیرد. شکل ۶-۱۲ نمونه‌ای از نتایج حاصل از الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید است که در آن با استفاده از محل نوارها (ردیف‌ها) می‌توان وزن مولکولی پلی‌پپتیدها و با نسبت سطح مقطع، جرم نسبی آنها را محاسبه کرد (جدول ۶-۳). برای مثال، پلی‌پپتیدهای ۱ و ۲ با سپکترین (مشابه میوزین) که ۳۰ درصد از کل بخش پروتئینی را شامل می‌شود، تطبیق می‌کند.

پلی‌پپتید ۳، عمده‌ترین پروتئین درون غشاء که ۲۵ درصد کل پروتئین‌های غشایی را شامل می‌شود، نشان می‌دهد.



شکل ۶-۱۲. پروتئین‌ها و گلیکوپروتئین‌های موجود در غشاء گویچه سرخ. a) نتیجه وزن سنجی یک ژل که برای مشخص کردن پروتئین‌ها با آبی‌کوماسی رنگ شده است. b) نتیجه وزن سنجی ژلی که با معرّف PAS (اسیدپریودیک - شیف) برای مشخص کردن قندها به‌دست آمده است.

جدول ۶-۳. گلیکوپروتئین‌ها و پلی‌پپتیدهای عمدهٔ غشاء گویچه سرخ

ماده متشکله	وزن مولکولی	درصد پروتئین رنگ شده	مقدار پلی‌پپتیدهای سرپیکره	نامگذاری دیگر
پلی‌پپتیدها				
۱	۲۲۰۰۰۰	۱۵/۱	۲۱۶۰۰۰	سپکترین
۲	۲۱۵۰۰۰	۱۲/۷	۲۳۵۰۰۰	تکتین A
۳	۸۸۰۰۰۰	۲۲/۱	۹۲۰۰۰۰	پلی‌پپتید مشابه میوزین
۴/۱	۷۸۰۰۰	۴/۲	۱۸۰۰۰۰	
۴/۲	۷۲۰۰۰۰	۵/۰	۲۳۸۰۰۰	پلی‌پپتید مشابه آکتین
۵	۲۳۰۰۰۰	۴/۵	۲۵۹۰۰۰	GAPD
۶	۲۵۰۰۰۰	۵/۵	۲۵۰۰۰۰	
۷	۲۹۰۰۰۰	۳/۲	۲۰۳۰۰۰	
گلیکوپروتئین‌ها PAS	۵۵۰۰۰	۶/۷	۵۰۰۰۰	گلیکوفورین زنوگلیکوپروتئین

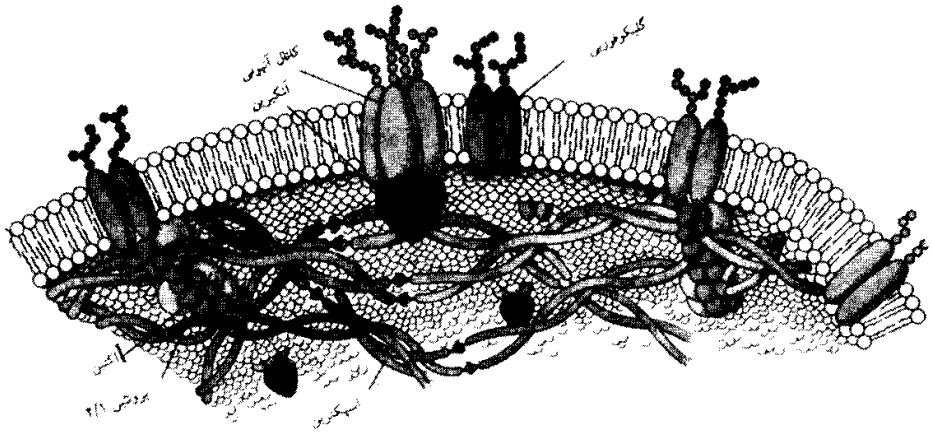
1- Commassie Blue

هر پروتئین غشاء سلولی به‌صورت نامتقارن پراکنده شده است.

سازمان مولکولی پروتئین‌ها بسیار نامتقارن است و این وضع را می‌توان به کمک معرف‌هایی که قادر به عبور از غشاء نیستند نشان داد. معرف را ابتدا به گویچه سرخ و سپس به پیکره سفید آن اثر می‌دهند. اختلاف بین دو نمونه می‌تواند اطلاعاتی را در مورد محل یک پروتئین مشخص بر سطح خارجی و داخلی غشاء به‌دست دهد. سیتوشیمی و میکروسکوپ الکترونی امکان مشخص کردن برخی از نشانه گذارهای اختصاصی دو طرف غشاء را فراهم ساخته است. برای مثال استفاده از پادتن‌های ضد سپکترین یا آکتین (پلی‌پپتید ۵) نشان می‌دهد که این پروتئین‌ها در سطح سیتوپلاسمی غشاء گویچه سرخ قرار دارند.

از سوی دیگر استیل‌کولین‌استراز را می‌توان با استفاده از فعال کردنش به وسیله آنزیم‌های تجزیه‌کنندهٔ پروتئین‌ها در سطح غشاء مشخص کرد.

می‌توان تأکید کرد که هر یک از پروتئین‌های سازنده غشاء به‌صورت نامتقارن در غشاء گویچه سرخ پراکنده شده‌اند. پلی‌پپتیدهایی که به راحتی حل می‌شوند در سطح خارجی غشاء قرار دارند و پیوند مستحکمی به ساختمان لیپیدی غشاء دارند. (شکل ۶-۱۳) طرحی را برای موقعیت پلی‌پپتیدهای اصلی و گلیکوپروتئین‌ها در غشاء گویچه سرخ نشان می‌دهد.



شکل ۶-۱۳. نمای عمومی موقعیت پلی‌پپتیدها و گلیکوپروتئین‌ها در غشاء سلولی

پلی پپتیدهای اصلی غشاء گویچه سرخ به خوبی شناخته شده‌اند.

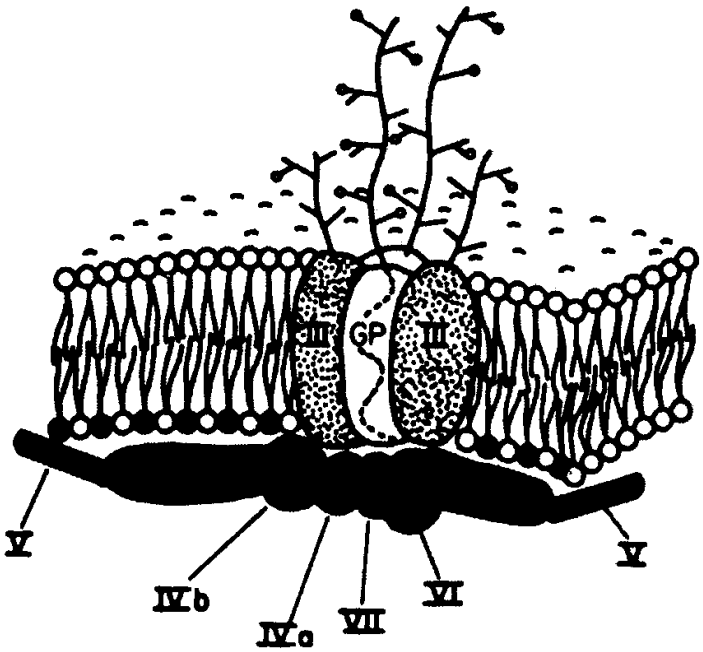
سطح سیتوپلاسمی غشاء گویچه سرخ دارای پلی‌پپتیدهای ۱ و ۲ (سپکترین، مشابه میوزین) و پلی‌پپتید ۵ (آکتین) است. این پروتئین‌ها با ساختمان‌های فوق مولکولی که ریز رشته‌ها را تشکیل می‌دهند، به‌هم پیوسته‌اند. ریز رشته‌ها را می‌توان به وسیله میکروسکوپ الکترونی و به ویژه میکروسکوپ نگاره مشاهده کرد. این ساختمان‌ها یک شبکه رشته‌ای را تشکیل می‌دهند که برای غشاء دو لایه لیپیدی سیال و پروتئین‌های درونی آن نوعی پشتیبان اسکلتی را به وجود می‌آورند. این مجموعه ریز رشته‌ها می‌تواند شکل ویژه گویچه سرخ را نیز کنترل کند، به نحوی که برای توضیح یکی از حالات غیرعادی و وراثتی گویچه سرخ که گویچه‌ها به جای شکل دو کاو، شکل کروی به خود می‌گیرند، تخریب احتمالی ریز رشته‌ها را مطرح می‌سازند (حالت سفروسیتوز[1] وراثتی).

پلی‌پپتیدهای دیگر سطح سیتوپلاسمی عبارتند از نوار ۴/۱، ۴/۲، ۶ و ۷. در غشاء نوار ۴/۲ و ۶ به شکل تترامرند (متشکل از ۴ زیر واحد) و نوار ۶ مونومر آنزیم گلیسرآلدئید - ۳ - P دئیدروژناز (G_3PD) است.

1- Spherocytosis

پروتئین اصلی درونی غشاء (نوار ۳) دارای وزن مولکولی ۹۰۰۰۰ دالتون است. این پروتئین از ضخامت غشاء می‌گذرد و دارای مقدار کمی گلوسید است که به طرف سطح خارجی غشاء قرار دارد (شکل ۶-۱۴). این پروتئین در غشاء به حالت دیمر است که دو بخش آن به وسیله پل‌های S – S به‌هم چسبیده‌اند.

در هر سلول ۵۰۰۰۰۰ تا ۶۰۰۰۰۰ از چنین دیمرهایی وجود دارد و این تعداد برای معرفی ذرات ۸ نانومتری موجود در غشاءهای سلولی که توسط روش انجماد و شکستگی خرد شده‌اند کافی است (به شرح بعدی در شکل ۶-۱۴ توجه شود). این پروتئین برای تسهیل نفوذ آنیون‌ها (مثل کلرور، بی‌کربنات) از خلال غشاء به کار گرفته می‌شود.



شکل ۶-۱۴. طرح فرضی غشاء گویچه سرخ که دو لایه پپتیدی را نشان می‌دهد (گروه‌های قطبی لیپیدی که سیاه رنگ‌اند. پراکندگی نامتقارن فسفاتیدیل سرین و فسفاتیدیل گلیسرول را نشان می‌دهند). GP، گلیکوفورین (نوارهای ۱ – PS و ۲ – PS)؛ III، نوار ۳؛ SP، سپکترین (نوار I)؛ IVa و IVb، مواد متشکله ۴/۱ و ۴/۲؛ V (نوار ۵، آکتین)؛ VI (نوار ۶، G_3PD)، VII (نوار ۷).
فهرست نوارها در جدول ۶-۳ مشخص شده است. پروتئین‌های حاشیه‌ای خاکستری رنگ‌اند.

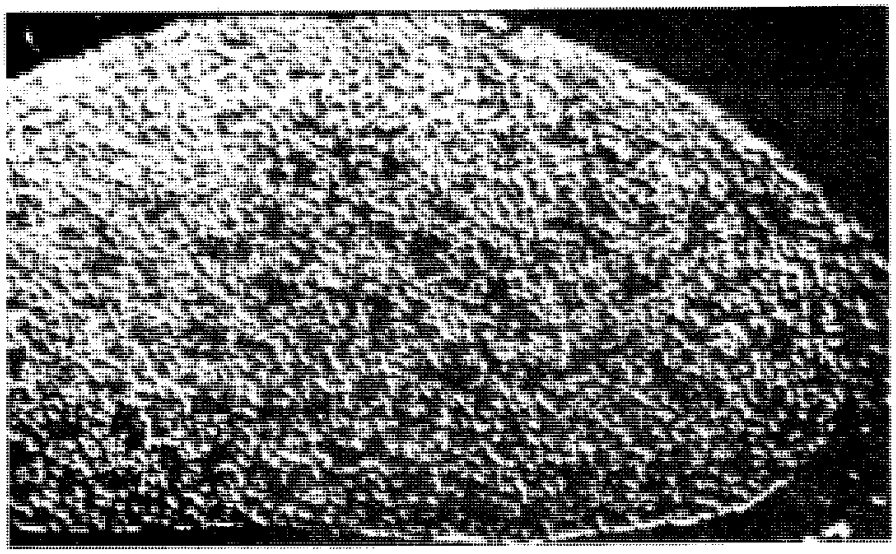
طرح نشان داده شده در شکل ۶-۱۴ دارای گلیکوپروتئین‌های زیادی از جمله نوار ۳ است که پروتئین اصلی است که در ضخامت غشاء جای می‌گیرد، این پروتئین گلیکوفورین است. این پروتئین دارای وزن مولکولی ۵۵۰۰۰ است و ۶۰ درصد از این وزن گلوسیدی است. نزدیک به سر COOH – این مولکول یک بخش بسیار آب‌گریز وجود دارد که با لیپیدهای غشاء واکنش دارد. انتهای NH_2 – در این مولکول بسیار آب‌دوست است، به سوی محیط خارج است و به اولیگوساکاریدهایی که در سطح خارجی غشاء جای دارند چسبیده است. سر COOH – احتمالاً با محیط درونی گویچه سرخ تماس دارد.

گلیکوپروتئین‌های سطح خارجی دارای پادگن‌های گروه‌های خونی ABO هستند که به پروتئین‌ها چسبیده‌اند، این گلیکوپروتئین‌ها همچنین دارای گروه‌های MN هستند که با آنتی‌سرم‌های خرگوش، ویروس آنفلونزا، فیتو هم آگلوتینینِ جوانه گندم و اکنش نشان می‌دهند.

محاسبات انجام شده نشان می‌دهند که در هر گویچه سرخ انسان، ۷۰۰۰۰۰ گلیکوفورین وجود دارد. این گلیکوپروتئین ۸۰ درصد تا ۹۰ درصد اسیدزیالیک دارای بارمنفی موجود در سطح سلول را شامل می‌شود.

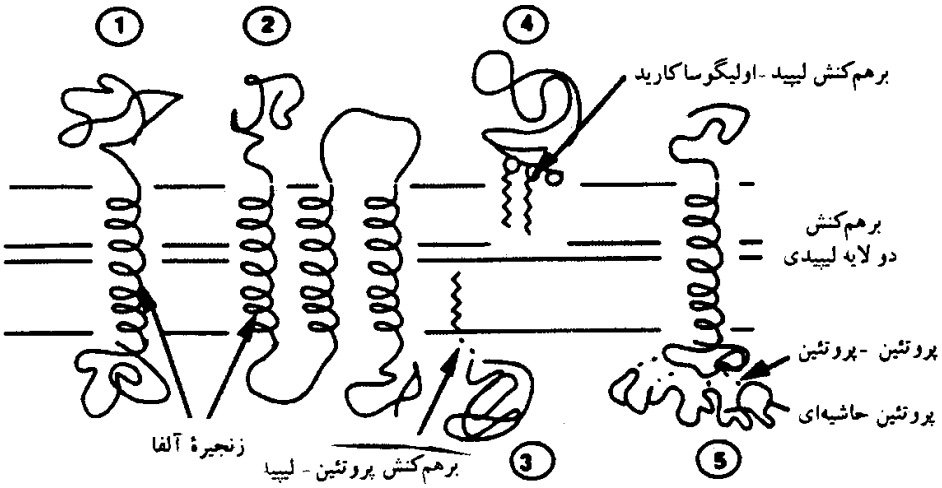
استفاده از روش‌های جدید و دقیق مثل روش انجماد و شکستگی و مشاهده سطوح شکستگی غشاء پس از تیمارهای لازم، وجود ذرات زیادی را در سطح شکستگی نشان داده است. بسیاری از این ذرات پروتئین‌های غشایی را مشخص می‌سازند (شکل ۶-۱۵).

در بین پروتئین‌هایی از غشاء که خاصیت آب‌گریزی بیشتری دارند، پروتئولیپیدها با این ویژگی‌ها مشخص می‌شوند که پیوندهای قوی با لیپیدها به وجود می‌آورند و در حلال‌های آلی حل می‌شوند.



شکل ۶-۱۵. میکروگراف الکترونی یک پیکره گویچه سرخ که پس از اعمال روش انجماد و شکستگی و ایجاد برجستگی به وسیله غبار فلزات گرفته شده است. بخش اعظم سطح غشاء دارای ذراتی است که در سطح شکستگی غشاء جاگرفته‌اند (×۸۸۰۰۰).

این پروتئین‌ها که اول بار به وسیله فالک[1] و لیز[2] از پوشش میلینی جدا شده‌اند بعدها عملاً در تمام غشاءهای سلولی شناخته شدند. بررسی‌های بعدی نشان داد که این پروتئین‌ها، گیرنده‌های ناقل‌های سیناپسی هستند و یا حفره‌هایی را در خلال (ضخامت) این غشاءها تشکیل می‌دهند (شکل ۶-۱۶).



شکل ۶-۱۶. برهم‌کنش (گلیکو) پروتئین‌ها و لیپیدها در غشاء. ۱ و ۲) پروتئین‌های عرضی غشایی با تعداد زیادی زنجیره‌های آلفا ۳) برهم‌کنش پروتئین - لیپید ۴) برهم‌کنش اولیگوساکارید - لیپید ۵) پروتئین حاشیه‌ای دارای عملکرد با یکی از پروتئین‌های عرض غشایی

پراکندگی نامتقارن آنزیم‌ها در غشاء سیتوپلاسمی

در غشاءهای پلاسمایی جدا شده از سلول‌ها بیش از ۳۰ آنزیم شناخته شده‌اند. آنزیم‌هایی که به‌طور معمول در غشاء موجودند عبارتند از ′۵ نوکلئوتیدازها؛ $ATPase - Mg^{++}$؛ $ATPase - Mg^{++}$[3] فعال شده به وسیله Na^+ و K^+؛فسفاتازهای قلیایی؛ آدنیلات‌سیکلازها؛ فسفومونواستراز اسیدها و RNAaseها (ریبونوکلئازها). برخی از این آنزیم‌ها جایگاهی ترجیحی دارند؛ برای مثال فسفات قلیایی و ATPase در مویرگ‌های صفراوی فراوانند و دی‌ساکاریدازها در پرزهای رودهٔ کوچک موجودند. برای بسیاری از این آنزیم‌ها جایگاهی خاص و آرایشی به‌صورت موزائیک منظور شده است. دی‌ساکاریدازها واحدهای گویچه‌ای شکلی را به درشتی ۵ تا ۶ نانومتر تشکیل می‌دهند که سطح غشاء میکروویلی‌ها را می‌پوشاند.

غشاء پلاسمایی فاقد زنجیر تنفسی و فعالیّت تجزیهٔ گلیکوژن است.

1- Falch 2- Lees

۳- به صورت RNases ها هم نوشته می‌شود.

یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های چسبیده به غشاء $ATPase - Mg^{++}$ فعال شونده به وسیله Na^+ و K^+ است. زیرا نقش عمده‌ای در انتقال یون‌ها از خلال غشاء پلاسمایی دارد. این آنزیم به وجود لیپیدها نیازمند است و هنگامی که تمامی لیپیدها از غشاء استخراج شده باشند به حالت غیرفعال درمی‌آید.

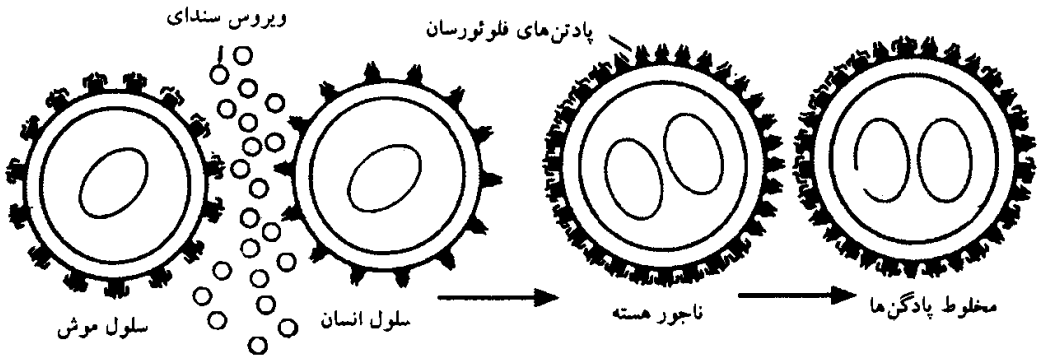
پراکندگی آنزیم‌ها نیز نامتقارن است. برای مثال سطح خارجی اریتروسیت‌ها دارای استیل‌کولین‌استراز، نیکوتین‌آمید، آدنین‌دی‌نوکلئوتیداز و جایگاه چسبیدن او آبائین[1] آنزیم Na^+، $ATPase\ K^+$ است. سطح درونی دارای NADH – دیافوراز، G_3PD، آدنیلات‌سیکلاز، پروتئین کیناز و ATPase است.

گردهمایی پروتئین‌های غشاء و تشکیل لکّه[2]

از ویژگی‌هایی است که از مایع بودن غشاء پلاسما سرچشمه می‌گیرد، در این حالت مولکول‌های پروتئین که در حالت عادی در امتداد غشاء پراکنده‌اند گرد هم آمده لکه‌هایی را پدید می‌آورند این روند در لنفوسیت‌ها به علت داشتن مولکول‌های ایمنوگلوبولین که ویژه قبول پادگن‌های اختصاصی هستند، بیش از سایر سلول‌ها قابل بررسی است، زیرا به راحتی می‌توان به تولید پادتن بر ضد پروتئین‌های گیرنده‌ای که غشاء پلاسما به آن مجهز است، پراخت و آنگاه با افزودن آن به لنفوسیت‌ها در محیط کشت، روند یاد شده را مورد پژوهش قرار داد. پادتن که از دو ظرفیت برخوردار است با مولکول‌های گیرنده‌ای که از جنس ایمنوگلوبولین هستند، اتصال برقرار کرده، شبکه‌ای را پدید می‌آورد، شبکه‌های غشاء متراکم شده، سرانجام لکه‌ای را پدید می‌آورند. اگر یکی از دو ظرفیت پادتن را حذف کنند، در این صورت پس از ترکیب با گیرنده‌های غشاء لنفوسیت‌ها، آنها دست نخورده باقی می‌مانند زیرا پادتن تک ظرفیتی توانایی تولید شبکه‌ای را پس از اتصال با گیرنده از دست می‌دهد.

خاطر نشان می‌گردد که ترکیب پادتن با پادگنِ اختصاصی خود، در سطح غشاء تابع قوانینی است که در لوله آزمایش نیز انجام می‌پذیرد با این تفاوت که در سطح غشاء بُعد دیگری نیز به آن افزوده می‌شود، زیرا مولکول‌ها توان جابه‌جایی از خود نشان می‌دهند.

جابه‌جایی حتی پس از ترکیب پادگن با پادتن صورت می‌گیرد و این امر را از سیالیّت دو لایه ناشی می‌دانند. پیش از آن که به سیالیّت غشاء پی‌برده شود، حضور لکه در سطح غشاء پلاسما را امری دایمی می‌دانستند و از این رو گمان بر این بود که با افزودن پادگن‌ها، تنها به برملاکردن آنها می‌پردازند (شکل ۶-۱۷).



شکل ۶-۱۷. دیاگرامی که تجربه الحاق سلولی فرای[3] و ادیدین[4] را نشان می‌دهد. یک سلول موش و یک سلول انسان که دارای سطوح پادگنی مختلفی هستند با پادتن‌های فلوئورسان نشانه‌گذاری شده و به وسیلهٔ ویروس سندای به یکدیگر ملحق گردیده‌اند. نیمی از ناجور هسته‌ای که تولید شده دارای یک نوع پادگن و نیمهٔ دیگر آن دارای پادگن نوع دیگری می‌باشد. الحاق بعد از ۴۰ دقیقه به علت حرکت پادگن در سرتاسر غشاء انجام می‌گیرد.

1- Ouabaine 2- Patch formation 3- Frye 4- Edidin

به‌طور کلی نتایج زیر را در رابطه با تشکیل لکه بر روی غشاء می‌توان مطرح کرد:

۱- پروتئین‌ها در غشاء سلول دارای حرکت هستند.

۲- حرکت پروتئین‌ها تصادفی نیست و به هر طرف نمی‌توانند حرکت کنند.

طرح‌های مولکولی غشاء سلولی

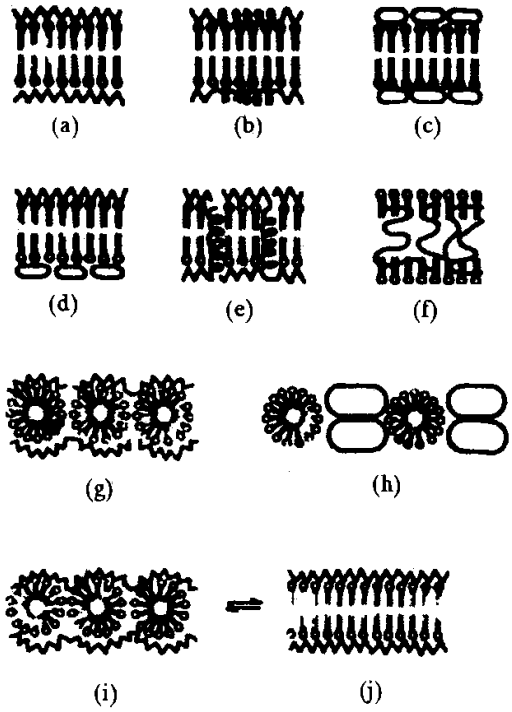
قبل از آن که جدا کردن غشاءهای پلاسمایی امکان‌پذیر شود، نظریات مربوط به ساختمان مولکولی غشاء به‌طور معمول بر پایه اطلاعات غیرمستقیم بودند. از آنجا که حلال‌های لیپیدی به سهولت از غشاءهای پلاسمایی نفوذ می‌کنند، اورتن (۱۹۰۲) این فرضیه را مطرح کرد که غشاء پلاسمایی از لایه نازک لیپیدی تشکیل شده است.

در ۱۹۲۶، گورتر و گرندل دریافتند که مقدار لیپیدی که در گویچه‌های سرخ همولیز شده وجود دارد برای تشکیل دو لایه ممتد لیپیدی بر تمامی سطح گویچه سرخ کافی است و نظر دادند که غشاء پلاسمایی بایستی از دو لایه از مولکول‌های لیپیدی تشکیل شده باشد. این نظریه با نتایج حاصل از اندازه‌گیری‌های الکتریکی که وجود مقاومت الکتریکی بالایی برای غشاء را به‌دست می‌دهد توافق دارد. این مقاومت بالای الکتریکی از آنجاست که یون‌ها به دشواری از لایه لیپیدی می‌گذرند.

بررسی کشش سطحی بین سلول‌های مختلف نیز اطلاع مستقیم دیگری را در مورد ساختمان مولکولی غشاء پلاسمایی به‌دست داده است. کشش یک سطح حد فاصل آب - روغن حدود ۱۰ تا ۱۵ دین بر سانتیمتر است در حالی که کشش سطحی سلول‌ها تقریباً هیچ است. تصور شده است که این کشش سطحی ضعیف نتیجه وجود لایه‌های پروتئینی است که مواد متشکله لیپیدی غشاء را می‌پوشانند. در واقع وقتی مقدار کمی از پروتئین‌ها به یک ساختمان متشکل از مجموعه لیپید - آب افزوده می‌شود، کشش سطحی متناسب با آن کاهش می‌یابد. به منظور توضیح تمامی این ویژگی‌ها دانیلی و داوسون (۱۹۳۵) این فرضیه را مطرح کردند که غشاء پلاسمایی دارای دو لایه لیپیدی است که پروتئین‌ها به دو طرف سطح تماس لیپید - آب آن چسبیده‌اند.

شکل ۱۸-۶، a تا f طرح‌های مختلف غشایی را که بر پایه فرضیه دو لایه لیپیدی پی‌ریزی شده‌اند، نشان می‌دهد. این طرح‌ها از نظر نوع پروتئین‌ها (مثلاً گویچه‌ای، α یا β هلیس) یا در نتیجه منظور داشتن نفوذ پروتئین‌ها به درون دو لایه لیپیدی با یکدیگر اختلاف دارند.

طرح‌های دیگری نیز دارای میسل‌های لیپیدیِ گویچه‌ای، پروتئین‌های گویچه‌ای یا ترکیبی از این دو پیشنهاد شده است (شکل ۶-۱۸، g تا i)؛ همچنین یک



شکل ۶-۱۸. طرح‌های مختلف مولکولی که برای غشاء پلاسمایی منظور شده است: a – f طرح‌های استوار بر یک ساختمان دو لایه لیپیدی. g – i، مدل‌های استوار بر ترتیب‌های گویچه‌ای. a)، پروتئین در فرم β؛ b)، آلفاهلیس، c)، پروتئین گویچه‌ای. d)، عدم تقارن در پروتئین. e)، نفوذپذیری نسبی از راه مجاری با منافذ پروتئینی. f)، پروتئین‌ها در لایه لیپیدی مضاعف؛g)، میسل لیپیدی با پروتئین β؛ h)، میسل‌های لیپیدی با پروتئین گویچه‌ای؛ i) و j) تبدیل ساختمان گویچه‌ای به ساختمان دو لایه‌ای.

تغییر حالت از ساختمان گویچه‌ای به ساختمان دو لایه‌ای نیز پیشنهاد شده است. (شکل j- ۶-۱۸).

این طرح‌های گویچه‌ای به اندازه کافی برای بیان مقاومت الکتریکیِ زیاد غشاء رضایت بخش نیستند. میکروسکوپ الکترونی آگاهی‌هایی را در مورد ساختمان ظریف غشاء پلاسمایی به‌دست داده است و وجود اختلافات زیاد ساختمانی این غشاء و سیتوپلاسم مجاور آن را در سلول‌های مختلف مشخص ساخته است.

برای مطالعهٔ ساختمان غشاء پلاسمایی، بایستی برش‌های بسیار نازکی (حدود ۲۰ نانومتر) از آن تهیه کرد، زیرا بدون داشتن چنین برش‌هایی، آرایش‌های مختلفی برحسب جهت برش برای غشاء مشاهده خواهد شد.

وقتی که غشاء دقیقاً عمود بر جهت برش قرار گرفته باشد، خیلی نازکتر به‌نظر می‌رسد. بهترین قدرت تشخیصی که با استفاده از فن تهیه برش‌های نازک به‌دست آمده است، ضخامتی بین ۶ تا ۱۰ نانومتر را برای غشاء پلاسمایی که در سطح همه سلول‌ها وجود دارد نشان داده است.

غشاءهای دو سلولی که به‌طور نزدیکی تماس داشته باشند به‌صورت خطوط متراکمی به نظر می‌رسند که به وسیله فضایی از ۱۱ تا ۱۵ نانومتر از یکدیگر جدا شده‌اند. این فضا بسیار یکنواخت است و دارای موادی است که تراکم الکترونی کمی دارند.

مواد متشکله این فضای بین سلولی را همانند نوعی سیمان به حساب می‌آورند.

طرح غشاء واحد - ارزشیابی مجدد تصاویر گرفته شده به وسیله میکروسکوپ الکترونی

مشاهده این وضعیت که غشاء سلولی به‌طور معمول دارای ساختمان سه بخشی متشکل از دو لایه خارجی ۲ نانومتری و یک لایه میانی حدود ۳/۵ نانومتر است روبر تسن رابه ارائه (طرح غشاء واحد) هدایت کرد. تصویر گرفته شده به وسیله میکروسکوپ الکترونی بنا به طرح دانیلی - داوسون به این شکل تفسیر شده است که لایه روشن به زنجیره‌های هیدروکربنی لیپیدها و لایه‌های متراکم، با پروتئین‌ها مطابقت می‌کند. این طرح غشاء واحد برای تمام انواع غشاءهای درون سلولی نیز منظور شده است. این طرح بسیار ساده است و پروتئین‌های زیادی را که از غشاء می‌گذرند به حساب نمی‌آورد؛ این طرح بر روی میکروگراف‌هایی که با درشت‌نمایی‌های زیاد گرفته شده‌اند به راحتی دیده می‌شود و در آن پل‌های بسیار باریکی که از غشاء می‌گذرند نیز رؤیت می‌شوند (شکل ۶-۱۹).

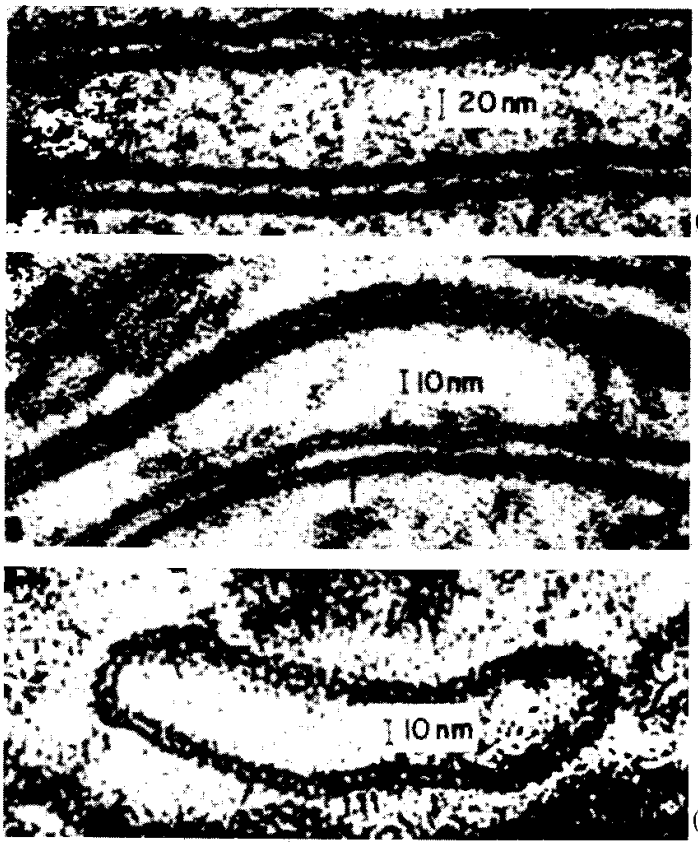
به تازگی این فرضیه غشاء واحد به وسیله روش‌هایی که از جدا شدن پروتئین‌ها ضمن تهیه نمونه‌ها برای مشاهده با میکروسکوپ‌های متداول جلوگیری می‌کنند و نیز روش ایجاد شکستگی در نمونه‌های منجمد شده مورد ارزشیابی مجدد قرار گرفته است.

با این روش‌ها غشاء دانه‌دانه به‌نظر می‌رسد منظره‌ای که موجب این تصور است که سهم زیادی از پروتئین‌ها از غشاء می‌گذرند. بر بنای این آگاهی‌ها طرح غشاء واحد بسیار تصنّعی به نظر می‌رسد.

در حال حاضر طرح موزائیک سیال اغلب مورد توافق است.

آگاهی‌های کنونی در مورد سازمان مولکولی غشاءهای زیستی به ویژه از داده‌های حاصل از تجزیه‌های شیمیایی و به کارگیری روش‌های بیوفیزیکی زیادی به‌دست آمده است.

طرح یک موزائیک سیال ساختمان غشاء را بر بنای اندیشه‌های مهمی که از روش‌های مختلف تحقیق به‌دست آمده، خلاصه می‌کند. این طرح پیشنهاد می‌کند که: (۱) لیپیدها و پروتئین‌های درونی غشاء با آرایشی به‌صورت موزائیک قرار گرفته‌اند، (۲) غشاءهای زیستی ساختمان‌های تقریباً سیّالی هستند که در آنها لیپیدها و پروتئین‌های درونی غشایی می‌توانند حرکت کرده و در تمام دو لایه غشاء جابه‌جا شوند.



شکـــل ۶-۱۹. a)، میکروگراف الکترونی غشاءهای سلولی سلول‌های رودهای (m)، که ساختمان سه بخشی غشاء (غشاء واحد) را نشان می‌دهد. ei، فضای بین سلولی ۲۴۰۰۰۰×. b)، غشاءهای سلولی در هیپوتالاموس موش که ساختمان غشاء واحد را نشان می‌دهند. فلش‌ها جزئیات بیشتری از غشاء را مشخص می‌سازند. فلش‌های قسمت بالای شکل ناحیه‌ای را مشخص می‌سازند که در آن دو غشاء به‌هم چسبیده‌اند (اتصال سخت) و در آنجا فضای بین سلولی وجود ندارد. ۳۶۰۰۰۰×، c) همان وضع شکل B، که پل‌های کوچکی (فلش‌ها) را در عرض غشاء نشان می‌دهد. ۳۶۰۰۰۰×

پندار سیالیّت مشخص می‌کند که مواد اصلی سازنده غشاء تنها به وسیله کنش‌های غیرکووالانسی در جای خود قرار گرفته‌اند. به منظور درک بهتری از سازمان مولکولی غشاء بایستی در نظر داشت که نه تنها لیپیدها بلکه بسیاری از پروتئین‌ها و گلیکوپروتئین‌های غشاء مولکول‌هایی آمفی‌پاتیک‌اند. کلمه آمفی‌پاتیک که در سال ۱۹۳۶ به وسیله هارتلی به کار گرفته شد به این مفهوم است که در یک مولکول، هم گروه‌های آب‌خواه و هم گروه‌های آب‌گریز وجود دارد. این مولکول‌های آمفی‌پاتیک توده‌های بلورین سیالی را تشکیل می‌دهند که در آنها گروه‌های قطبی به سوی بخش آبکی و گروه‌های غیرقطبی در داخل غشاء دو لایه‌ای قرار گرفته‌اند (شکل ۶-۱۹).

در طرح موزائیک سیالی که در شکل ۶-۱۹ نشان داده شده است، پروتئین‌های درونی غشاء در دو لایه کم‌وبیش ممتد چربی فرورفته‌اند. بخش‌های قطبی آنها به سطح چسبیده و بخش‌های غیرقطبی در بخش آب‌گریز غشاء فرورفته‌اند.

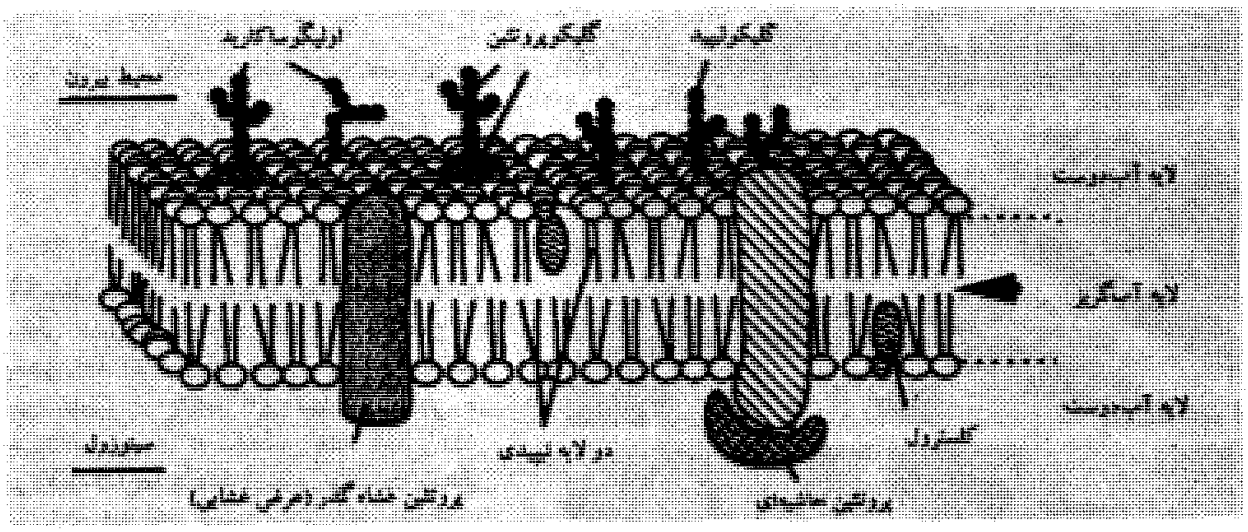
این طرز آرایش می‌تواند مشخص سازد که چرا جایگاه‌های فعال آنزیم‌های مختلف و گلیکوپروتئین‌های پادگنی به طرف سطح خارجی غشاء قرار می‌گیرند. مشخص شده است که پروتئینی با درشتی متناسب و یا گروهی از زیر واحدهای پروتئینی می‌تواند به‌طور کامل در عرض غشاء سلولی قرار گیرند (پروتئین‌های غشاء گذر یا پروتئین‌های ترا غشایی[1]).

چنین پروتئین‌هایی می‌توانند از هر سوی غشاء با حلال آبکی در تماس باشند. طرح مشابه دیگر نیز برای گیرنده‌های کولیزژیک پیشنهاد شده است. این طرح نیز به‌طور معمول می‌پذیرد که بخش اعظم فسفولیپیدهای غشاء به‌صورت دو لایه‌ای قرار گرفته‌اند.

بررسی غشاء گویچه‌های سرخ و سلول‌های دیگر با روش انجماد و شکستگی یکی از بهترین دلایل وجود طرح غشایی به‌صورت موزائیک سیال با پروتئین‌های جای گرفته در آن است.

1- Transmembrane Protein

با این روش در پیکره گویچه‌های سرخ ذرات بسیاری قابل رؤیت می‌شوند که هر یک تقریباً ۸ نانومتر قطر دارند. تصور می‌شود که این ذرات پروتئین‌هایی باشند که در سطح شکستگی وسط دو لایه لیپیدی قرار گرفته‌اند (شکل ۶-۲۰).



شکل ۶-۲۰. مدل موزائیک سیّال سینجر و نیکلسون. نمای سه لایه نشان دهنده دو لایه لیپیدی و پروتئین‌های گویچه‌ای (پوشش سلولی نشان داده نشده است).

هر گویچه سرخ دارای ۵۰۰،۰۰۰ تا ۶۰۰،۰۰۰ از این ذرات است که بیشتر به نیمه داخلی غشاء متصل‌اند. نامگذاری تصاویری که با روش انجماد و شکستگی گرفته شده، هنگام شرح ساختمان کلروپلاست‌ها آورده شده است.

تاکنون یادآور شده‌ایم که این ذرات دیمرهای پلی‌پپتیدهای نوار ۳ هستند و برخی از آنها نیز با مجاریی که نسبت به آنیون‌ها تراوا هستند، مطابقت می‌کنند.

میزان پراکندگی یا تجمع این ذرات در غشاء تحت تأثیر سیستم (سپکترین - آکتین) است. این وضعیت وجود نوعی ارتباط بین این سیستم و دیمرهای نوار ۳ در غشاء زنده را تأیید می‌کند.

آرایش به‌صورت موزائیک عدم تقارن موجود در غشاء را نیز منظور می‌دارد، به این معنی که مواد تشکیل دهندهٔ ویژه‌ای در بخش داخلی یا خارجی غشاء حالت غالب دارند. این طرح همچنین وجود چرخش آزاد ماکرومولکول‌ها را در عرض غشاء مطرح می‌کند به نحوی که طرز قرار گرفتن آن به خوبی با انتقال اطلاعات از خلال غشاء سلولی سازگار باشد.

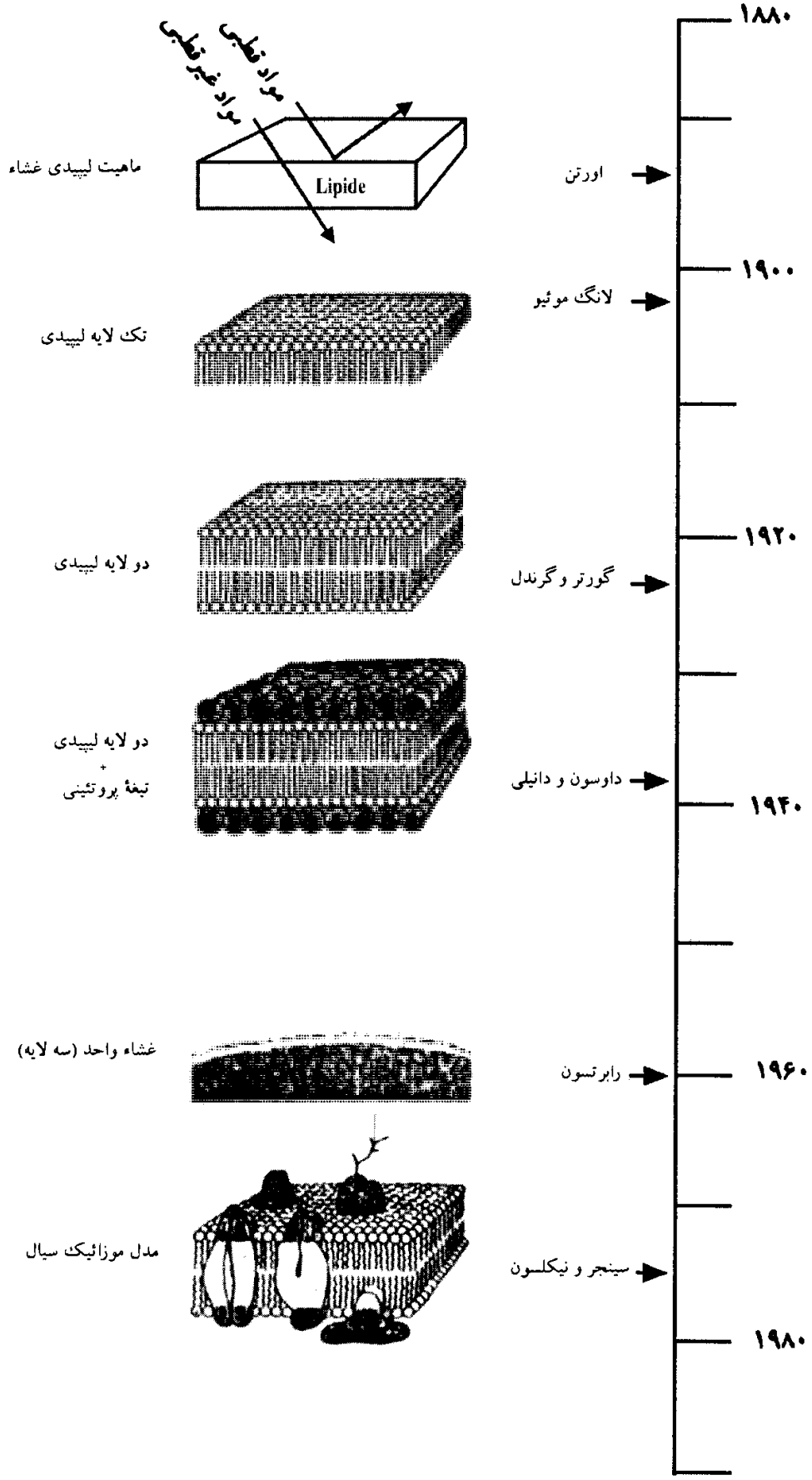
سیالیّت غشاء در این طرح آزادی زیادی را که پروتئین‌ها و لیپیدها برای حرکتشان در غشاء دو لایه‌ای دارند توجیه می‌کند. سیالیّت لیپیدها به دو عامل بستگی دارد:

۱- درجه اشباع بودن زنجیره‌های هیدروکربنی

۲- دمای محیط

بخش قابل توجهی از لیپیدهای غشایی اشباع نشده‌اند به‌طوری که نقطه ذوب غشاء دو لایه لیپیدی پایین‌تر از گرمای بدن جاندار است.

در پایان بحث به منظور امکان مقایسه‌ای سریع بین مدل‌های مختلف پیشنهاد شده برای سازمان مولکولی غشاء سلولی، طرحی از این مدل‌ها آورده شده است. (شکل ۶-۲۱).



شکل ۶-۲۱. توالی زمانی کشف و ارائه مدل‌های مختلف غشاء سلولی

اعمال زیستی غشاء سیتوپلاسمی

پلاسمالم به‌عنوان مرز سلول حد واسط بین سلول و محیط خارج است؛ نگهدارنده ترکیبات سازندهٔ سلول و جایگاه اصلی مبادلهٔ مواد بین سلول و محیط است پس نقش اصلی مبادله مواد را به عهده دارد. علاوه بر این پلاسمالم در حفظ ترکیبات سلول، شناسایی سلول - سلول، برقراری اتصال‌های سلولی، ایمنی سلول و سازگاری‌های سلول با محیط نقش اساسی دارد. در برخی سلول‌ها، پلاسمالم به منظور انجام بهتر نقش‌های زیستی خود تمایزهای ویژه‌ای پیدا می‌کند که از آنها، تشکیل میکروویلی‌ها[1] و اتصال‌های سلولی[2] را می‌توان نام برد.

تبادل مواد مختلف بین محیط داخل و خارج سلول

I. مقدمه: اهمیت و پیچیدگی موضوع

سهولت نسبتاً زیادی را که برای نفوذ مواد محلول در محیط خارج به سلول وجود دارد، معمولاً با «تراوایی سلولی» بیان می‌کنند.

اهمیت موضوع بسیار زیاد است و در فیزیولوژی فصلی نیست که در آن تراوایی وارد نباشد. قبل از هر چیز، اعمال تغذیه و دفع، تبادلات مواد بین سلول و محیط خارج را شامل می‌شوند، اما تنها مواردِ این وضعیت نیستند. سعی شده که حالت‌های تحریک و بی‌حسی را از راه تغییرات تراوایی بیان کنند، گرچه در حال حاضر نمی‌توان این نظریه را با قاطعیت مطرح کرد، اما تردیدی نیست که در هر حال، این حالت‌ها با چنین تغییراتی همراهند.

در فصول گذشته دیده‌ایم که، حیات تنها در قالب فراساختار سلولی پیچیده وجود دارد که امکان می‌دهد تعداد زیادی از اجزاءسازنده، تعداد زیادی از آنزیم‌ها را به‌صورتی جدا از هم در دست داشته باشیم که در عین حال که همه لازمند اما نمی‌توانند با حضور یکدیگر حفظ شده یا عمل نمایند. می‌توان گفت که هر مرحله از سوخت‌وساز گذرهای مواد از یک بخش به بخش دیگر سلول است، که آن نیز مشروط به پدیده‌های تراوایی درون سلولی است که تقریباً از آن شناختی نداریم.

گرچه کارهای انجام شده بر روی پدیده‌های تراوایی بسیار زیادند، اما متأسفانه هنوز اطلاعات خوبی در این مورد نداریم.

تنها بررسی تبادلات بین سلول با محیط خارج برایمان قابل دسترسی هستند، بدین منظور، روش‌های بسیار متنوعی مورد استفاده بوده‌اند: این روش‌ها بر روی اشکال سلولی مختلفی اعمال شده و به‌طور نادرستی سعی به تعمیم نتایج حاصل بوده است.

یک ریشه اشتباه می‌تواند اشتباه بین تراوایی به مفهوم واقعی و جذب[3] باشد. اگر دو ماده که به یک میزان سهولت نفوذ از محیط خارج به سلول دارند را در نظر بگیریم و تصور کنیم که ماده اول ضمن سوخت‌وساز مورد استفاده است در حالی که دومی در این جریان مورد استفاده‌ای ندارد، روشن است که پس از مدتی مقادیری از این مواد که به سلول نفوذ کرده‌اند بسیار متفاوتند: در مورد ماده‌ای که تغییر و تبدیلی پیدا نمی‌کند، توازنی بین محیط خارج و سلول برقرار شده و نفوذ متوقف می‌شود؛ برعکس، برای ماده‌ای که مورد استفاده قرار می‌گیرد حالت توازن هرگز حاصل نشده و کندی یا توقفی در نفوذ آن دیده نمی‌شود.

بالاخره تنها زمان تجربیات امکان می‌دهد این دو پدیده را از هم مشخص کنیم: تنها تجربیات کوتاه مدت را می‌توان مربوط به پدیده‌های تراوایی در نظر گرفت تجربیات دیگر منحصراً مربوط به جذب خواهند بود.

1- Microvilli 2- Cell Junctions 3- abosorption

ریشه دوم اشتباه آن است که در مورد مشخص کردن انواع مختلف تراوایی اهمال شود. به‌عنوان مثال، مطالعات زیادی بر روی سلول گیاهی بالغ، که واکوئل آن رشد زیادی دارد. انجام شده است، مقدار موادی که از محیط خارج به واکوئل نفوذ می‌کنند نیز مشخص شده‌اند. این نتایج را نمی‌توان به‌عنوان تراوایی سلول تفسیر کرد. اغلب موادی که در واکوئل جمع می‌شوند از مواد اضافی ماده زنده‌اند این پدیده با آنچه که آن را نفوذ معکوس[1] نامند مطابقت می‌کند. برعکس، مطالعه حیاتی که معنای خیلی عام‌تری دارد با نفوذ بدرون یعنی گذر از محیط خارج به پرتوپلاسم در ارتباط است. هنوز بایستی گروه سومی از پدیده‌های تراوایی یعنی L,ex – Permiaction که به مفهوم گذر از پرتوپلاسم به محیط خارجی است را در نظر گرفت.

به حسب این که ورود یک ترکیب به سلول یا خروج آن از سلول موردنظر باشد «تراوایی» سلول متفاوت خواهد بود.

مطلب آخر مربوط به بررسی‌هایی راجع به تغییرات تراوایی تحت تأثیر عوامل مختلف است. بایستی در نظر داشت که از تراوایی سلول به‌طور عام بحث نمی‌شود بلکه تراوایی برای این یا آن محلول خاص در نظر است؛ شکل نفوذ مواد به سلول به حسب مواد موردنظر تغییر می‌کند و تمام تغییر و تبدیل‌های پوشش خارجی سلول الزاماً به شکل‌های مختلف بر روی نفوذ هر گروه از مواد نفوذکننده بازتاب خواهد داشت.

II.بررسی انتقادی روش‌های مطالعه تراوایی

مطالعات بر روی تراوایی سلول به کمک روش‌های بسیار مختلفی انجام شده و به دلیل آنچه بیان شد، به منظور مشخص کردن مفهوم و حدود نتایجی که هر یک به‌دست می‌دهند لازم است به بررسی آنها بپردازیم.

بدین منظور ما این روش‌ها را در سه گروه رده‌بندی کرده و روش‌های مستقیم، روش‌های غیرمستقیم و روش‌های فیزیولوژکی خاص را مشخص می‌سازیم.

روش‌های مستقیم

روش‌های بررسی مستقیم آنهایی هستند که بر پایه تعقیب ماده‌ای که به سلول نفوذ کرده خواه با مشاهده آن در درون سلول، یا با اندازه‌گیری آن در یک نمونه برداریِ قابل پذیرش استوارند.

روش‌های مشاهده میکروسکوپی

در حال حاضر یک روش انتخابی وجود دارد که هنوز به منظور بررسی تراوایی کمتر مورد استفاده بوده است، این روش اتوهیستورادیوگرافی است. ترکیبی که بررسی نفوذ آن موردنظر است به وسیلهٔ یک عنصر رادیو اکتیو (ترجیحاً تریسیوم برای مواد آلی) نشاندار می‌شود، به این ترتیب این ماده در هر کجای سلول که تثبیت شود قابل ردیابی است، این روش به‌صورت عامی قابل اجرا است و گرچه در برخی شرایط، محاسبه تقریبی مقدار ماده نفوذ کرده را امکان‌پذیر می‌سازد اما روش کمّی (مقداری) دقیقی نیست.

از سوی دیگر از مدت‌ها قبل نفوذ مواد رنگی یا موادی که موجب واکنش آشکارکننده‌ای باشند به سلول پیگیری شده‌اند. به‌عنوان مثال تحت تأثیر ماده‌ای که نفوذ می‌کند می‌توان دور رنگیزه‌های سلولی یا مواد رنگ‌کننده‌ای که از پیش به سلول وارد شده‌اند را تحریک کرد (دو وری، هاروی، و دیگران)؛ همچنین می‌توان نفوذ آلکالوئیدها یا ترکیبات حاصل از رسوب تانن‌های واکوئلی (اورتُن[2]، دیسون[3]) یا نفوذ کلسیم را از طریق تشکیل بلورهای اکسالات

1- Reverse Permeability 2- Overton 3- Deysson

کلسیم (استرهوت[1]) بررسی کرد. تمام این روش‌ها تنها در مورد برخی از ترکیبات عملی‌اند؛ با آن که اطمینان زیادی در مورد آنها وجود دارد اما متأسفانه روش‌های کمّی (مقداری) نیستند و اغلب مربوط به نفوذ معکوس می‌شوند؛ در عین حال می‌توان تغییرات تراوایی در شرایط مختلف را با تعیین زمان لازم برای ظهور آستانه واکنش در هر یک از حالات، در شرایط ثابت شده با یکدیگر مقایسه کرد.

روش‌های اندازه‌گیری بعد از استخراج

روشی که برای بررسی‌های تراوایی اغلب به‌عنوان روش مرجع ذکر می‌شود بر پایهٔ تجزیه شیمیایی کمّی شیره واکوئلی در سلول‌های گیاهی استوار است؛ این روش عملاً جز در مورد برخی نمونه‌ها عملی نیست. تحقیقات کولاندر[2] و برلوند[3]، که بر روی کاراها صورت گرفته‌اند، به‌خصوص به دلیل گستردگیشان قابل توجهند.

این پژوهشگران بالاخره، نفوذ تعداد زیادی از مواد معدنی یا آلی را بررسی کرده‌اند. بایستی در نظر داشت که در مورد مواد آلی تنها از دو روش اندازه‌گیری استفاده کرده‌اند (اندازه‌گیری مقدار بسیار کم[4] ازت بعد از معدنی شدن و اندازه‌گیری مقدار بسیار کم قدرت احیاکنندگی) که متأسفانه هیچگونه حالت اختصاصی ندارند؛ نتایج به‌دست آمده تنها وقتی قابل قبول‌اند که مادهٔ نفوذکننده بر متابولیسم، هیچگونه اثری که بتواند مقدار ازت و قدرت احیاکنندگی را تغییر دهد، نداشته باشد این حالتی است که عمومیت ندارد و به هر حال وسیله‌ای برای بررسی‌های اصولی نمی‌باشد. از سوی دیگر این روش در بررسی‌های مربوط به تراوایی ارزش مرجع که بسیاری از پژوهشگران به آن داده‌اند را ندارد چه تنها مربوط به تراوایی معکوس می‌شود و نه مربوط به نفوذ در ماده زنده به مفهوم واقعی خود.

روش دیگر بر انجام اندازه‌گیری‌هایی بر روی شیره (عصاره) بافتی که به وسیلهٔ افشردن یا خشکانیدن به‌دست آمده استوار است؛ اشکال این روش در این است که آنچه را که واقعاً به سلول نفوذ کرده از آنچه در نتیجه آغشته شدن غشاها یا در نتیجه عمل جذب گرفته شده است، مشخص نمی‌سازد؛ این روش بیشتر بر بنای جذب عمل می‌کند تا تراوایی؛ زیرا برای به‌دست آوردن مقادیر کافی از مواد قابل اندازه‌گیری، تجربیات نبایستی خیلی کوتاه مدت باشند. در عین حال این روش می‌تواند برای بررسی تغییرات تراوایی موادی که نسبت به سوخت‌وساز معمولی بیگانه‌اند به راحتی مورد استفاده قرار گیرد مشروط بر آن که روش اندازه‌گیری انتخاب شده به اندازه کافی حالت اختصاصی داشته باشد (مثال: بررسی تغییرات نفوذ آنتی‌پیرین در جوانه‌های نخود تحت تأثیرات مختلف دیسون[5]).

بالاخره می‌توان بر روی یک هموژنای سلولی، یک اولتراسانتریفوگاسیون افتراقی انجام داد و ترکیب نفوذ کرده را در بخش‌های (فراکسیون‌های) مختلف اندازه‌گیری کرد؛ این روش که به‌خصوص در مورد مواد بیگانه از متابولیسم قابل استفاده است مشروط به این که ترکیبات تحت بررسی به خوبی تثبیت شده باشند برای رسیدن به نتایج زیاد و مهمی موفقیت‌آمیز است.

روش‌های غیرمستقیم

روش‌های غیرمستقیم روش‌هایی هستند که در آنها کوشش می‌شود مقدار ماده نفوذ کرده به سلول را از راه بررسی پدیده دیگری که به تراوایی مربوط می‌شود نتیجه‌گیری کنند. به‌طور معمول دو گروه از روش‌ها یعنی: روش‌های مبتنی‌بر پلاسمولیز سلولی و روش‌های مبتنی‌بر تغییرات خصوصیات محیط خارجی در جریان تجربه مورد استفاده بوده‌اند.

روش‌های مبتنی بر پلاسمولیز

گرچه نتایج حاصل از روش‌های مبتنی‌بر پلاسمولیز اغلب تفاسیر نادرستی بوده‌اند معهذا به وسیلهٔ برخی از

1- Osterhout 2- Collander 3- Baerlund 4- Microdosage 5- DEYSSON

پژوهشگران بسیار مورد استفاده بوده و هستند.

به‌طوری که بعداً نیز بررسی خواهیم کرد روشن است که سلول‌های غوطه‌ور در یک محیط دارای فشار اسمزی قوی، متحمّل پلاسمولیزی می‌شوند که به‌طور معمول و کم‌وبیش به سرعت، سیر بازگشتی دارد. در تشابه با آنچه که در اسمومتر دوتروشه[1] می‌گذرد این بازگشت را به نفوذ مواد محلول موجود در محیط خارج به سلول‌ها نسبت می‌دهند. به نظر می‌رسد که با بررسی کمّی این پدیده‌ها می‌توان اندازه‌ای از نفوذپذیری سلول‌ها نسبت به مواد مختلف را نتیجه‌گیری کرد.

این مطالعات به‌خصوص بر روی سلول‌های گیاهی که دارای واکوئل مرکزی بزرگی هستند انجام شده و بدین منظور روش‌های مختلفی ابداع شده‌اند.

لیپچکین[2]، تروندل[3] (۱۹۱۰) روش باصطلاح غلظت‌های پلاسمولیزکننده - آستانه‌ای[4] را که بر پایه استدلال زیر استوارند به کار گرفته‌اند: اگر برای دو ماده‌ای که سلول نسبت به آنها تراوا است غلظتی که موجب آغاز پلاسمولیز می‌گردد را مشخص کنیم، نتیجه می‌گیریم که این دو محلول هم غلظت‌اند. برعکس چنانچه یکی از دو ماده نفوذ کند غلظت پلاسمولیز - آستانه‌ای آن به نسبت مادهٔ دیگر که تراوایی پروتوپلاسم در برابر آن زیاد است خیلی بیشتر خواهد بود.

فیتینگ[5] (۱۹۱۷) این روش را مورد انتقاد قرار داده و تخمین آستانه پلاسمولیز را به‌صورت زیر ترجیح می‌دهد: او بر روی یک گروه از سلول‌ها عمل کرده و از غلظت‌هایی استفاده می‌کند که تنها تعدادی از سلول‌ها در آن پلاسمولیز شده باشند، ثابت می‌شود که در فواصل زمانی منظم به موزات نفوذ ماده پلاسمولیزکننده به سلول تعداد سلول‌های پلاسمولیز شده کاهش می‌یابد.

روش هوفلر[6] (۱۹۱۸) امکان عمل بر روی یک سلول منفک را فراهم می‌آورد: این روش بر پایه استفاده از محلول‌های بسیار غلیظ و مشخص کردن نسبت موجود بین حجم بخش جمع شده پروتوپلاسم و حجم کل سلول استوار است. بالاخره عاملین دیگری نه تنها بر استفاده از پلاسمولیز و دپلاسمولیز، بلکه به پدیده‌ای نزدیک به آن، یعنی تغییر تورژسانس سلولی فکر کرده‌اند: به‌عنوان مثال می‌توان، میزان تغییر و تبدیلات خمیدگی ساقه‌گل داودی وقتی در محلول‌های غلیظ غوطه‌ور شود (دو وری)، بررسی میزان خمیدگی نشان دهنده میزان تورم زبانه‌های قطع شده در برگ‌های پیاز[7] (بوی‌ین)، تغییر و تبدیل‌های تورم انتهای ریشه باقلا[8] که در محلول غلیظ یا محلولی رقیق قرار گرفته (لاندگارد[9]) را نام برد.

لازم است خاطرنشان سازیم که تمام این روش‌های سنجش پلاسمولیزی بر یک اصل مسلم پی‌ریزی شده‌اند: تنها تغییر و تبدیلی که در جریان تجربه پیش می‌آید نفوذ ماده موردنظر است در حالی که معمولاً دلیلی بر این اصل مسلم آورده نشده است؛ علاوه بر این نشان داده شده که سلول از راه پدیده‌های آناتونوز[10] Anatonose می‌تواند فشار اسمزی خود را بیافزاید و این پدیده‌ها ممکن است در شرایطی که تجربیات پلاسمولیز برقرار می‌شوند نیز صورت گیرند. همچنین به خوبی مشخص شده که در جریان تجربه امکان خروج (نفوذ به خارج) برای برخی از مواد وجود دارد و این خود دلیلی برای ایجاد خطاست.

روش‌های مبتنی بر تجزیه محیط خارجی

گرچه اندازه‌گیری مقدار ماده‌ای که به سلول‌ها نفوذ کرده غالباً دشوار است، سنجش بخش‌هایی از محیط

1- Dutrochet 2- Lepechkin 3- Troendle 4- Concentrations plasmolytequey - yeuily
5- Fitting 6- Hoefler 7- Allium Cepa 8- Vicia faba 9- Lundegardh

۱۰- از کلمه یونانی ana به معنی افزایش شماره مولکولی موجود به دنبال ئیدرولیزها.

خارجی که وارد سلول شده‌اند خیلی سهل‌تر به نظر می‌رسد به این ترتیب ممکن است برخی مشکلات روش را از میان برداشت و می‌توان پدیده را در طول زمان با نمونه برداری‌های تکراری در طول تجربه پی‌گیری کرد. متأسفانه مقدار ماده‌ای که نفوذ کرده است نسبت به مقدار اولیه موجود از آن و میزان دقت روش‌ها معمولاً بسیار ناچیز است، اگر به منظور افزایش این مقدار آزمایش طولانی شود، مطالعه مربوط به جذب خواهد بود و نه تراوایی.

به منظور افزایش حساسیت روش، پژوهشگران مختلفی، به جای سنجش‌های شیمیایی مبنا را بر تشخیص‌های فیزیکی مثل: تغییرات PH، تغییرات قابلیت هدایت و مانند آن قرار داده‌اند. به‌عنوان مثال در روش اُسترهوت، بافت مورد مطالعه بین دو الکترود قرار گرفته و قابلیت هدایت آن متناوباً مشخص می‌گردد. این روش‌های مختلف حالت اختصاصی ندارند و به‌طور کلی، انتقادات روش‌های سنجش پلاسمولیزی در موردشان صادق است.

روش‌های فیزیولوژیکی خاص

این روش‌های غیرمستقیم را به ترتیبی جزء روش‌هایی قرار می‌دهیم که در آنها ماده نفوذکننده با تأثیری که بر روی طرز عمل سلولی دارد مشخص می‌گردد. این روش‌ها به‌خصوص برای بررسی تغییرات تراوایی نسبت به مواد مختلف در رابطه با عمل شرایط مختلف محیط منظور شده‌اند.

به‌عنوان مثال برای نتیجه‌گیری سرعت نفوذ یک ماده سمی خاص، از زمان لازم برای بروز اثر سمّی آن ماده بر روی یک موجود جانوری استفاده شده است (لوب[1]، ۱۹۱۶، گلهورن[2]، ۱۹۲۸).

همچنین می‌توان از خواص مختل‌کنندگی تقسیم هسته[3] یا به صورتی عام ضدتقسیمی[4] مواد مختلف برای بررسی نفوذشان استفاده کرد (دیسون[5]، ۱۹۴۳). با استفاده از یک ماده مختل‌کننده تقسیم هسته در شرایطی که تنها با شدت کمی عمل کند، می‌توان کمترین تغییر در نفوذ این ماده را با ارزیابی شدت اختلالات میتوزی که به وجود می‌آورد روشن ساخت.

این روش‌ها جز در حالاتی خاص عملی نیستند و حصول اطمینان از اختصاصی بودن آنها ضروری است. روش مبتنی بر فعالیت ضد میتوزی که برای مواد متعددی قابل اجرا است، به دلیل حفظ «سلامت کامل» سلول که در مورد آن هیچ روش دیگری را نمی‌شناسیم برتری دارد. بالاخره معمولاً به‌طور ساده‌ای مشخص شده که سلول‌ها در جریان تجربه کشته نشده‌اند. بالعکس در روش مربوط به فعالیت ضدمیتوزی، نفوذ مواد تنها تا وقتی که سلول‌ها به تقسیم خود ادامه می‌دهند قابل تشخیص است؛ پس اولین نشانه‌های مسمومیت سلولی دقیقاً توقف فعالیت میتوزی است: به این ترتیب اطمینان داریم که با نفی سایر تغییرات و تبدیلات، تنها تغییر و تبدیل‌های فیزیولوژیکی تراوایی خواه تغییرات قابل برگشت یا برگشت‌ناپذیر مورد مطالعه بوده‌اند.

III.نتایج مقدماتی

دیدیم که به منظور مطالعهٔ تراوایی سلولی روش‌های متعددی مورد استفاده بوده‌اند که دربارهٔ مسئله اساسی یعنی آگاهی به نفوذ مواد در ماده زنده، اطلاعات قابل اطمینان کمی را به‌دست می‌دهند. اگر روش‌های مربوط به مطالعه دیاپرمه‌آسیون را استثناء کنیم و روش‌های غیرمستقیم را به دلیل حالت اختصاصی که در برقراری نتایج دارند مورد دقت قرار دهیم به این نتیجه می‌رسیم که در واقع اطلاعاتمان بسیار اندک‌اند، بهترین روش‌ها (نظیر روش اتوهیستوگرافی) هنوز جز به صورتی بسیار محدود مورد استفاده نیستند.

به‌طور متداول برخی از اطلاعات راجع به تراوایی سلولی پذیرفته شده‌اند؛ ما به بررسی این اطلاعات در این

1- Loeb 2- Gellhorn 3- Mitoclasiques 4- Antimitotiques 5- Deysson

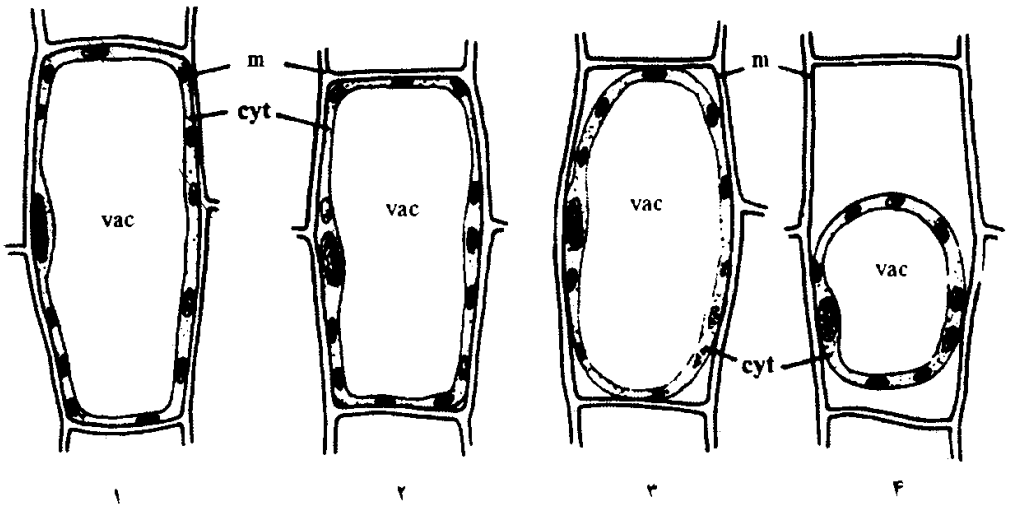
بحث می‌پردازیم، اما از قبل تصریح می‌کنیم که یقین داریم بسیاری از این اطلاعات بایستی در سال‌های آینده تغییرات کم‌وبیش اساسی پیدا کنند.

تراوایی نسبت به آب

تمام انواع سلولی نسبت به آب که نقش عمده‌ای را در فیزیولوژی سلول بازی می‌کند به سهولت تراوا هستند. به دلیل همین اختلاف تراوایی که از یک سو در مورد آب و از سوی دیگر در مورد مواد محلول وجود دارد توانسته‌اند سلول را به یک اسمومتر تشبیه کنند.

تبادلات آب بین سلول و محیط خارج از ۱۸۹۰ به وسیلهٔ دو وری در سلول‌های گیاهی و از ۱۹۰۰ به وسیلهٔ همبورگر در گویچه‌های سرخ مطالعه شده‌اند.

دو وری، با مشاهده یک سلول گیاهی دارای واکوئلی بزرگ در یک محلول بسیار رقیق نمکی (مثلاً KNO_3 با غلظت ۰/۲۵٪) نشان می‌دهد که سیتوپلاسم سلول در مقابل دیواره اسکلتی قرار گرفته و سلول سختی و استحکامی پیدا می‌کند که نتیجه فشار اسمزی متقابلی است که محتوای سلول و دیواره اسکلتی آن بر یکدیگر وارد می‌کنند: گویند سلول به حال تورژسانس است. (شکل ۶-۲۲).



شکل ۶-۲۲. طرح یک تجربهٔ پلاسمولیز. ۱) سلول به حال تورژسانس قبل از تجربه. ۲) سلول غوطه‌ور شده در یک محلول هم غلظت (ایزوتونیک) از نیترات پتاسیم: پلاسمولیزی در کار نیست. ۳) سلول غوطه‌ور شده در محلولی از نیترات پتاسیم ۶٪ شروع پلاسمولیز. ۴) سلول غوطه‌ور شده در محلولی از نیترات پتاسیم ۱۰٪ پلاسمولیز کامل (V_{ac} = واکوئل؛ m = دیوارهٔ پکتوسلولزی؛ cyt = سیتوپلاسم).

برعکس چنانچه همین سلول در محلول نمکی خیلی غلیظ‌تری (مثلاً KNO_3 با غلظت ۲/۵٪) قرار گیرد، سیتوپلاسم دیوارهٔ اسکلتی را ترک کرده و جمع می‌شود و این در حالیست که از حجم و اکوئل کم می‌گردد: این پدیده پلاسمولیز است که در نهایت سلول‌ها را به سوی مرگ می‌برد[1]؛ این پدیده با از دست دادن آبی که از سلول گذشته و به محیط خارج می‌رسد مشخص می‌گردد.

در شرایط طبیعی، تغییرات تورژسانس دایمی‌اند، و به این ترتیب نفوذ به داخل و نفوذ به خارج آن را روشن می‌سازند.

نفوذپذیری نسبت به مواد قابل تبدیل به یون‌ها

مواد یونی شونده زیادی به وسیلهٔ سلول جذب می‌شوند. حقیقت این جذب موجب شده که نیازهای تغذیه

1- Fanaison

معدنی جانوران و بهتر از آنها نیازهای تغذیه معدنی گیاهان را بدانیم. از طرف دیگر تصور تجربیات متعددی که بتوانند سلول‌شناسیِ چنین تراوایی را مشخص کنند، آسان است اتوهیستورادیوگرافی با عناصر کانی رادیواکتیو، تشخیص نفوذ کلسیم در برخی سلول‌ها از راه تشکیل بلورهای اکسالات کلسیم، تفسیر روش‌های متعدد غیرمستقیم (مثل دِپلاسمولیز، تغییرات قابلیت هدایت و مانند آن). چهار نکته در این بررسی قابل ملاحظه‌اند:

۱- نفوذپذیری انتخابی‌است، یعنی سرعت نفوذ برای مواد مختلف موجود در محلول یکسان نیست. عمدتاً با وجود اختلافاتی که به حسب نوع سلول‌ها وجود دارد، نیترات‌ها سریع‌تر از کلرورها و کلرورها سریع‌تر از سولفات‌ها یا فسفات‌ها نفوذ می‌کنند؛ نمک‌های آمونیوم سریع‌تر از املاح پتاسیم و سدیم و این املاح سریع‌تر از نمک‌های منیزیم و کلسیم نفوذ می‌کنند.

۲- به‌طوری که تجربیات مختلفی که برخی از آنها قدیمی‌اند (مثل تجربیات مولیارد بر روی تغذیه کفک سیاه)، نشان می‌دهند: این یون‌ها هستند که جذب می‌شوند نه مولکول‌ها. اگر آنیون سریع‌تر نفوذ کند، نتیجه‌اش افزایش بار مثبت دز محیط است، که با نفوذ یون‌های H^+ به سلول یا نفوذ آنیون‌های HCO_3^- از سلول به خارج جبران نمی‌شود و محیط بیش از پیش قلیایی می‌گردد. برعکس، چنانچه کاتیون سریع‌تر از آنیون نفوذ کند، یون‌های OH^- آب با آن نفوذ می‌کنند یا یون‌های H^+ (حاصل از تفکیک H_2CO_3) دفع می‌شوند و محیط به طرف اسیدی شدن می‌رود.

۳- نمک‌های مختلف بر روی نفوذ یکدیگر عمل متقابل ایجاد می‌کنند[1]. این مطلب را تجربه زیر که به وسیلهٔ استرهوت صورت گرفته تأییده شده است، سلول‌های اسپیروژیر در محلولی از کلرورسدیم ۰/۳۸ مولکول گرم در لیتر یا در محلولی از کلرورکلسیم ۰/۲۰ مولکول گرم در لیتر پلاسمولیز شده‌اند؛ این پلاسمولیز در محلول کلرورسدیم ۰/۳۷۵ مولکول گرم در لیتر با کلرورکلسیم ۰/۱۹۵ مولکول گرم در لیتر (که محلول‌هایی کمی رقیق‌ترند) صورت نمی‌گیرد؛ در حالی که در مخلوطی از این دو محلول آخر با نسبت ۱۰ حجم کلرورسدیم بازای یک حجم کلرورکلسیم، پلاسمولیز سریعی صورت می‌گیرد: این حالت به این دلیل است که یون‌کلسیم تراوایی سلول‌ها به یون‌سدیم را کاهش داده است.

در این حالت نیز با کاربرد اتم‌های نشاندار می‌توان پدیده‌ها را به‌صورت مستقیم‌تری مشخص کرد. به‌عنوان مثال اگر به سلول‌ها فسفر و آهن رادیواکتیو بدهیم مشخص می‌شود که چنانچه در محیط فسفر نباشد، آهن بیشتری جذب می‌کنند و چنانچه مقدار آهن کم باشد فسفر بیشتری را جذب خواهند کرد (بیدولف[2]، ۱۹۵۲).

۴- نتیجه این اعمال متقابل این است که بقای زندگی مستلزم محیط‌های موزانه شده است: نه تنها بایستی به سلول‌ها یون‌های ضروریشان را داد بلکه این یون‌ها باید به نسبت‌های مناسب در اختیار سلول‌ها قرار گیرند.

این الزام به روشنی در تجربه زیر به وسیلهٔ استرهوت بر روی رولفیاماری‌تیما[3] که یکی از بازدانگان نادر زنده در آب دریاست، مشخص شده است. استرهوت سعی می‌کند این گیاه را در محلول‌های ساده‌ای از نمک‌های مختلف و با فشار اسمزیی معادل آب دریا زنده نگاهدارد اما هر بار پس از مدتی متفاوت (معمولاً پس از حدود بیست روز) گیاه می‌میرد؛ برعکس پس از آزمودن مخلوط‌های مختلف، استرهوت به زنده نگاهداشتن گیاه برای

۱- به‌عنوان کاربرد جالب این موارد می‌توان کارهای فاروماکودینامیک **Pharmacochnamuqug** رگنیر **Regnier** و شاگردانش رانام برد که تأثیر اسیدی که با الکالوئیدی تولید نمک می‌کند را بر روی نفوذ (و بنابراین فعالیت) الکالوئید مشخص کرده‌اند. خاطرنشان کنیم که از سوی دیگر نتایجی در دست است که بر بنای آنها اسیدها و بازهای ضعیف سریع‌تر از نمک هایشان نفوذ می‌کنند و اغلب چنین تفسیر می‌کنند که این ترکیبات به حالت مولکول تفکیک نشده بهتر از حالت یونی قابل نفوذاند.

2- Biddulf 3- Rulfia maritima

مدتی نامحدود دست می‌یابد.

این تجربیات را می‌توان با تجربیات رینگر[1] که به خوبی‌شناخته شده‌اند هم جهت دانست. تجربیات رینگر مبنای تهیه محلول نمکی هستند که از تزریق آرام و مداوم آن امکان انقباضات قلب قورباغه را فراهم می‌آورد. تجربیات مختلفی از این قبیل منجر به تهیه تجربی‌نمونه‌هایی از مایعات فیزیولوژی به حال توازن شده‌اند[2].

نفوذپذیری نسبت به غیرالکترولیت‌ها

اساس آگاهی‌هایمان در این مورد از نتایجی است که به وسیلهٔ مکتب کولّاندر با تجزیه شیره واکوئلی کارا و بررسی‌های متعددی که با روش‌های پلاسمومتری صورت گرفته‌اند، حاصل شده‌اند.

پذیرفته شده که موادی بهتر نفوذ می‌کنند که وزن مولکولیشان کمتر باشد اما استثنائات بسیار زیادی از این قاعده شناخته شده است، مثلاً:

- در ردیف الکل‌ها، درست است که الکل‌های بالاتر با سرعت کمتری از الکل‌های ساده‌تر نفوذ می‌کنند اما در عین حال الکل اتیلیک سریعتر از الکل متیلیک نفوذ می‌کند؛
- در ردیف قندهای ساده، درست است که به‌عنوان مثال گلوکز سریع‌تر از ساکارز نفوذ می‌کند، اما مانیتول، که وزن مولکولی اش به‌طور محسوسی همان وزن مولکولی گلوکز است، خیلی به سختی نفوذ می‌کند؛
- در ردیف اوره و مشتقاتش (متیل، اتیل، دی‌اتیل،تری‌اتیل) ترتیبِ سرعتِ قابلیتِ نفوذ دقیقاً برعکس اندازه مولکول‌هاست.

برخی از این عدم توافق‌ها به وسیلهٔ اختلاف قابلیت انحلال در چربی‌ها توصیف می‌شود: موادی که قابلیت انحلال بیشتری در چربی‌ها را دارند سریع‌تر نفوذ می‌کند (در عین حال، ماده‌ای که سریع‌تر نفوذ می‌کند آب است!). به نظر تروب[3]، شایسته است که، فعالیت - کششی مولکول‌ها را به حساب آورد زیرا هر چه جسمی فعالیت - کششی بیشتری داشته باشد، بیشتر در بین سطوح متراکم شده و بنابراین نفوذش تسهیل می‌گردد.

تأکید بر نارسایی تمام این قواعد بی‌فایده است: هر یک از این قواعد تنها در مورد ردیف شیمیایی خاصی درست است.

از سوی دیگر، به خلاف آنچه برای مدتی طولانی تصور می‌شده، مولکول‌های درشت و حتی ماکرومولکول‌ها می‌توانند به سلول‌ها نفوذ کنند؛ هم‌اکنون شواهد زیادی از این موارد در دست است.

تراوایی به گازها

همان‌طور که ماده زنده نسبت به آب و ترکیبات مختلف به حالت محلول، تراوا است، نسبت به گازها هم تراوا می‌باشد. آنچه را که درمورد نقش اکسیژن و گاز کربنیک در فیزیولوژی می‌دانیم این خصوصیت را ایجاب می‌کند.

در عین حال گازها تنها به حالت حل شده به سلول نفوذ می‌کنند؛ غشاهای کوتینی شده که خیس نمی‌شوند، نسبت به گازها ناتراوا هستند. نتیجه این است که گازهایی که بیشتر در آب حل شوند بهتر نفوذ خواهند کرد؛ به‌عنوان مثال، گازکربنیک سریع‌تر از اکسیژن نفوذ می‌کند.

تغییرات تراوایی

عوامل زیادی ممکن است موجب تغییر تراوایی شوند اما در این مورد نیز دو نکته الزامی‌اند:

۱- در بیشتر موارد این توان جذب است که تغییر می‌کند و نه تراوایی به مفهوم واقعی.

1- Ringer

۲- به منظور تشابه با اصطلاح انگلیسی، گاهی از محلول‌های «تراز شده balancey» صحبت می‌شود.

3- Traub

۲- بایستی از تعمیم بیش از حد خودداری کرد و همواره در نظر داشت که نتایج به‌دست آمده تنها برای نوع ترکیب مورد مطالعه قابل قبولند.

با این دید، نتایج زیر غالباً پذیرفته شده‌اند:

تغییرات با عمل عوامل خارجی

به نظر می‌رسد که نوری با شدت متوسط موجب افزایش تراوایی یا به عبارت بهتر موجب افزایش توان جذب می‌گردد. در محدوده‌های فیزیولوژیک، شدت تراوایی با درجه حرارت افزایش می‌یابد. (Q_{10} معمولاً حدود ۲ می‌باشد).ترکیب محیط خارجی تأثیر زیادی بر تراوایی دارد؛ مثالی در این مورد را با بررسی اعمال رقابتی یون‌ها دیده‌ایم.

تغییرات با عمل عوامل داخلی

سلول‌های جوان معمولاً تراوایی بیشتری از سلول‌های بالغ دارند؛ سلول‌هایی که دارای زندگی خفیفی هستند تراوایی کمتری دارند. در جریان دورهٔ قبل از مرگ تراوایی افزایش می‌یابد و پس از مرگ خیلی زیاد شده و مواد می‌توانند به روش انتشار ساده به سلول وارد یا از سلول خارج شوند.

اغلب پذیرفته شده که بی‌حسی با کاهش تراوایی سلول همراه است برعکس با تأثیر غلظت‌های بیشتری از مواد بی‌حسی‌کننده (تأثیر سمی تراوایی افزایش می‌یابد). اما تجربیات زیادی افزایش تراوایی را مثلاً تحت تأثیر اتر یا کلروفرم نشان می‌دهند که بدون اثر سمی و بدون وجود مرحله کاهش قبلی صورت می‌گیرد: در این مورد، افزایش بدون تردیدِ تراوایی نسبت به کولشی‌سین، کافئین، آنتی‌پرین را می‌توان خاطرنشان ساخت و این افزایش در شرایطی صورت می‌گیرد که این مواد زندگی سلول را چندان به خرابی نمی‌کشند.

از سوی دیگر مشاهداتی وجود دارند که وابستگی‌های تنگاتنگی بین تراوایی سلولی و تنفس را نشان می‌دهند: وقتی فشار اکسیژن به پایین‌تر از ۲۰ درصد تنزّل یابد هر دو پدیده به موازات هم کاهش می‌یابند؛ در حالات پرشماری با حضور باز دارنده‌های تنفسی مثل سیانور پتاسیم یا اسیدمونو- یُداستیک نفوذ متوقف می‌شود.

این مشاهدات عدم کفایت توضیحات معمول درباره نفوذ بر مبنای پدیده‌های ساده فیزیکو- شیمیایی را نشان می‌دهد؛ این تعاریف منشأ نظریه‌های جذب فعالند.

IV.تجربیات به منظور توضیح فیزیکو - شیمیایی

از مدت‌ها قبل سعی بر این بوده است که پدیده‌های نفوذپذیری سلولی را از طریق پدیده‌های ساده فیزیکی بیان کنند. جابه‌جایی آب به منظور برقراری تعادل اسمزی خواهد بود. جابه‌جایی مولکول‌های حل شده یا نتیجه عمل تصفیه یعنی کشیده شدن مکانیکی مولکول‌ها به همراه انتشار آبی است که از غشاء می‌گذرد و یا یک عمل انتشار یعنی عبور مولکول‌ها به وسیلهٔ حرکات خاص خودشان از خلال آبی است که غشاء را آغشته می‌کند. در هر دو حال، ساختمان این غشاء سدی در مقابل نفوذ خواهد بود به‌طوری که نحوهٔ عمل آن به حسب ماهیت ترکیبات موردنظر تغییر می‌کند.

با شروع این اطلاعات ما اجمالاً مطالعات عمدهٔ فیزیکو - شیمیایی انجام شده و نظریه‌های عمدهٔ موجود را بررسی می‌کنیم و آنها را بر این مبنا که به شرح دلایل نفوذ بپردازند یا مانع نفوذ را بیان کنند به دو گروه تقسیم می‌کنیم:

دلایل نفوذ

۱- انتشار آزاد: اجسام به حالت حل شده مایلند تمام حجم حلال خود را به‌طور یکنواختی اشغال کنند. اگر ظرفی به شکل U که دو شاخه آن در پایین به وسیلهٔ بخش رابط وسیعی به‌هم مربوطند انتخاب کرده و در شاخه اول آن

آب مقطر و در شاخه دوم محلول کلرورسدیم بریزیم، خیلی به سرعت واکنش با نیترات نقره وجود کلرورسدیم را در هر دو شاخه لوله نشان می‌دهد و بزودی کلرورسدیم غلظت یکنواختی پیدا می‌کند بنابراین NaCl منتشر شده است.

انتشار پدیده‌ای عمومی است و بر همه اجسام و همه حلال‌ها مجری است. هر چه غلظت ماده منتشر شونده بیشتر بوده وزن مولکولی آن کمتر و چسبندگی محیط نیز کمتر باشد انتشار سریع‌تر است.

انتشار یک پدیدهٔ فیزیکی است و جهت حرکت و جابه‌جایی مواد ضمن انتشار از محیط پر غلظت به طرف محیط کم غلظت است.

توده‌های مولکولی در اثر حرارت به‌صورت تصادفی[1] جابه‌جا می‌شوند، آب و مولکول‌های غیرقطبی با پخش ساده[2] انتشار می‌یابند. انتشار به نوع مولکول بستگی دارد مثلاً سرعت حرکت مولکول آب به‌طور متوسط ۱۵۰۰ میکرومتر در ساعت و سرعت حرکت یک مولکول گلوکز که ۱۰ بار سنگین‌تر از آب است، ۵۰۰ میکرومتر در ساعت است. برای سازگاری برخی سلول‌ها با پدیده انتشار، ویژگی‌های آنها به شکل خاصی تغییر می‌کند مثلاً سلول‌های ماهیچه‌ای طولی تا ۱۰ سانتیمتر و ضخامتی حدود ۱۰ تا ۱۰۰ میکرومتر دارند. اکسیژن در سلولی با قطر ۲۰ میکرومتر می‌تواند در مدت زمان ۰/۰۱۵ ثانیه به مرکز سلول برسد در حالی که اگر سلول را به بزرگی یک توپ بسکتبال در نظر بگیریم حدود ۲۵۶ روز وقت لازم است تا با پدیده انتشار اکسیژن به مرکز سلول برسد بنابراین بُعد مسافت و سرعت پدیدهٔ انتشار در سلول‌ها مهم است. رابطه زیر برخی عوامل مؤثر در پدیدهٔ انتشار و وابستگی آنها را نشان می‌دهد:

$$J = P.A\,(C_1 - C_2)$$

در این رابطه J، سرعت انتشار؛ P، ثابت نفوذپذیری؛ A، سطحی که انتشار از آن انجام می‌شود؛ $C_1 - C_2$، اختلاف غلظت است. از سوی دیگر: $P = \frac{KD}{t}$ است که در آن P، قابلیت نفوذ یا انتشار؛ K ضریب تفکیک چربی از آب؛ D، ضریب امکان نفوذ (ثابت نفوذپذیری) و t، ضخامت پلاسمالم است.

از آنجا که پدیده فیزیکی انتشار به غلظت ماده منتشر شونده بین دو محیط وابسته است، مبادلهٔ مواد بین سلول و محیط را که بر بنای پدیده انتشار صورت گیرد، انتقال بر بنای شیب (میزان = گرادیان) غلظت نیز می‌نامند.

۲-اسمز[3]: عبور مولکول‌های آب از پرده‌های دارای تراوایی نسبی (به اصطلاح قدیمی نیمه تراوا) را اسمز گویند. عبور آب از غشاء سلولی و ورود آن به سلول یا خروجش از سلول می‌تواند به‌صورت پدیده اسمز باشد. فشار اسمزی را می‌توان از رابطه زیر به‌دست آورد:

$$P = \frac{mRT}{V}$$

P = فشار اسمزی　　m = تعداد ذرّات　　R = ضریب ثابت گازها

T = درجه حرارت مطلق　　V = حجم

فشار اسمزی مانند فشار گازها به درجه حرارت و حجم بستگی دارد. غلظت اسمزی پلاسما را تونیسیته می‌نامند. نقطه انجماد پلاسمای طبیعی انسان حدود ۰/۵۴°C است و با غلظت اسمزی ۲۹۰ میلی‌اسمول در لیتر مطابقت دارد. این عدد معادل با فشار اسمزی است که در مقابل آب خالص در حدود ۷/۳ اتمسفر ایجاد

1- Random movement　　2- Simple diffusion　　3- Osmosis

می‌شود. محلول‌هایی که دارای غلظت اسمزی شبیه پلاسما باشند را هم غلظت یا جور غلظت (ایزوتونیک[1]) و اگر غلظت اسمزی محلول نسبت به پلاسما بیشتر باشد آن را محلول پرغلظت (هیپرتونیک[2]) و اگر غلظت اسمزی محلول نسبت به پلاسما کمتر باشد آن را محلول کم غلظت (هیپونونیک[3]) نامند.

چون غلظت آب بستگی به تعداد ذرات مادهٔ حل شونده در محلول دارد بنابراین غلظت اسمزی طبق تعریف عبارتست از: یک اسمول (osmol) = یک مولار از مولکولی غیریونی. به‌عنوان مثال یک مولار از محلول گلوکز دارای غلظت یک اسمول در هر لیتر است و یک مولار از محلول نمک طعام دارای غلظت دو اسمول در هر لیتر است.

اسمزسنج دوتروشه

پدیده‌های اسمزی در ۱۸۲۶ به وسیلهٔ دوتروشه[4] گیاه‌شناس فرانسوی که اولین اسمزسنج را ساخته است مشخص شده‌اند. ظرفی که دهانه پایینی آن به وسیلهٔ پرده‌ای مسدود است و بخش فوقانی آن به لوله باریکی ختم شده از محلول ساکارز پر می‌شود؛ اگر این مجموعه را در ظرف دارای آب خالصی غوطه‌ور سازیم، مشخص می‌شود که مایع تا حدودی در لوله باریک بالا می‌رود. عبور آب خالص به طرف محلول صورت گرفته است. این نیروی جاذبه محلول برای جذب حلال خالص همان فشار اسمزی محلول است و با ارتفاع ستون مایع که در لوله اسمزسنج بالا رفته است، اندازه‌گیری می‌شود. بعد از مدتی مایع تا رسیدن به سطح اولیه خود در لوله پایین می‌آید. در این لحظه ساکارز در مایع خارجی نیز انتشار یافته و غلظت محلول در داخل و خارج اسمزسنج یکسان شده است. بنابراین در طول زمان، غشاء پوستی نسبت به ماده حل شونده تراوا بوده است.

غشاء دارای تراوای نسبی (نیمه - تراوا[5]): اسمزسنج پفّفر[6]

برای این که پدیده اسمز به شکل بارزتری مشخص گردد لازم است که غشاء، دارای تراوایی نسبی باشد یعنی تنها نسبت به حلال تراوا و نسبت به اجسام حل شده دقیقاً ناتراوا باشد. چنین غشاءهایی به وسیلهٔ رسوب مواد مختلفی مثل تانّات ژلاتین یا فروسیانور مس ساخته شده‌اند.

با استفاده از ماده اخیر، پفّفر در ۱۸۷۷، توانسته است قوانین فیزیکی اسمز را مشخص سازد. این محقق باتشکیل غشاء نیمه تراوایی از فرّوسیانور مس بر سطح یک ظرف سفالی اسمزسنجی را می‌سازد. درون این ظرف از محلول پر شده و با یک فشارسنج جیوه‌ای ارتباط می‌یابد و دستگاه در حلال خالص غوطه‌ور می‌شود (شکل ۶-۲۳).

به این ترتیب پفّفر و قایع زیر را مشخص می‌سازد:

۱- در درجه حرارت ثابت؛ فشار اسمزی یک محلول با غلظت آن متناسب است.

۲- در غلظت ثابت؛ فشار اسمزی متناسب با درجه حرارت مطلق تغییر می‌کند.

۳- در درجه حرارت و غلظت ثابت؛ فشار اسمزی با وزن مولکولی ماده حل‌شونده نسبت عکس دارد.

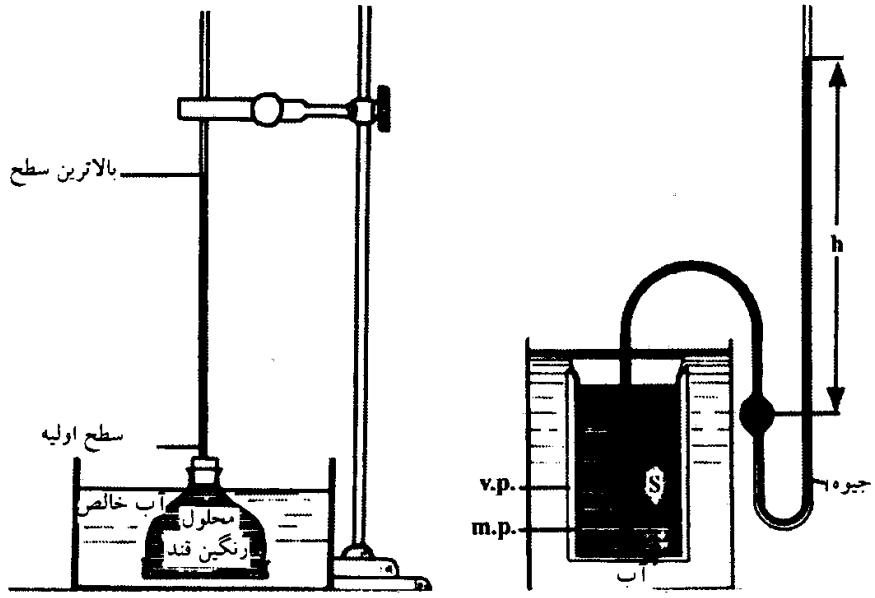
قانون وانت، هوف[7]

چند سال بعد. در سال ۱۸۸۷ وانت، هوف نشان داد که قوانین فشار اسمزی ممکن است مشابه قوانین گازهای کامل باشند. وانت، هوف با بررسی نظریه خود به وسیلهٔ نتایج عددی تجربیات پفّفر نتیجه می‌گیرد که فشار اسمزی یک محلول برابر با فشاری است که همان مقدار از جسم حل‌شونده به حالت گازی خواهد داشت. مشروط بر آن که

1- Isotonic 2- Hypertonic 3- Hypotonic 4- Doutrochet

۵- هم‌اکنون ترجیح داده می‌شود به جای اصطلاح غشاء نیمه‌تراوا، از غشاء دارای تراوایی نسبی استفاده شود. مؤلفین

6- Pfeffer 7- Van Thoff



شکل ۶-۲۳. در سمت چپ: اسمزسنج دوتروشه. در سمت راست: اسمزسنج پفّفر. (v.p = ظرف سوراخ‌دار؛ mp = غشاء ساخته شده از رسوب)

حجمی معادل حجم محلول را اشغال نماید.

در واقع توافق بین نتایج نظری و نتایج تجربی تنها در مورد محلول‌های آبکیِ رقیق است. برای محلول‌های غلیظ، همانند وضع گازهایی که تحت فشارهای زیادی قرار دارند بایستی فرمول‌های پیچیده‌تری چون فرمول وان‌دروالس[1] را دخالت داد که در آن حجم مولکول‌های حل شده و جاذبه بین مولکولی نیز منظور می‌شود.

از سوی دیگر در مورد الکترولیت‌ها، نتایج تجربی بیشتر از نتایج نظری پیش‌بینی شده‌اند. این پدیده با یونی شدن در ارتباط است و بنابراین فشار اسمزی با تعداد ذرات موجود در محلول، یعنی یون‌ها و مولکول‌های تفکیک نشده متناسب است. نتیجه آن که در محاسبه بایستی یک «ضریب هم فشاری[2]» را دخالت داد این ضریب به وسیلهٔ دو وری ارزیابی شده و با ضریب تفکیک الکترولیت موردنظر برابر است.

ماده حل شده هر چه که باشد عامل اصلی فشار اسمزی غلظت محلول خواهد بود، بنابراین شگفت‌انگیز نیست که محاسبات ترمودینامیک امکان می‌دهند تا نسبت به برخی از خصوصیات محلول‌ها که آنها نیز به غلظت مولکولی وابسته‌اند قوانین وان‌ت، هوف و قوانین رائولت را برقرار سازیم. باین ترتیب مشخص شده که دو محلولی که فشار اسمزی یکسانی دارند الزاماً نقطه انجماد و فشار بخارشان نیز یکسان است، با استفاده از این موضوع می‌توان به‌طور غیرمستقیم فشار اسمزی یک محلول را مشخص کرد.

۳- پیچیدگی اسمز: تعادل دونّان[3]

وقتی پدیده‌های اسمزی به وسیلهٔ محلول‌های آمیخته‌ای که در آنها برخی یون‌ها قابل انتشار و برخی غیرقابل انتشار باشند بررسی شوند می‌توان پدیده‌ها را با ظاهری مخالف همدیگر مشاهده کرد. با همین روش است که همان طوری که اسوالد[4] نشان داده است، اگر بخواهیم در مقابل آب مقطر، مولکولی از $R - Na$ که در آن آنیون R^- غیرقابل انتشار است را منتشر سازیم، Na^+ با وجود تحرک متداولی که دارد بی‌حرکت خواهد شد؛ اما اگر به آب مقطر نمکی مثل KCl را بیافزاییم، تغییری را موجب می‌شود: Na^+ با K^+ که یونی با همان بار است و به وسیلهٔ R^- پذیرفته می‌شود، جایگزین می‌گردد. باین ترتیب بخشی از Na^+ آزاد شده و قدرت انتشار خود را باز می‌یابد.

تعادل دونان که بر تصورات مشابهی استوار است امکان می‌دهد که حالات تجمع برخی از یون‌ها را درک کنیم.

1- Van Der Walls 2- Sefficient isotoniopue 3- Donnan equilibrum
4- Oswald

اگر در مقابل محلولی از RNa (R^- غیرقابل انتشار) محلولی از NaCl را قرار دهیم قسمتی از NaCl به محیط اول وارد می‌شود در حالی که چون R^- قابل انتشار نیست و یون‌های Na^+ نیز به وسیله میسل‌های R^- گرفته شده‌اند هیچ چیزی از محیط اول خارج نمی‌شود. بنابراین در پایان تجربه در یک طرف Na^+، R^- و Cl^- و در طرف دیگر Na^+ و Cl^- را خواهیم داشت.

دونان، در ۱۹۱۱ نشان داده است که تعادل وقتی برقرار می‌شود که حاصلضرب غلظت‌های یون‌های قابل انتشار در دو طرف غشاء مساوی باشد: بنابراین:

$$\underset{(۱)}{[Na^+] \times [Cl^-]} = \underset{(۲)}{[Na^+] \times [Cl^-]}$$

فرض کنیم که در آغاز تجربه غلظت‌های همه یون‌ها برابر با واحد باشد؛ در پایان تجربه تعداد مساوی از یون‌های Na^+ و Cl^- از خلال غشاء گذشته‌اند (تعادل الکترواستاتیک).

(۱)			(۲)	
R^-	Cl^-	Na^+	Cl^-	Na^+
۱x	۱ + x		۱ − x	۱ − x

معادله دونان به شرح زیر نوشته خواهد شد:

$x(۱ + x) = (۱ - x)(۱ - x)$ و از آنجا $x = ۰/۳۳$ خواهد بود.

به این ترتیب در پایان تجربه تراکم یون‌های Cl^- در یک طرف ۰/۳۳ و در طرف دیگر ۰/۶۶ خواهد بود پس به نظر می‌رسد که یون غیرقابل انتشار یون متبلور با بار مشابه را به طرف دیگر دفع کرده است.

اگر در آغاز تجربه به جای این که در همه جا غلظت‌ها را برابر با واحد فرض کنیم غلظتی به میزان R − Na ۱۰۰ بازای ۱ ClNa را در نظر می‌گرفتیم، مشخص می‌شد که تمامی یون‌های Cl^- عملاً در خارج از غشاء باقی می‌ماندند.

حال اگر در مقابل R − Na نمکی که کاتیون آن متفاوت باشد مثلاً KCl را قرار دهیم به دلیل تبادل یون‌ها بین R − Na و KCl نتایج قبلی پیچیدگی پیدا می‌کرد و در حالت تعادل توزیع زیر را می‌داشتیم:

(۱)				(۲)		
R^-	Cl^-	Na^+	K^+	Cl^-	K^+	Na^+

با غلظت‌های اولیه برابر با ۱ برای هر دو ترکیب همانند آنچه در گذشته بیان شد می‌دیدیم که مقدار Cl^- که نفوذ کرده ۰/۳۳ است. جمع کاتیون‌ها که R^- و Cl^- مطابقت می‌کند، ۱/۳۳ است که ۰/۶۶ آن Na^+ و ۰/۶۶ آن K^+ خواهد بود، به عبارت دیگر حضور R − Na موجب $\frac{۲}{۳}$ از یون‌های K^+ موجود شده در حالی که در همان زمان تنها $\frac{۱}{۳}$ از یون‌های Cl^- نفوذ کرده‌اند. در این حالت نیز اگر R − Na در اصل ۱۰۰ بار غلیظ‌تر از KCl می‌بود، ۹۹٪ یون‌های K^+ نفوذ می‌کردند و نه $\frac{۲}{۳}$ آنها.

نقش غشاء در پدیدهٔ انتشار و اسمز

علاوه بر آنچه تاکنون شرح داده شد هر بار که غشایی را در نظر بگیریم که دقیقاً نیمه‌تراوا نباشد، بایستی به دخالت خاص آن که ممکن است موجب تغییر جریان پدیده‌ها شود توجه کنیم. دوتروشه مشخص کرده است که

برخی از مواد به حسب غلظتی که دارند تغییراتی را در جهت اسمز موجب می‌شوند. به همین ترتیب است که اسیدنیتریک با چگالی ۱/۰۸ اسمز عادی مثبت دارد، در حالی که همین اسید با چگالی ۱/۰۹ هیچگونه توان اسمزی نداشته و با چگالی ۱/۱۲ اسمز عادی منفی دارد. گراهام[1] نیز به نوبه خود موارد متعددی از اسمز منفی را مشاهده کرده است، به‌عنوان مثال عمل زیر را ذکر کنیم: اگر محلولی از K_2SO_4 و آب مقطر را به وسیلهٔ غشایی از هم جدا کنیم حرکتی از سوی آب به سوی نمک به خوبی قابل تشخیص است که مؤیّد قوانین اسمزی است. اما اگر به محلول نمکی مقدار کمی از یک اسید قوی بیافزاییم جهت اسمز معکوس می‌شود.

حالات غیرعادی از این قبیل به وسیلهٔ «عمل غشاء» توضیح داده می‌شوند.

اولین «عمل غشاء» به دلیل عوامل موئینه‌ای الکتریکی[2] است: برخی یون‌ها که به وسیلهٔ غشاء گرفته شده‌اند در سوراخ‌های غشاء یون‌های با بار مخالف را به خود جلب می‌کنند (دو لایه هلمولتز[3]) اما نیرویی که یون‌های اخیر را به‌هم می‌پیوندد تا حدی سست است و چنانچه این یون‌ها در یک میدان الکتریکی که بتواند موجب اختلافات غلظت، اختلافات PH و مانند آن شود قرار گیرند به راحتی جابه‌جا می‌شوند. در این حالت دیده می‌شود که جهت جابه‌جایی بستگی به طبیعت یون‌هایی دارد که به وسیلهٔ غشاء گرفته شده‌اند.

عمل دومی که باید در نظر گرفت توان آغشتگی غشاء[4] است که موجبی برای پخش همگن آب در این غشاء است (فلوزین[5]).

اگر در اسمزسنجی این آغشتگی در بخشی که با آب خالص در تماس است بیشتر از بخشی باشد که در تماس با محلولی است که در مقابل آب قرار گرفته نیروی دوم به نیروی اول افزوده خواهد شد و نتیجه آن چیزی جز افزایش توان اسمزی عادی نیست؛ برعکس اگر آغشتگی در محل تماس با محلول نمکی بیش از محل تماس با آب خالص باشد دو نیرو در جهت عکس هم عمل کرده و برای غلظت‌های کم، پدیده‌های غشاء می‌توانند پدیده‌های اسمزی را تشدید کنند.

مانع تراوایی

به منظور توجیه اختلافاتی که به حسب طبیعت مولکول‌ها برای تراوایی وجود دارد به ویژگی‌های فرضی ساختمانی یا ترکیبیِ غشاء اکتوپلاسمی توجه شده است. نظریه غشاء منفذدارِ تِرُب[6] می‌خواهد توضیح دهد که چگونه مولکول‌ها هرچه کوچک‌تر باشند بهتر نفوذ می‌کنند. نظریه غشاء لیپیدی (اورتن[7]) می‌خواهد تشریح کند که چرا مولکول‌ها هرچه بیشتر در چربی‌ها محلول باشند بهتر نفوذ می‌کنند. به منظور سازش دادن این دو نظریه که هر کدام به برخی از نتایج تکیه می‌کنند ناتانسن[8] و بعد کولاندر فرضیه غشاء موزائیکی یعنی غشایی که هم غربالی و هم در عین حال لیپیدی است را پیشنهاد کرده‌اند. بنا به این فرضیه در سطح سلول نوعی موزائیک وجود دارد که از مجاورت نواحی لیپیدی و نواحی منفذدار ساخته شده است. به حسب اهمیت نسبی این نواحی نفوذ مواد گوناگون به سلول‌های مختلف کم‌وبیش یا به واسطه قدرت انحلالشان در چربی‌ها یا به وسیلهٔ قطر مولکول‌هایشان اداره می‌شود.

انطباق معلومات کلوئیدها به ساختمان‌های زیستی نیز موجب راهنمایی به نظریه‌های کلوئیدی تراوایی شده‌اند: در این دید فضاهای بین میسل‌ها جایگزین «منافذ[9]» شده‌اند (کائو[10])؛ تغییرات تراوایی ممکن است نتیجه تغییرات تورم میسل‌ها یا حتی به‌صورت ریشه‌ای‌تر نتیجه معکوس شدن فازها باشد (کلووس[11]) یعنی: وقتی بخش (فاز)

1- Graham 2- Electrocapillary factors 3- Helmholtz
4- Power of pregnancy membrane 5- Flusin 6- Traube 7- Overton
8- Nathanson 9- pores 10- Kaho 11- Clowes

پیوسته آبکی باشد تنها مواد قابل حل در آب عبور خواهند کرد؛ و وقتی بخش پیوسته لیپیدی[1] باشد، تنها مواد محلول در چربی‌ها خواهند گذشت.

لزومی نیست که به بررسی انتقادی دقیقی از همه این نظریه‌ها بپردازیم به خوبی روشن است که این نظریه‌ها برای تخیّل‌اند. سعی شده که این نظریه‌ها را بر روی «نمونه‌های[2]» فیزیکو - شیمیایی ارزیابی کنند اما این نظریه‌ها هرگز نتوانسته‌اند بر روی معلوماتی از ساختمان و طرز عمل سلول زنده تکیه داشته باشند.

انتقال باواسطه

یون‌ها و مولکول‌های بزرگ یونی شده علاوه بر این که توسط انتشار و اسمز از غشاء عبور می‌کنند، به وسیله ناقل‌های موجود در غشاء هم می‌توانند عبور کنند. همان‌طوری که گفته شد غشاء آب و مولکول‌های غیرقطبی را با پخش ساده از یک طرف غشاء به طرف دیگر جابه‌جا می‌کند ولی برای انتقال بسیاری از مواد مانند قندها، اسیدهای امینه، یون‌ها، نوکلئوتیدها، پروتئین‌های ناقلی وجود دارد که این وظیفه حمل و نقل راانجام می‌دهند.

هر پروتئین ناقل طوری ساخته شده است که حمل و نقل گروه مخصوصی از مولکول‌ها مانند یون‌ها، قندها، اسیدهای امینه را به عهده دارد این ویژگی اختصاصی بودن ناقل را به خوبی نشان می‌دهد. برای مثال در برخی باکتری‌ها که در برخی ژن‌های پروتئین‌های غشایی آنها جهش به وجود آمده است انتقال گلوکز انجام نمی‌گیرد. در انسان نیز جهش‌های مختلفی دیده می‌شود که باعث اختلال در حمل و نقل مواد گردیده‌اند. مثلاً بیمارهای ارثی که حمل و نقل مواد به خصوصی را در کلیه و یا روده‌ها یا هر دو مختل می‌سازند.

در انتقال باواسطه دو حالت زیر را می‌توان در نظر گرفت:

الف - اگر انتقال از غلظت بالا به طرف غلظت پایین باشد بدون صرف انرژی است و به آن انتشار تسهیل شده[3] می‌گویند.

حال اگر ماده باردار هم باشد (هم شیب غلظت و هم اختلاف پتانسیل الکتریکی) در غشاء باعث حمل و نقل مواد می‌شود که روی هم به آن شیب غلظت و شیب الکتریکی[4] می‌گویند.

شیب الکتریکی: بین دو سطح پلاسمالم اختلاف پتانسیلی حدود ۱۰۰ mvol - تا ۲۰ mvol - (حدود mvol ۶۰) وجود دارد که آن را پتانسیل آرامش می‌نامند. این اختلاف پتانسیل بر مبادله و انتقال مواد به ویژه مواد باردار از غشاء اثر می‌گذارد. هر یون برای عبور از غشاء بایستی از سه سدّ بگذرد. یکی سطح بیرونی و آب‌گریز غشاء، با بارهای مثبت فراوان که بی‌تردید عبور یون‌های با بار منفی را تسهیل می‌کند و برعکس یون‌های با بار مثبت (همنام) برای عبور از آن با مشکل مواجه خواهند بود. سدّ دوم بخش میانی و آب‌گریز غشاء است که از مجموعه بخش‌های آب‌گریز مولکول‌های لیپیدی و بخش‌های بدون بار پروتئین‌های غشایی است که در مجموع با نیروهای ناشی از برهم‌کنش بخش‌های آب‌گریز مولکول‌ها در ارتباط هستند. سدّ سوم، سطح درونی و آب‌گریز غشاء است که بارهای منفی زیادی دارد و بنابراین بر عبور یون‌ها برعکس سطح بیرونی اثر می‌گذارد. گاهی ممکن است شیب الکتریکی بر شیب غلظت غلبه کند.

رابطه نرنست وجود وابستگی بین شیب الکتریکی و شیب غلظت را نشان می‌دهد:

$$ZEF = RTlogin\left(\frac{C_1}{C_2}\right)$$

در این رابطه،

۱- لاپیک Lapicque مقایسه زیر را در نظر گرفت: اگر سرزمینی به وسیلهٔ خرگوش‌ها و ماهی‌ها اشغال شده باشد چنانچه محیط، زمین گسترده‌ای پوشیده از برکه‌ها باشد تنها خرگوش‌ها جابه‌جا می‌شوند و اگر محیط آب گسترده‌ای باشد که به وسیله جزایری به قسمت‌هایی تقسیم شده، تنها ماهی‌ها جابه‌جا می‌شوند.

2- Modeles 3- Passive transport = Downhill 4- Electrochemical gradition

Z = ظرفیت یونی، E = اختلاف پتانسیل (نشان‌هنده گردایان الکتریکی)، F = عدد فاراده (۹۶۵۰۰)، R = ضریب ثابت گازها، T = درجه حرارت محیط برحسب کلوین، login (لگاریتم طبیعی بر مبنای ۱۰ ضربدر ۲/۳۰۳)، C_1 = غلظت بیشتر، C_2 = غلظت کمتر است.

ب - اگر انتقال از غلظت پایین به غلظت بالا باشد با صرف انرژی همراه است. انتقال فعال[1] یون‌ها را (پمپ یونی) گویند مانند پمپ سدیم، پتاسیم، کلسیم و غیره که در اعمال زیستی مهمی در سلول مثل تنفس، فتوسنتز، انقباض عضلانی به کار می‌روند. این نوع انتقال را انتقال سربالایی[2] نیز می‌گویند.

پروتئین‌های ناقل[3]

پروتئین‌های ناقل مانند آنزیم‌های متصل شده به غشاء و همانند پدیدهٔ اتّصال آنزیم به سوبسترا عمل می‌نمایند. هر پروتئین ناقل دارای یک یا چند نقطهٔ اتصال اختصاصی[4] است.

وقتی تمام این نقاط اتصال اشباع شد سرعت انتقال ماکزیمم است که به این سرعت Vmax می‌گویند. Vmax برای هر پروتئین مشخص است. به‌علاوه هر پروتئین ناقل یک ثابت اتصال[5] برای مادهٔ حمل شونده دارد که آن را با Km نشان می‌دهند.

Km عبارت است از غلظت ماده موردنظر برای حمل و نقل وقتی است که سرعت انتقال Vmax باشد. برخی پروتئین‌های ناقل مانند آنزیم می‌توانند توسط مهارکنندگان، مهار شوند که به آنها مهارکننده‌های رقابتی[6] می‌گویند و بعضی دیگر مهارکنندگان غیررقابتی[7] نامیده می‌شوند.

پروتئین‌های ناقل مواد به سه نوع می‌توانند عمل کنند:

۱- پروتئین‌های ناقل، ماده را فقط از یک جهت به جهت[8] دیگر حمل می‌کنند.

۲- حمل و نقل ماده بستگی به ماده دیگری دارد ولی جهت هر دو در یک طرف است (انتقال همراه[9]) مانند (سدیم و گلوکز).

۳- حمل و نقل ماده در یک جهت باعث انتقال ماده دیگری در جهت مخالف آن می‌شود (انتقال متقابل[10]) مانند پمپ سدیم و پتاسیم (ATPase) و یا در RBC می‌توان دو ماده پروتئین باند Π و Cl^- و HCo_3^- را در نظر گرفت.

براساس طبقه‌بندی دیگری دو گروه مهم پروتئین ناقل وجود دارد: پروتئین‌های حامل[11] و پروتئین‌های کانالی[12].

پروتئین‌های ناقل دو شکل فضایی دارند. شکل پونگ[13] حالتی که پروتئین‌های ناقل مواد موردنظر را در خود جای می‌دهند و شکل پینگ[14] که مواد را به داخل یا خارج سلول منتقل می‌کنند (شکل ۶-۲۴). انتقال گلوکز به وسیله پروتئین‌های ناقل مثال مناسبی از این نوع انتقال است.

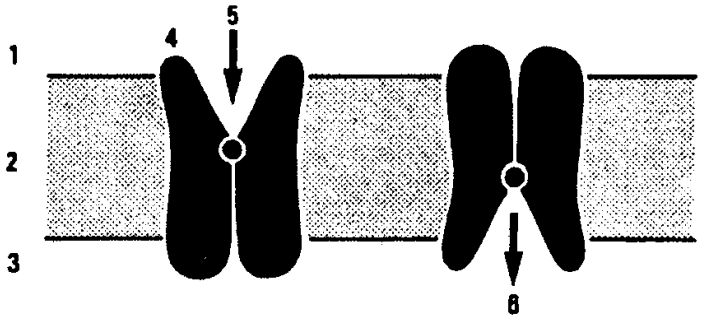
در سال‌های اخیر برای انتقال گلوکز تا ۵ شکل مولکولی ناقل درنظر گرفته شده است که هر کدام با متابولیسم بافتی که در آن پیدا شده‌اند سازگاری دارند. شکل ناقل‌ها تا حد زیادی مشابه است و هر کدام شامل یک زنجیره پلی‌پپتیدی با حدود ۵۰۰ اسیدامینه است. حدود نیمی از موقعیت‌های اسیدهای امینه در هر پنج شکل ناقل شبیه یا بسیار شبیه است. مدل پیچیده هر کدام دارای دوازده قطعه چین‌خورده در غشاء می‌باشد (شکل ۶-۲۵). هر ناقل گلوکز را به ترتیب کشف شماره‌گذاری می‌کنند ($GluT_1$,$GluT_2$,$GluT_3$ و ...).

1- Active transport 2- Uphill transport 3- carrier 4- specific binding site
5- Binding Constant 6- Competitive 7- Non Competitive
8- uniport 9- symport 10- Antiport 11- Carrier protein 12- channel protein
13- Pong 14- Ping

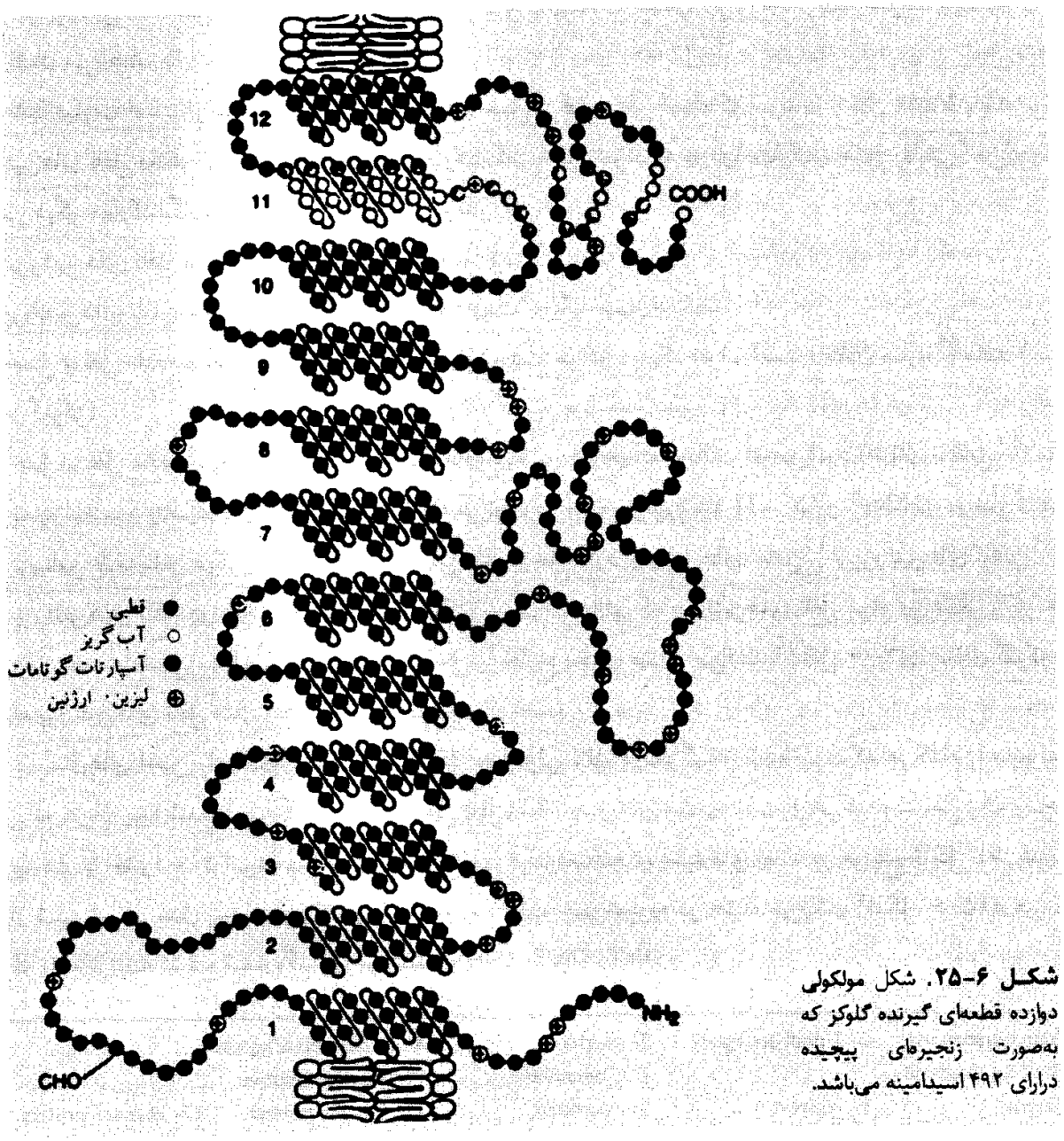
$GluT_1$ به مقدار زیادی در سلول‌های توپرشی رگ‌های خونی و شکلی که سدّ بین مغز و خون است کشف شد.

$GluT_2$ در اندام‌های چون کبد، روده، کلیه و در سلول‌های پانکراسی بتا (محل ترشح انسولین) دیده می‌شود و قادر است گلوکز را به خون رها می‌سازند. این ناقل گلوکز را نسبت به تراکمش در خون منتقل می‌کند.

$GluT_3$ در سلول‌های عصبی مغز وجود دارد و در شرایط عادی انتقال مقدار ثابتی از گلوکز را به این سلول‌ها موجب می‌شود.



شکل ۶-۲۴. انتقال گلوکز. ماده منتقل شونده خود را در پرمه‌آز تثبیت می‌کند. پس از تغییر شکل ناقل، ماده منتقل شونده به درون سلول رها می‌شود. ۱- سطح بیرونی غشاء؛ ۲- غشاء سلولی؛ ۳- سطح درون غشاء؛ ۴- پرمه‌آز؛ ۵- قاپیدن ماده منتقل شونده (شکل پونگ)؛ ۶- آزاد شدن ماده منتقل شونده پس از تغییر شکل ناقل (شکل پینگ).

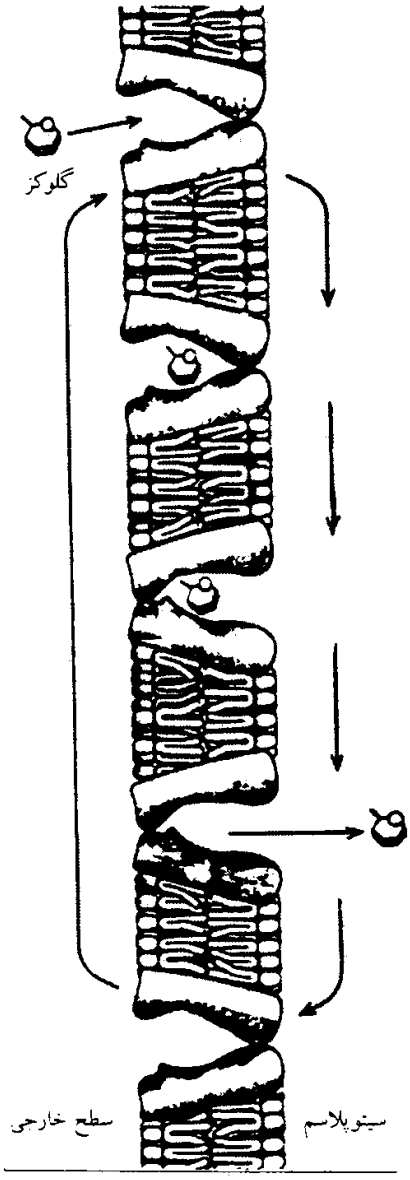


شکل ۶-۲۵. شکل مولکولی دوازده قطعه‌ای گیرنده گلوکز که به‌صورت زنجیره‌ای پیچیده دارای ۴۹۲ اسیدامینه می‌باشد.

$GluT_4$ به‌عنوان ناقل مهم و اصلی گلوکز در سلول‌های چربی و ماهیچه‌ای یعنی در محل‌هایی است که گلوکز به مقادیر زیادی جذب می‌شود و به ترکیبات دیگری (لیپیدها در سلول‌های چربی) تبدیل می‌شود.

$GluT_5$ به‌طور عمده در روده کوچک و کلیه‌ها یافت می‌شود و جزئیات عمل آن هنوز مشخص نشده است.

این پنج نوع ناقل گلوکز را از عرض غشاء در جهت شیب غلظت یعنی از غلظت‌های بالاتر به طرف غلظت‌های پایین‌تر عبور می‌دهند. این مجموعه ناقلین گلوکز از ناقلین دیگر که گلوکز را در جهت خلاف شیب هم منتقل می‌کنند و آنها را ناقلین کمکی گلوکز می‌نامند (زیرا انتقال یک مولکول گلوکز همراه یک مولکول سدیم می‌باشد)، تفاوت دارند (شکل ۶-۲۶).

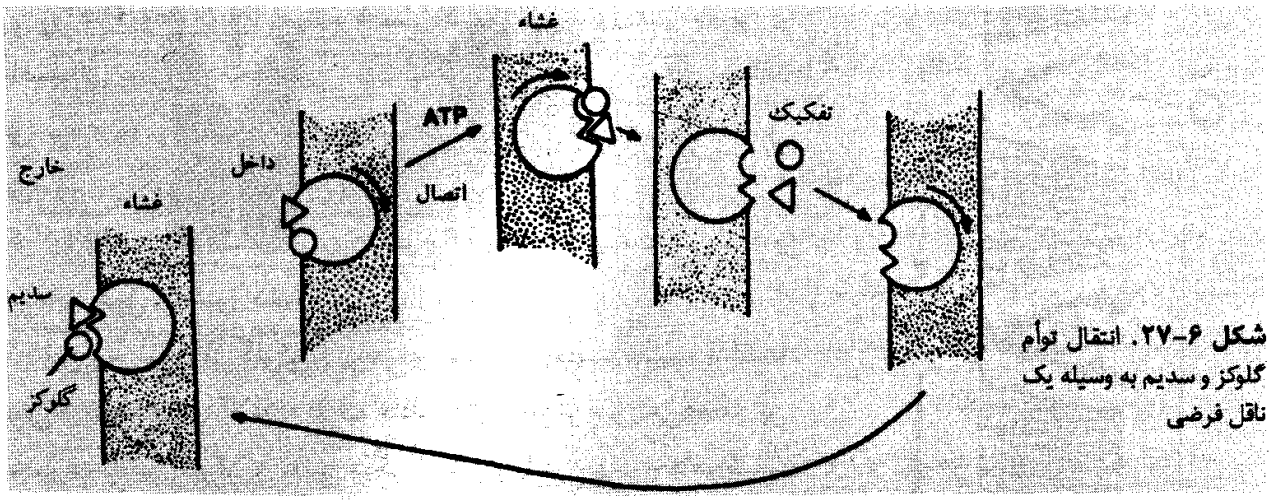


شکل ۶-۲۶. مدلی دیگر که چگونگی عمل ناقل کمکی گلوکز را نشان می‌دهد.

چگونگی طرز عمل ناقلین گلوکز که به‌طور کلی آنها را نوعی از پرمه‌آزها در نظر می‌گیرند نشان می‌دهد. چهار مرحله برای انتقال به کمک این ناقل‌ها درنظر گرفته می‌شود: در مرحله اول گلوکز سطح خارجی ناقل را اشغال می‌کند، در مرحله دوم پرمه‌آز انتقال دهنده تغییر شکل فضایی می‌دهد به‌طوری که جایگاه اتصال سطح داخلی سلول را اشغال می‌کند، در مرحله سوم انتقال دهنده گلوکز را به درون سلول آزاد می‌کند و در مرحله چهارم ناقل تغییر شکل می‌دهد و به وضع اول برمی‌گردد تا برای انتقال مولکول جدیدی از گلوکز آماده باشد. برخی پژوهشگران (James و همکارانش، ۱۹۹۲) تصور می‌کنند که حرکت نوسانی ناقل با حضور گلوکز بسیار سریع می‌شود به‌طوری که در نبود گلوکز هر مولکول ناقل در غشاء گویچه سرخ، در دمای ۲۰°C، ۱۰۰ بار در هر ثانیه بین دو حالت تغییر می‌کند و هنگامی که گلوکز به آن متصل می‌شود حرکتش حدود ۹۰۰ برابر در ثانیه می‌شود. این تغییر شکل‌ها را به ترتیب شکل پونگ[1] و پینگ[2] نامند (شکل ۶-۲۵).

برای انتقال گلوکز از سال‌ها قبل فرض دیگری نیز مطرح بوده است به این ترتیب که یک حامل پروتئینی که به کمک Na^+ فعال می‌شود و دارای ۲ جایگاه فعال است در نظر گرفته می‌شود. یک جایگاه برای اتصال Na^+ و جایگاه دیگر برای اتصال گلوکز. در سطح سلول که مقدار Na^+ زیاد است (به‌طور معمول مقدار Na^+ در محیط خارج و سطح در تماس با محیط پلاسمالم زیاد است) Na^+ در جایگاه خود بر روی حامل قرار می‌گیرد میل ترکیبی آن را برای ترکیب با گلوکز افزایش می‌دهد. سپس با حرکت چرخشی حامل که البته چنین حرکات چرخشی در غشاء دشوار است، حامل به ترتیبی قرار می‌گیرد که جایگاه‌های فعال آن به طرف درون سلول قرار می‌گیرد. درون سلول مقدار Na^+ به نسبت کمتر از محیط است و Na^+ از جایگاه خود جدا شده موجب تغییر شکل و تغییر خواص جایگاه گلوکز می‌شود و گلوکز نیز از حامل جدا می‌شود. حامل دوباره می‌تواند به سطح سلول برسد و عمل خود را تکرار کند. (شکل ۶-۲۷).

1- Pong 2- Ping

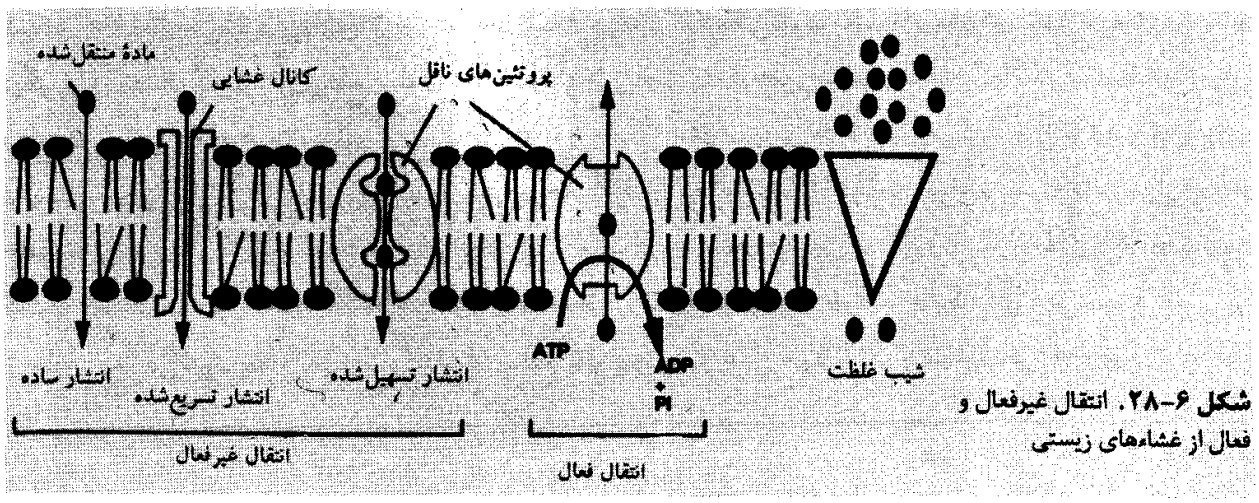


شکل ۶-۲۷. انتقال توأم گلوکز و سدیم به وسیله یک ناقل فرضی

در برخی نظریه‌ها، پیشنهاد شده است که حامل پروتئینی گلوکز دارای دو جایگاه فعال است یکی جایگاهی که به‌طور رقابتی به وسیله Na^+ یا K^+ اشغال می‌شود و دیگری جایگاه گلوکز. چنانچه جایگاه اول به وسیله Na^+ یا K^+ اشغال شده باشد، شکل جایگاه دوم برای اتصال گلوکز مناسب می‌شود. وقتی جایگاه‌های فعال حامل به سوی محیط بیرون سلول باشد، Na^+ که مقدارش در محیط و به‌طور معمول بیشتر از K^+ است در رقابت موفق است و جایگاه اول را اشغال می‌کند. در این هنگام گلوکز در جایگاه دوم قرار می‌گیرد. با چرخش ناقل و جابه‌جایی آن که می‌تواند تصادفی (بدون خرج انرژی) یا هدف‌دار (توأم با مصرف ATP) باشد، جایگاه‌های فعال آن به سوی درون سلول قرار می‌گیرد که در آنجا مقدار K^+ به‌طور معمول بیشتر است؛ در نتیجه K^+ در رقابت موفق می‌شود که Na^+ را از جایگاه اول حامل جدا کند و خود جایگزین آن شود. در لحظهٔ این جابه‌جایی، گلوکز از جایگاه دوم رها می‌شود و جذب سیتوزول می‌گردد، حامل به همراه K^+ به سطح خارجی سلول برمی‌گردد و K^+ در محیط رها می‌شود. به این ترتیب سلول به ازای جذب گلوکز، مقداری از K^+ خود را از دست می‌دهد.

پروتئین‌های کانالی

این گونه پروتئین‌ها از یک طرف تا طرف دیگر غشاء کشیده شده‌اند و به‌صورت کانالی در می‌آیند که وقتی کانال باز است مواد به خصوصی مانند یون‌های غیرآلی که دارای بار و قطر به خصوصی هستند می‌توانند از آنها عبور کنند (شکل ۶-۲۸).



شکل ۶-۲۸. انتقال غیرفعال و فعال از غشاءهای زیستی

چون پروتئین کانالی همگی در انتقال یون‌ها دخالت دارند، به آنها کانال‌های یونی نیز می‌گویند. تا 10^6 یون در هر ثانیه می‌تواند از این کانال بگذرد و سرعت عمل آنها ۱۰۰ مرتبه بیشتر از پروتئین‌های ناقل است. کانال‌های یونی به سرچشمه انرژی احتیاج ندارند و انتقال یون را در جهت شیب غلظت انجام می‌دهند. یون‌های Na^+، K^+، Ca^{++}، Cl^- در جهت شیب الکتروشیمیایی انتقال می‌یابند.

کانال‌ها خیلی انتخابی‌عمل می‌کنند و فقط اجازه می‌دهند برخی از یون‌های باردار با اندازه مخصوصی از آنها بگذرند و از عبور یون‌های دیگر جلوگیری می‌کنند.

برخی از این کانال‌ها دارای در[1] هستند که در لحظه کوتاهی باز شده و سپس بسته می‌شود. در اغلب اوقات این نوع درها در اثر تغییرات انتخابی در روی غشاء یاخته باز و بسته می‌شوند.

تغییرات مهم انتخابی در غشاء که بر روی باز و بسته شدن درها اثر دارند عبارتند از:

۱- **کانال‌های ولتاژی**[2]: در اثر تغییرات پتانسیل غشاء درها باز و بسته می‌شوند.

۲- **کانال‌های تحریک مکانیکی**[3]: که در جواب تحریکات مکانیکی باز و بسته می‌شوند.

۳- **کانال‌های نشانه‌ای**[4]: در اثر نشانه‌هایی که به سلول وارد می‌شوند باز و بسته می‌شوند.

۴- **کانال‌های عبوری**[5]: در اثر تحریکات الکتریکی باز و بسته می‌شوند.

۵- **کانال‌های نوکلئوتیدی**[6]: در جواب به نوکلئوتیدها باز و بسته می‌شوند.

تاکنون در حدود ۵۰ نوع کانال‌های یونی کشف شده است که هر کدام در سلول، نقش زیستی ویژه‌ای دارند. مثلاً عبور جریان الکتریکی از اعصاب و عضلات باعث فعال شدن در چهار نوع کانال‌های یونی یکی پس از دیگری می‌شود.

در استیل‌کولین که در سیناپس قرار گرفته را کانال‌های عبوری نیز می‌گویند و این در عین حال گیرنده برای استیل‌کولین نیز می‌باشد.

۵- *انتقال به کمک یونوفورها*[7]

برخی موادی که قابلیت نفوذ غشاء را تغییر می‌دهند یونوفور نامیده می‌شوند. یونوفورها مولکول‌های آب‌گریز کوچکی هستند که در غشاء حل شده و قابلیت نفوذ را بالا می‌برند. اغلب این نوع مواد به وسیله باکتری‌ها سنتز می‌شوند و باکتری‌ها در واقع این نوع مواد را برای حمله به باکتری‌های دیگر و کشتن آنها و مصرف مواد داخل آنها به کار می‌برند. برخی از این مواد به‌عنوان آنتی‌بیوتیک مصرف می‌شوند. در حال حاضر دو گروه از این یونوفورها وجود دارند:

تیپ اول را حامل‌های یونی متحرک[8] و تیپ دوم را اشکال کانالی[9] می‌نامند. هر دو تیپ یونوفور باعث تولید یک نوع سپر اطراف یون‌های باردار، شده و باعث می‌شوند که این یون‌ها نتوانند از قسمت آب‌گریز غشاء بگذرند.

حرکت یون‌ها در جهت شیب الکتروشیمیایی آنهاست و برای این کار به انرژی احتیاج ندارند.

گروه اول: از گروه حامل‌های یونی متحرک می‌توان والینومایسین[10] را نام برد که پلیمری است حلقوی شکل که قابلیت نفوذ غشاء را نسبت به یون K^+ بالا می‌برد.

1- gate 2- Voltage gate channel 3- mechanically stimulated channel
4- Ligand gated channel 5- Transmitted gated channel
6- Nucleotid gated channel 7- Ionoforse 8- Mobile ione carriers
9- channel formers 10- Valinomycin

این حلقه دارای یک بخش آب‌گریز در قسمت بیرونی است که از زنجیره‌های جانبی اسیدامینه والین تشکیل شده است که با قسمت هیدروکربنی دو لایه لیپیدی در تماس است.

قسمت داخل حلقه قطبی است که فقط یک یون K^+ در آن جا می‌گیرد.

والینومایسین انتقال K^+ را در جهت شیب الکتروشیمیایی انجام می‌دهد در نتیجه K^+ را از طرف بیرون غشاء گرفته و در طرف دیگر آن آزاد می‌کند.

یکی دیگر از مواد این دسته، یونوفور A23187 می‌باشد این یونوفور برخلاف والینومایسین یون‌های دو ظرفیتی مثل Ca^{++} و Mg^{++} را حمل می‌کند. طرز کار این یونوفور بدین طریق است که معمولاً دو H^+ را از سلول به خارج می‌فرستد و یون دو ظرفیتی را به داخل می‌برد. ورود Ca^{++} به داخل سلول در جهت شیب الکتروشیمیایی انجام می‌گیرد.

اگر درجه حرارت را پایین بیاوریم تا به نقطه انجماد برسد، یونوفورها نمی‌توانند در غشاء پخش شوند و انتقال یون متوقف می‌گردد. برخلاف اینها موادی که در دو لایه غشاء تولید کانال می‌کنند حتی اگر دو لایه منجمد شوند به کار خود ادامه می‌دهند.

گروه دوم: از اشکال کانالی یونوفور، می‌توان کارامایسین A را نام برد که عبارت است از یک زنجیره خطی پپتیدی که تمام اسیدهای امینه آن حاوی زنجیره جانبی آب‌گریز هستند. دو مولکول از آن با یکدیگر تولید یک کانال سرتاسری در غشاء می‌نمایند. این کانال یون‌های H^+ و K^+ و به نسبتی کمتر Na^+ را در جهت شیب الکتروشیمیایی حمل می‌کند. این دیمرها قابلیت ثبات کمی دارند و به‌طور دایم از هم جدا شده و دو مرتبه با هم تولید کانال را می‌نمایند. مدت باز بودن کانال به‌طور متوسط حدود یک ثانیه است. کارامایسین A حدود ۲۰۰۰۰ کاتیون را در میلی ثانیه از کانال باز عبور می‌دهد.

کارامایسین A یک آنتی‌بیوتیک است که برخی باکتری‌ها ترشح کرده و باعث مرگ باکتری دیگر می‌شوند. مرگ این باکتری‌ها در اثر از بین رفتن گرادیان Na^+, K^+, H^+ می‌باشد که برای زیست سلول مهم هستند.

۶- انتقال فعال[1]

انتقال مواد را که با مصرف انرژی زیستی انرژی حاصل از مولکول‌های پرانرژی مثل ATP و دخالت آنزیم‌ها (حداقل ATPase برای هیدرولیز ATP) انجام شود را انتقال فعال گویند. تعیین‌کننده نهایی نوع و جهت انتقال در حقیقت انتقال فعال است که بنا به نیاز سلول صورت می‌گیرد. این نوع انتقال می‌تواند در زمان انجام، با پدیده‌هایی مثل شیب غلظت، شیب الکتریکی و دیگر پدیده‌های انتقال مواد که تاکنون شرح داده شد، همسو یا در خلاف جهت آنها انجام شود. برای مثال چنانچه سلول به گلوکز، اسیدامینه یا یونی نیازمند باشد، با خروج ATP آن را، حتّی در خلاف جهت شیب غلظت یا شیب الکتریکی جذب خواهد کرد.

۷- پمپ یونی

انتقال فعال یون‌ها را پمپ یونی گویند. به عبارت دیگر وقتی که یک یون علیرغم شیب الکتروشیمیایی انتقال پیدا می‌کند، انتقال آن را پمپ یونی گویند. برای این نوع انتقال مصرف اکسیژن اضافی لازم می‌شود. بر بنای محاسبات انجام شده، ۱۰٪ از سوخت‌وساز یک ماهیچه، در حال استراحت قورباغه صرف انتقال یون‌های سدیم

1- Active transport

می‌شود. در برخی شرایط تجربی که ماهیچه تحریک می‌شود این مصرف ممکن است تا ۵۰٪ افزایش یابد.

حفظ پتانسیل آرامش غشاء نیز با انتقال فعال انجام می‌شود. این مطلب در سلول‌های گیاهی و جانوری که فرآیند سوخت‌وسازشان در نتیجه نبود اکسیژن یا به وسیله سموم ویژه‌ای متوقف شده است، قابل اثبات است. در چنین مواردی ممکن است K^+ انتشار پیدا کند و پتانسیل غشاء تا حدود صفر کاهش یابد.

نوعی از انتقال‌های فعال پمپ سدیم است. علاوه بر انتشار یا عبور غیرفعال مولکول‌های خنثی و یون‌ها از عرض غشاءها، نفوذپذیری سلول‌ها یک سری از ساختکاری‌هایی که نیاز به انرژی دارند را نیز شامل می‌شود. این ساختکارها کلاً به‌عنوان فرآیندهای انتقال فعال تعریف می‌شوند. آدنوزین‌تری‌فسفات (ATP) که به‌طور عمده به وسیلهٔ فسفریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری‌ها تولید می‌گردد، معمولاً به‌عنوان منبع انرژی مورد استفاده قرار می‌گیرد. به همین دلیل معمولاً انتقال فعال را در رابطه یا همراه با تنفس سلول درنظر می‌گیرند.

وقتی که یک یون علیرغم شیب الکتروشیمیایی انتقال پیدا می‌کند، صرف اکسیژن اضافی لازم می‌آید. طبق محاسباتی که انجام شده، ۱۰٪ از سوخت‌وساز یک ماهیچهٔ در حال استراحت قورباغه صرف انتقال یون‌های سدیم می‌گردد. در بعضی شرایط تجربی که ماهیچه تحریک می‌شود این مصرف ممکن است تا ۵۰٪ افزایش پیدا کند.

پتانسیل آرامش غشاء خودش نیز به وسیلهٔ انتقال فعال حفظ یا نگهداری می‌شود. این مطلب در سلول‌های گیاهی و جانوری که فرآیند سوخت‌وسازشان به وسیلهٔ فقدان اکسیژن یا سموم به خصوصی متوقف شده قابل اثبات است. در چنین حالت‌هایی ممکن است که K^+ انتشار پیدا کرده و پتانسیل غشاء تا نزدیک صفر کاهش یابد. واضح است که انتقال فعال یون‌ها برای حفظ تعادل اسمزی سلول لازم و اساسی است. سلول با تنظیم غلظت آنیون‌ها، کاتیون‌ها و دیگر یون‌ها ی مخصوصی که در متابولیسم مورد نیازند، فشار اسمزیش را ثابت نگه می‌دارد. یون‌های پتاسیم که در داخل سلول تغلیظ شده‌اند، علیرغم شیب غلظت باز هم باید وارد گردند. این فرآیند توسط یک ساختکار پمپی که نیاز به انرژی دارد انجام می‌گیرد. یون‌های سدیم که به‌طور پیوسته به همراه آب از سلول خارج می‌گردند نیز باید به وسیلهٔ یک جریان فعال انتقال یابند. این روند گاهی اوقات پمپ سدیم نامیده می‌شود.

شکل ۶-۲۹ نسبت خروج میان K^+ و Na^+ به وسیله ساختکارهای غیرفعال و فعال را خلاصه کرده و حالت یکنواخت پتانسیل استراحت حاصله را نشان داده است. فرآیند تغییرات غیرفعال (سرازیری) یون‌ها با تغییرات فعال (سربالایی) یون‌ها مقایسه شده‌اند. نکته قابل توجه این است که پمپ فعال برای خروج سدیم Na^+ به‌طور کلی ساختکار اصلی جهت حفظ پتانسیل منفی به اندازه ۵۰ - میلی‌ولت در داخل غشاء است. این دیاگرام نشان می‌دهد که پراکنش یون‌ها از عرض غشاء به جمع دو فرآیند جدا از هم بستگی دارد:

۱- نیروهای ساده انتشار الکتروشیمیایی که مایل به ایجاد یک تعادل دونان (یعنی انتقال غیرفعال) هستند.

۲- روندهای نیازمند انرژی انتقال یون (انتقال فعال).

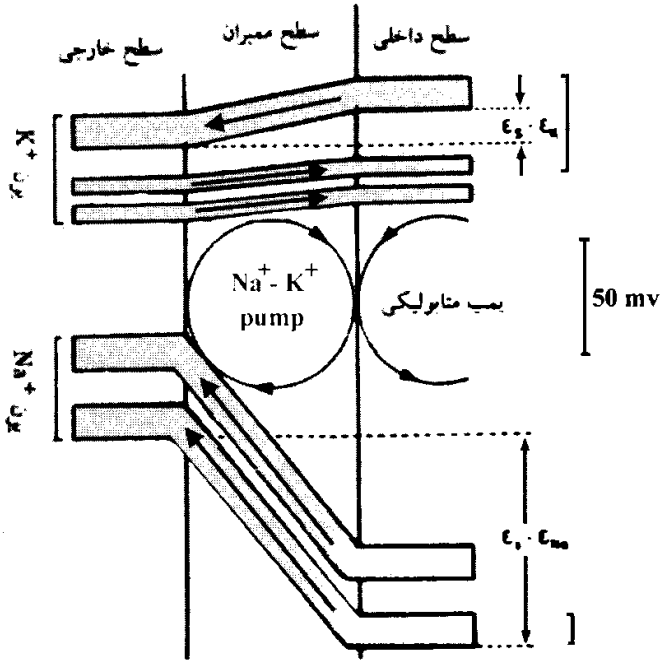
مثال دیگر پمپ‌های یونی، پمپ سدیم - پتاسیم وابسته به $ATP - ase - Mg^{+2}$ است. قبلاً گفتیم که Na^+ به همراه آب به وسیله ساختکار انتقالی فعالی که اغلب پمپ سدیم نامیده می‌شود از سلول خارج می‌گردد. این ساختکار در سال ۱۹۵۵ به وسیله هادکین[1] و کینز[2] کشف گردید و به زودی توسط اسکو[3] به آنزیم $Na^+ K^+ ATPase$ ربط داده شد. این آنزیم قادر است هیدرولیز ATP را با جابه‌جایی سدیم از سیتوپلاسم علیرغم نامساعد بودن شیب الکتروشیمیایی به‌هم مربوط سازد.

1- Hodkin 2- Keynes 3- Skou

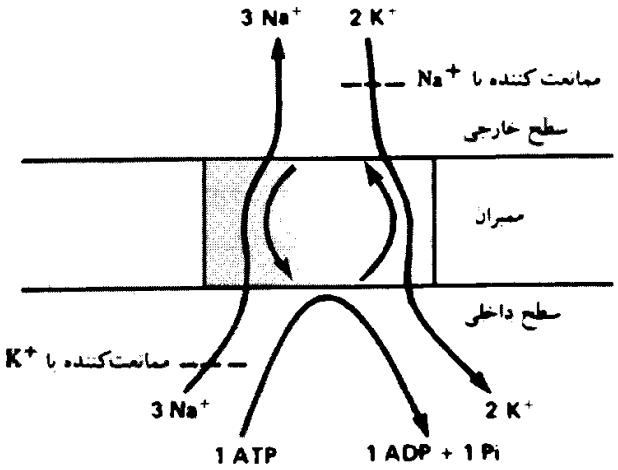
$Na^+ K^+$ ATPase به‌طور محکم در اطراف غشاء سلول قرار گرفته و می‌توان آن را با استفاده از پاک‌کننده‌ها جدا کرد. وزن مولکولی آن در حدود ۶۷۰۰۰ بوده و احتمالاً شامل چندین پلی‌پپتید می‌باشد. یک گلبول قرمز دارای حدود ۵۰۰۰ از این آنزیم است که هر کدام می‌توانند ۲۰ یون Na^+ را در هر ثانیه از سلول بیرون ببرند. شکل ۶-۳۰ یک دیاگرام تصوری از $Na^+ K^+$ ATPase را در غشاء سلول قرمز نشان می‌دهد. باید درنظر داشت که هیدرولیز یک مولکول ATP انرژی لازم برای متصل‌کردن و انتقال دو یون K^+ به طرف داخل و سه یون Na^+ به طرف خارج سلول را فراهم می‌نماید. این دیاگرام خصوصیات برداری آنزیم را نشان می‌دهد که نسبت به ATP در داخل غشاء حساس بوده ولی در خارج غشاء حساسیتی ندارند. ATPase به وسیله مخلوطی از Na^+ و K^+ تحریک می‌گردد. شکل ۶-۳۰ همچنین نشان می‌دهد که Na^+ و K^+ محل‌های مستقلی دارند و به ترتیب به‌طور رقابتی توسط K^+ و Na^+ متوقف می‌گردند.

معلوم گردیده که مقدار زیادی K^+ ATPase Na^+ در غشاء سلول‌های عصبی مغز و کلیه وجود دارد و مقدار آنزیم در اندام‌های الکتریکی مارماهی و غده‌های نمکی پرندگان دریایی که انتقال یون‌ها در سلول‌هایشان بسیار فعال است، خیلی زیاد می‌باشد. در سیستم K^+ ATPase Na^+ خروج سدیم به خارج با ورود پتاسیم به داخل سلول جبران می‌شود و در نتیجه اختلاف بار الکتریکی به وجود آمده، خنثی می‌گردد. با وجود این موارد دیگری وجود دارد که در آنها پمپ مولد الکتریسته می‌شود، زیرا خروج سدیم با ورود پتاسیم جبران نمی‌گردد. پمپ مولد الکتریسته پتانسیلی به وجود می‌آورد که ممکن است منجر به ایجاد نیرویی جهت انتقال مواد محلول دیگر شود. از جمله موادی (نظیر گلوکز و آمینواسیدها) که می‌توانند به وسیله پمپ سدیم وارد سلول گردند.

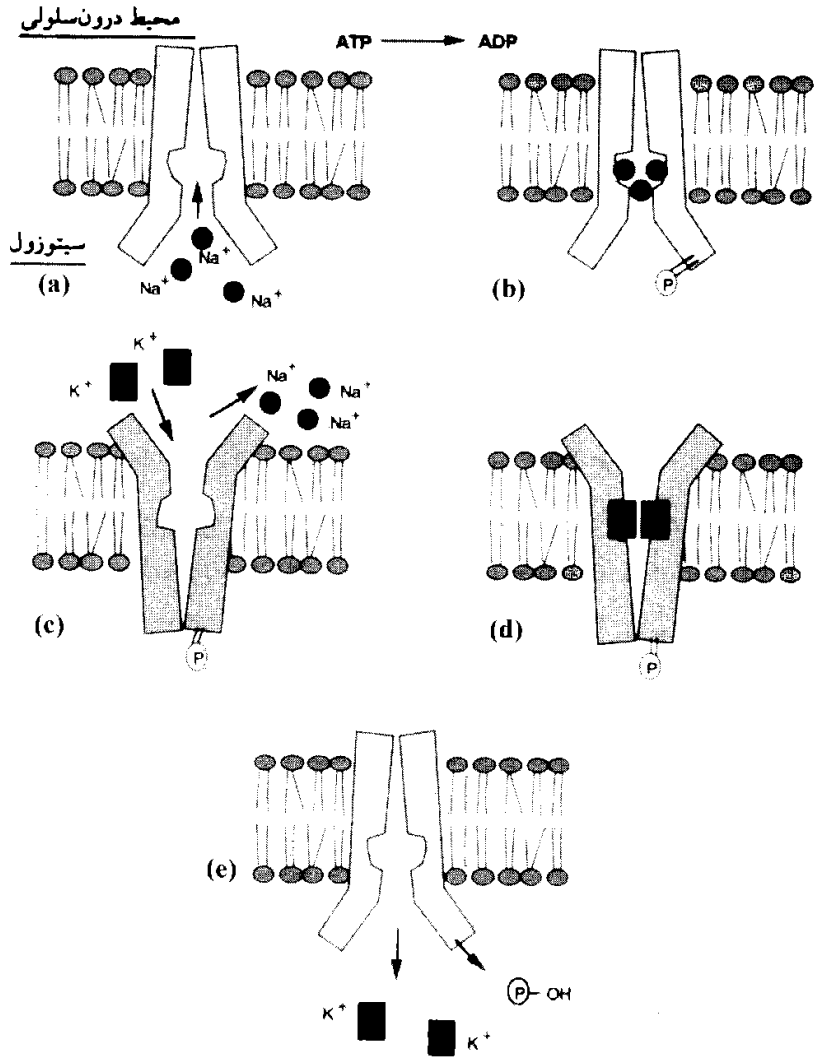
شکل ۶-۳۱ نیز طرز کار فرضی پمپ سدیم - پتاسیم با دخالت ATP را نشان می‌دهد.



شکل ۶-۲۹. تغییرات فعال و غیرفعال Na^+ و K^+ در طول غشاء در حالت پیوسته. در این شرایط پتانسیل الکتروشیمیایی یون‌ها به‌صورت روابط زیر است: $E_K - E_s$ برای K^+، $E_S - E_{Na}$ برای Na^+ این مقطع فاصله‌ای در مجاورت غشاء است. عرض این نوار به اندازهٔ تغییرات ذره‌ای است که یک طرفه عبور می‌کند. انتقال غیرفعال Na^+ آنقدر ناچیز است که نشان داده نشده است.



شکل ۶-۳۰. دیاگرامی از $Na^+ K^+$ ATPase در غشاء سلول مشاهده می‌شود که به ازاء هر مولکول ATP که هیدرولیز می‌گردد، از قسمت داخل غشاء سه یون Na^+ به طرف خارج و دو یون K^+ به طرف داخل انتقال داده می‌شود.



شکل ۶-۳۱. طرز کار فرضی پمپ سدیم - پتاسیم با دخالت ATP را نشان می‌دهد. a) اتصال ۳ Na^+ (پمپ در حالت باز به طرف درون). b) فسفوریلاسیون پروتئین به وسیله ATP c) فسفوریلاسیون موجب تغییر شکلی می‌شود که انتقال ۳ Na^+ به سوی خارج را تحریک می‌کند. d) شکل جدید به تثبیت ۲ K^+ کمک می‌کند. e) دفسفوریلاسیون پروتئین موجب بازگشت آن به وضع اول و هدایت ۲ K^+ به طرف درون سلول می‌شود.

۸- *انتشار غیریونی*[1]

شکل تجزیه نشده برخی از اسیدها و بازهای ضعیف در غشاء سلولی را شامل می‌شود (در شکل یونی به سختی عبور می‌کنند) این رویداد در لوله گوارش و کلیه‌ها مشاهده می‌شود.

۹- *کشش حلّال - انتقال توده مواد*

زمانی که حلّال تمایل دارد تعدادی از مولکول‌های ماده حل شونده را به‌صورت دسته جمعی و توده‌ای[2] با خود حرکت دهد، این نیرو را کشش حلّال نامند. این پدیده در کپسول بومن مشاهده می‌شود. (اوره، اسیداوریک، گلوکز، آب، املاح، اسیدامینه که برخی دفعی و برخی لازمند با فشار زیاد تراوشی مویرگی از غشاء سلول‌های جدار کپسول بومن به درون کپسول تراوش می‌شوند و سپس مواد لازم مثل گلوکز، اسیدهای امینه، بخش مهمی از آب و املاح در طول لوله ادراری باز جذب می‌شوند).

۱۰- *فاگوسیتوز (ریزه خواری)*

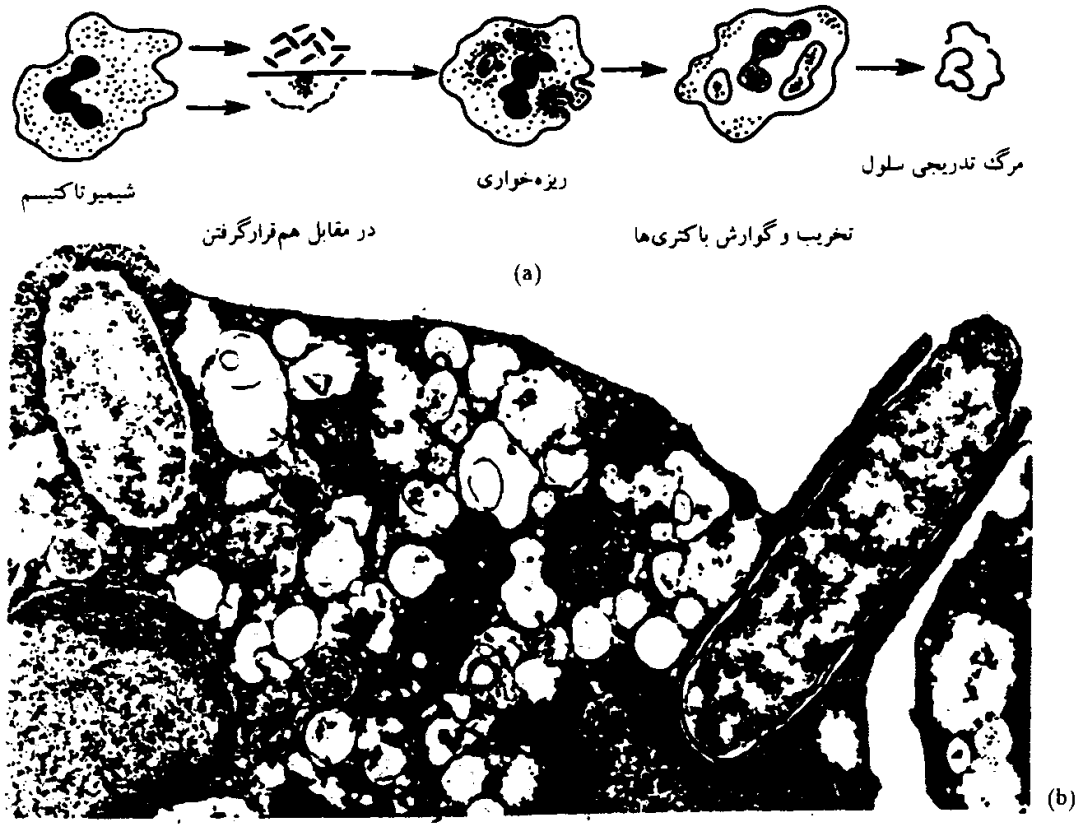
انواع معینی از سلول‌ها از قبیل ماکروفاژها و گویچه‌های سفید چند هسته‌ای برای جذب و باکتری‌های مهاجم، تک یاخته‌ها، قارچ‌ها، سلول‌های آسیب‌دیده تخصص عمل یافته‌اند. به‌عنوان مثال وقتی یک باکتری در سطح یک ماکروفاژ متصل شد، زواید سیتوپلاسمی ماکروفاژ گسترده می‌شود و سرانجام باکتری را احاطه می‌کند.

1- Non ionic diffusion
2- Balk flow

لبه‌های زواید این ماکروفاژ به‌هم جوش می‌خورند و بالاخره باکتری در داخل واکوئل فاگوسیتوزی داخل سلولی احاطه می‌شود سپس لیزوزوم‌ها با واکوئل یکی می‌شوند که منجر به از بین رفتن باکتری‌ها می‌گردد.

نوتروفیل‌ها سلول‌هایی با عمر کوتاه هستند (۷ - ۶ ساعت در خون و ۴ - ۱ روز در بافت همبند) پس از این زمان چه در فاگوسیتوز شرکت کرده باشند یا نه از بین می‌روند و به علت این طول عمر کوتاه نیازی به تولید ذرات اضافی ندارند لذا دستگاه پروتئین‌سازی در آنها به مقدار اندکی گسترش یافته است. نوتروفیل‌ها خط اول دفاع سلولی را در مقابل میکروارگانیسم‌های مهاجم به‌خصوص باکتری‌ها تشکیل می‌دهند.

نوتروفیل‌ها سلول‌های ریزه‌خوار فعالی برای ذره‌های کوچکند و برای تمایز آنها از ماکروفاژها که ریزه‌خوار ذرات بزرگ‌ترند، گاهی آنها را میکروفاژ مهم می‌نامند. این سلول‌ها در هنگام گردش خون غیرفعال و کروی هستند اما به محض چسبیدن به یک سوبسترای جامد تغییر شکل می‌دهند و توسط پاهای کاذب روی آن نقل مکان می‌نمایند. این گرانولوسیت‌ها پس از چسبیدن به یک سطح نگهدارنده فرآیندی به نام توسعه یا گسترش را آغاز می‌کنند که با خروج استطاله‌های سیتوپلاسمی در جهات مختلف که به آن استطاله‌های هیالوپلاسم یا سیتوپلاسم بدون ذرّه می‌گویند تغییر شکل می‌دهند. در این فرآیند قاعده سلول به سوبسترا نمی‌چسبد بلکه خود را بالای آن نگاه داشته و تنها با استطاله‌های رشته‌ای هیالوپلاسم، سوبسترا را لمس می‌کنند. ریزه‌خواری در سلول‌های مختلف تفاوت‌هایی هم دارد. شکل ۶-۳۲ طرحی از چگونگی ریزه‌خواری را نشان می‌دهد.



شکل ۶-۳۲. a). مراحل اصلی ریزه‌خواری b). ریزه‌خواری به وسیله یک گرانولوسیت. در بالا و سمت راست، یک باکتری به شکل استوانه‌ای، تقریباً به‌طور کاملی به وسیله پاهای کاذب پوشیده شده است. در بالا و سمت چپ، یک باکتری در حال خورده شدن است و به درون یک واکوئل ریزه‌خواری کشیده شده است. ذرات تیره‌ای که در اطراف این واکوئل قرار دارند، فسفاتازهایی هستند که به وسیله لیزوزوم‌ها در آن ریخته شده‌اند. (×۱۸۰۰۰)

۱۱- آندوسیتوز با واسطهٔ گیرنده

برای بسیاری از مواد از قبیل لیپوپروتئین‌های با وزن مخصوص پایین (LDL) و هورمون‌های پروتئینی، روی سطح سلول گیرنده‌هایی وجود دارند که به‌طور پراکنده به‌طور وسیعی روی سطح سلول قرار دارند (جدول ۶-۵) و یا در فرورفتگی‌های ویژه‌ای موسوم به گودال‌های مفروش[1] تجمع یافته‌اند. اتصال مادهٔ منتقل شونده به گیرنده‌اش موجب می‌شود که گیرنده‌هایی که به‌طور وسیع پراکنده بودند به‌صورت گودال‌های مفروش مجتمع شوند.

ماده منتقل شونده + گیرنده ⟵ گودال مفروش

پوشش روی سطح سیتوپلاسمی غشاء از چند پلی‌پپتید درست شده که عمده‌ترین آنها کلاترین[2] است. این پروتئین شبکه‌ای را به وجود می‌آورد؛ از ۵ ضلعی‌ها و ۶ ضلعی‌هایی درست شده است که از نظر آرایش شکل چهار چوب یک گنبد ساختمانی را دارند. معتقدند که این نوع آرایش خاصّ نیرویی را به وجود می‌آورد که باعث فرورفتن گودال‌های مفروش به داخل، جدا شدن آنها از سطح و تشکیل حفره‌های مفروش می‌شود که مادهٔ منتقل شونده را به همراه خود به درون سلول می‌برد.

اخیراً ساختمانی واسط بین حفره‌های مفروش و لیزوزوم‌ها کشف شده‌اند که آندوزوم[3] نام دارند و در حقیقت حفره‌هایی بزرگ‌تر و بدون پوشش کلاترین هستند. اطراف غشاء آندوزوم‌ها دارای پمپ‌های پرتونی است (PH داخلی آنها ۵ یا کمتر است) و اکثر مواد منتقل شونده در چنین PHهایی از گیرنده‌های خود جدا می‌شوند. به نظر می‌رسد استطاله‌های لوله‌ای شکل کوتاهی از غشاء آندوزوم گیرنده‌های متصل به غشاء را از مواد منتقل شونده که اکنون قابل حل هستند جدا می‌کنند. برخی از پژوهشگران این ساختمان‌ها را «اجزاء جداکننده گیرنده از منتقل شونده[4]» نامیده‌اند (جدول ۶-۵).

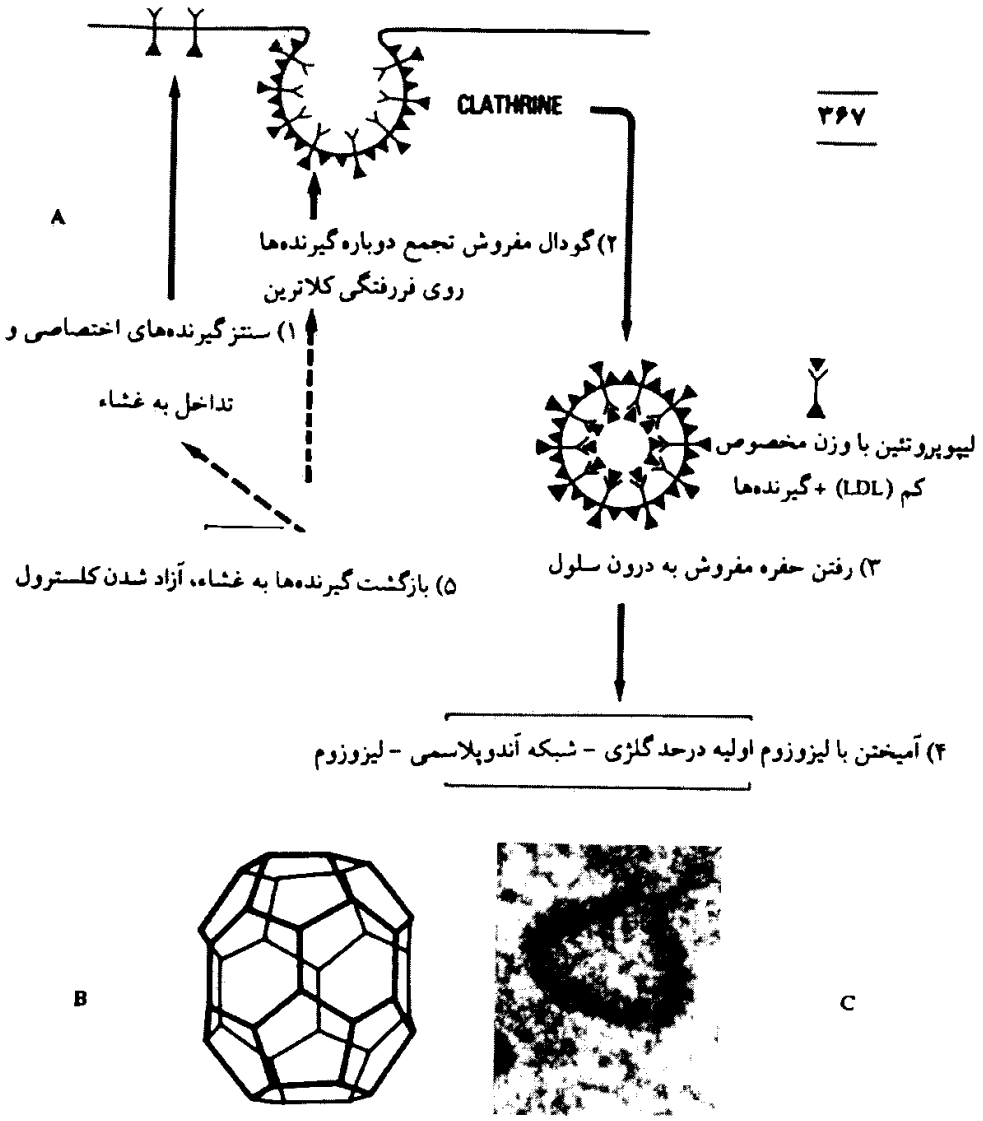
جدول ۶-۵. چهار حالت آندوسیتوز با واسطه رسپتور

حالت	سرنوشت رسپتور	سرنوشت لیگاند	مثال‌ها
اول	به سطح غشاء باز می‌گردد	به سطح غشاء باز می‌گردد	ترانسفورین - پروتئین‌های MHC
دوم	به سطح غشاء باز می‌گردد	تجزیه می‌گردد	LDL
سوم	تجزیه می‌گردد	تجزیه می‌گردد	فاکتوررشداپیدرمی، کمپلکس‌های ایمنی
چهارم	انتقال می‌یابد	انتقال می‌یابد	انتقال ایمونوگلوبین G مادری توسط سلول‌های اپیتلیال روده نوزاد به داخل جریان خون

مطابق شکل ۶-۳۳ گیرنده‌ها دوباره به‌صورت چرخه‌ای به سطح سلول می‌روند و مواد منتقل شونده به طرف لیزوزوم‌ها هدایت می‌شوند.

جهت دفع سلولی (اگزوسیتوز) اغلب عکس آندوسیتوز است. در نوعی از آندوسیتوز که بیشتر در سلول‌های ترشحی دیده می‌شود، علامتی که باعث ترشح می‌شود اغلب یک پیام‌بر شیمیایی[5] است مثلاً هورمون به گیرندهٔ غشاء متصل شده، فعّال شدن گیرنده (رسپتور) باعث فعال شدن علامت درون سلولی می‌شود که در اغلب موارد موجب بالا رفتن غلظت Ca^{++} آزاد در سیتوزول می‌شود.

1- cooted pits 2- Clatrin 3- endosome
4- CURL = Compartment of Uncoupling of Resepter and Ligand 5- Chemical messenger



شکل ۶-۳۳. حفره‌های پوشاننده (حفره‌های آندوسیتوزی) a). چگونگی تشکیل حفره‌های آندوسیتوزی b). مولکول‌های کلاترین شبکه‌ای ۵ و ۶ وجهی می‌سازند c). حفره پوشاننده (۱۰۰۰۰۰×).

در مدلی دیگر مواد از یک قسمت جذب و از طرف دیگر به خارج ترشح می‌شوند. مواد وارد شده می‌توانند غیر حفره‌های ذخیره شده و یا محتوی حفره‌های ثانوی در داخل سلول ادغام شده و تولید حفره‌های حد واسط را نمایند[1].

تمایزهای سطح سلول: سطح سلول‌ها برای انجام وظایف زیستی، تمایزهای ویژه‌ای پیدا می‌کند که مهم‌ترین آنها، اتصال‌های سلولی[2]، میکروویلی‌ها و تغییراتی که غشاء برای شناسایی سلول‌های دیگر پیدا می‌کند (شکل ۶-۳۴).

اتصال‌های سلولی

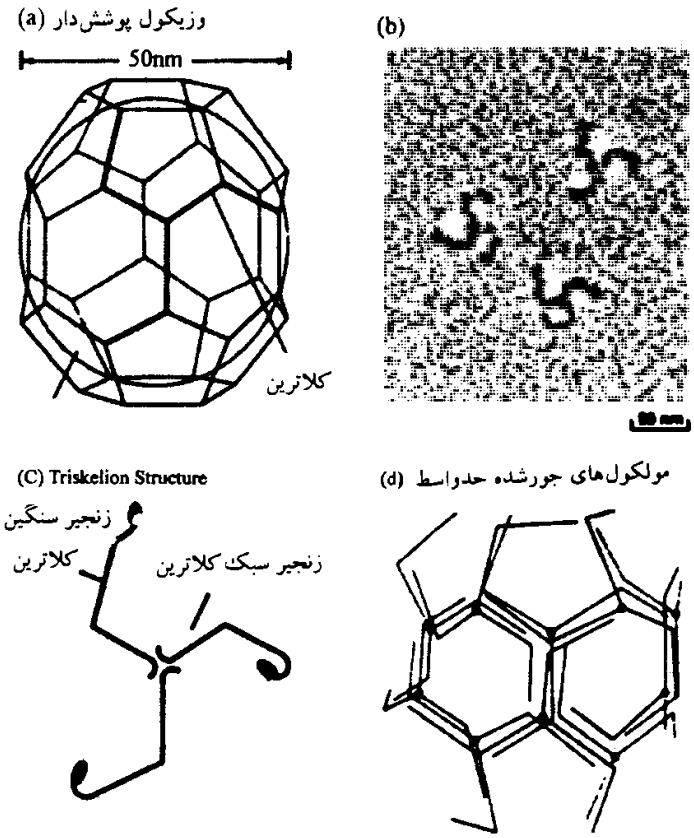
لازمه تشکیل بافت و اندام، برقراری تماس و در نتیجه تبادل آگاهی بین سلول‌ها است. در موجودات پرسلولی، سلول‌ها با محیط پیرامون خود یا ماده خارج سلولی (ماتریکس) تماس دارند. این ماده بافت‌ها را در کنار هم نگه‌داشته، شبکه بسیار منظمی را پدید می‌آورد که در محدوده آن سلول‌ها فرصت جابه‌جا شدن و انجام واکنش را

1- Transcytosis 2- Cell Junctions

پیدا می‌کنند.

به منظور کسب آگاهی، قبول فرامین، انتقال یون‌ها و جریان الکتریسته، سلول علاوه‌بر بهره‌گیری از طریق انتشار ساده، انتقال فعال، آندوسیتوز، اگزوسیتوز و فاگوسیتوز که از خواص غشاء پلاسمایی به حساب می‌آیند، از راه برقراری ارتباط ویژه با سایر سلول‌ها، از محیط پیرامون خود آگاهی کسب می‌کند و به اقتضای ویژگی آن آگاهی، از خود واکنش نشان می‌دهد. پژوهش‌های سال‌های اخیر گوناگونی چنین ارتباطاتی را به اثبات رسانیده است.

سلول‌های پوششی به‌طور محکمی به‌هم چسبیده‌اند و برای جداساختن آنها از یکدیگر نیروی مکانیکی به نسبت زیادی مورد نیاز است. اتصال‌های سلولی بیشتر در بافت‌های پوششی مشاهده می‌شود که به‌طور معمول در معرض کشش و فشار قرار دارند (مثل پوست). به‌طور کلی این چسبندگی به علل زیر می‌باشد:



شکل ۶-۳۴. چگونگی آرایش پروتئین‌های کلاترین جهت تشکیل (گودال مفروش)

الف - قسمتی از این اتصال‌ها به دلیل وجود گلیکوپروتئین‌هایی است که جزء پروتئین‌های اساسی غشاء پلاسمایی هستند.

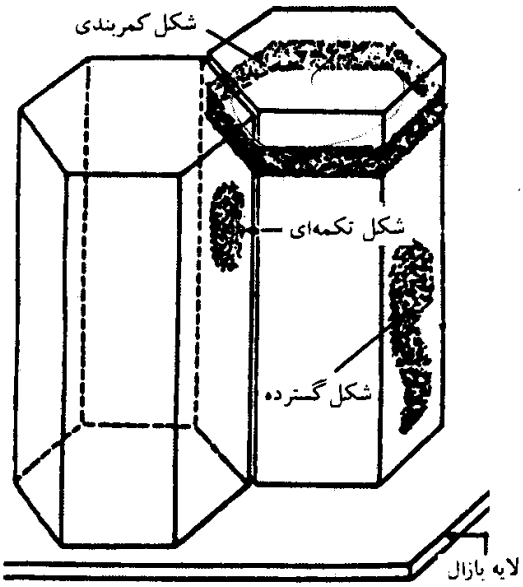
ب - به دلیل وجود مقدار اندکی پروتئوگلیکان‌های بین سلولی است.

ج - نقش یون‌ها مثل یون‌های دو ظرفیتی به‌خصوص یون‌های کلسیم که در ثبات و چسبندگی سلول‌ها مؤثرند. مثلاً ماده EDTA که با کلسیم ترکیب می‌شود در کاهش خاصیت چسبندگی سلول مؤثر است. لذا به گونه‌ای وسیع در زیست‌شناسی سلولی برای جداسازی سلول‌ها از یکدیگر کاربرد دارد. این روش جداسازی، گامی ضروری در فراهم ساختن سوسپانسیونی از سلول‌های مجزاست.

د - غشاهای جانبی سلول‌های پوششی دارای خصوصیاتی هستند که اتصال‌های بین سلولی[1] نام دارند و نه تنها به‌عنوان جایگاه‌هایی برای چسبندگی هستند بلکه همانند یک سدّ مانع جریان مواد از بین فضاهای بین سلولی شده در ضمن پدید آورنده مکانیسمی جهت ارتباطات بین سلولی[2] می‌باشند.

اصطلاحات مختلفی برای بیان نقاط خاص اتصال بین غشاء سلول‌های جانوری به کار گرفته می‌شود به‌طور معمول در همهٔ آنها به دو عامل اهمیت داده می‌شود، یکی شکل و وسعت و دیگری ماهیت یا میزان انسداد در محل تماس. با این ترتیب اتصال ممکن است به شکل یک نقطه یا تکمه با وسعت محدود باشد به نام ماکولا[3] و یا دور تا دور سلول به شکل حلقه یا کمربند کشیده شده باشد به نام زونولا و یا پوششی ورقه‌ای و گسترده به نام فاسیا[4] شکل ۶-۳۵).

1- Intercellular Junction
2- Intercellular Communication
3- Macula
4- Fascia



شکل ۶-۳۵. مدلی فرضی از اتصالات به شکل کمربندی، تکمه‌ای و گسترده

از نظر وضع محل تماس و میزان انسداد، اگر فضای بین سلولی به دلیل تماس یا اتصال سطح خارجی غشاء دو سلول مجاور مسدود شود اصطلاح اوکلودنس[1] به کار می‌رود و اگر فاصله بین سلولی واضح (اغلب ۲۰۰ تا ۲۵۰A°) بوده و ماده متراکمی در فضای بین سلولی و سطح سیتوپلاسمی دو غشاء وجود داشته باشد، اصطلاح ادهرنس[2] برای مشخص کردن آنها به کار گرفته می‌شود.

برخی از اتصال‌های سلولی موجب بسته شدن فضای بین سلولی می‌شوند و مانع نفوذ و مبادله مواد بین دو سلول از محل اتصال می‌شوند، عده‌ای دیگر موجب به‌هم چسبیدن غشاء دو سلول مجاور شده و سلول‌ها را کنار هم نگه می‌دارند و عده‌ای دیگر مانعی برای ارتباطات فیزیولوژیکی بین دو سلول مجاور نیستند و امکان چنین ارتباطاتی را باقی می‌گذارند. با توجه به این حالت‌های مختلف به‌طور کلی اتصال‌های سلولی را به سه نوع عمده تقسیم می‌کنند:

۱- اتصال‌های نفوذناپذیر

۲- اتصال‌های چسبنده

۳- اتصال‌های ارتباط دهنده

۱- اتصال‌های نفوذناپذیر

گروه اول که مهم‌ترین نوع اتصال هستند و به اتصال محکم[3] (مسدود) معروف می‌باشند اغلب در سلول‌های اپی‌تلیوم در اولین اتصال غشاء سلولی از رأس سلول وجود دارند. در این نوع اتصال پروتئین‌هایی به نام پروتئین‌های عرضی[4] وجود دارند که در برش عرضی مثل میخ عمل کرده وارد سلول می‌شوند. به‌طور کلی هرچه طول این اتصال[5] بیشتر باشد نفوذپذیری سلول کمتر است و بالعکس.

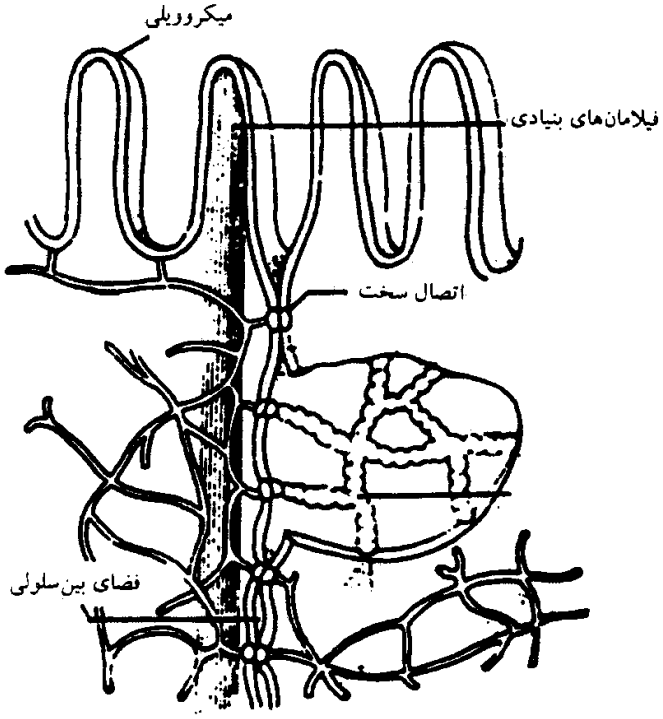
با توجه به معنی Zonula (زونولا: نواری شکل) و اوکلودنس (به معنی یکی شدن غشاء سلولی) می‌توان گفت که در این نوع اتصال فضای بین سلولی مسدود است، لذا در اتصال محکم غشاهای دو سلول مجاور به‌هم می‌چسبند و تقریباً هیچ فضای بین سلولی باقی نمی‌ماند، به‌نظر می‌رسد که اتصال‌های سلولی از این نوع برای بستن راه انتشار باشد. معمولاً دو غشاء به‌صورت یک باند محکم و سرتاسری در نزدیک لبه آزاد سلول‌ها به وجود آمده و مجموعاً پنج لایه در آنها مشاهده می‌شود مانند سلول‌های پوششی جدار روده‌ها و رگ‌های خونی.

اتصال‌های چسبنده موجب اتصال مکانیکی سلول‌ها به یکدیگر می‌شوند و به‌طور کلی می‌توان گفت وظیفه این اتصال‌ها نظارت در گزینش مواد است تا اجازه عبور پیدا کنند (شکل ۶-۳۶).

می‌دانیم که سلول‌ها موادی را از طریق پمپ به مایع خارج سلولی می‌فرستند که از آنجا به خون می‌روند. نقل و انتقال در اثر حضور دو گروه از پروتئین‌های ویژه غشاء انجام می‌پذیرد: یک گروه به سطحی از غشاء سلولی پوششی

1- Occludense 2- Adherens 3- Sealing =Unpermeability J. Tight J. = Zonula Occludens
4- Transmembrana Protein 5- ridge - groone

که با مجرای گوارشی در تماس است تعلق دارد به نام سطح رأسی[1] و گروه دیگر ویژه سطح مقابل یا سطح پایه‌ای[2] به حساب می‌آیند. سطح مجاور لوله گوارش از راه فعالیت پمپ موادی را به درون می‌فرستد، در حالی که سطح پایه‌ای مواد را به خارج ارسال می‌دارد. به منظور این که حرکت دو جهته پمپ‌ها تداوم داشته باشد ضروری است پمپ‌هایی که روی غشاء منطقه رأسی مستقر هستند به غشاء پایه‌ای نفوذ نکنند و نیز پمپ‌های سطح پایه‌ای به غشاء رأسی تجاوز ننمایند. علاوه‌بر این ضروری است که مولکول‌های انتقال یافته به مجرای گوارش نشت نکنند.



شکل ۶-۳۶. انواع اتصال‌های سلولی و میکروویلی و گلیکوکالیکس و ارتباط بین رشته‌های میکروویلی با اتصال سخت نشان داده شده است.

در اتصال‌های بسته غشاء پلاسمالم دو سلول مجاور به حدی به یکدیگر نزدیک می‌گردند که دیگر جایی برای فضای میان سلولی باقی نخواهد ماند. حتی اگر مادهٔ ردیابی، با روش تراکم الکترونی به یک طرف صفحه سلول افزوده شود، توانایی عبور از اتصال محکم رانخواهد داشت. اتصال بسته را می‌توان با افزودن آنزیم‌های تجزیه‌کننده پروتئین‌ها یا موادی که باعث رها شدن یون کلسیم و یا منیزیم می‌شوند، از میان برد. از این رو به‌نظر می‌رسد که پروتئین‌های ویژه و کاتیون‌های دو ظرفیتی برای برقراری و پایداری این اتصال‌ها ضروری باشند.

مشاهدات میکروگراف الکترونی نشان می‌دهد که اتصال‌های بسته هنگامی که پروتئین‌های ویژه وابسته به دو غشاء مربوط به دوسلول مجاور در فضای بین سلولی با یکدیگر تلاقی پیدا می‌کنند تشکیل می‌گردند. استفاده از روش تهیه برش از راه انجماد بافت، پروتئین‌ها را چون زنجیره‌ای خطی بین دو لایه از غشاء پلاسما نشان می‌دهد.

در بی‌مهرگان اتصال‌های دیواره‌دار[3] یا اتصال‌های پلکانی جایگزین اتصال‌های بسته می‌شوند. اتصال‌های بسته بین غشاء سلول‌های همجوار سرتولی، که دیواره مجاری منی‌ساز را پدید می‌آورند نیز وجود دارد. سلول‌های سرتولی، سلول‌های بلندی هستند که دامنه آنها از غشاء پایه تا درون مجرا کشیده می‌شود. وجود اتصال‌های محکم بین این سلول‌ها، دو فضا را به وجود می‌آورد که مایع میان بافتی در آنها، بایکدیگر تفاوت آشکار دارد. فضای رو به غشاء پایه، ترکیبی همانند خون دارد اما در فضای دیگر که رو به مجراست مقدار ناچیزی پروتئین و سایر ماکرومولکول‌ها دیده می‌شود. اتصال‌های بسته در حقیقت سدی را بین خون و بیضه پدید می‌آورند.

با این وجود استروئیدها به آسانی از اتصال‌ها عبور می‌کنند و به داخل مجرا راه می‌یابند. از سوی دیگر سلول‌های نطفه بالغ شده نیز توان عبور از این مایع را پیدا می‌کنند. زیرا هنگام عبور، اتصال در بخش جلوی نطفه، تخریب می‌گردد و مانع از میان برداشته می‌شود و به‌صورت همزمان بخش پس سری، پس از عبور نطفه، از نو بازسازی می‌گردد.

1- Apical Surface 2- Basal Surface 3- Septa Junction

اتصال بسته موجب می‌گردد که مایع منی در مجاری منی‌ساز، با ترکیبات موجود در پلاسمای خون تفاوت داشته باشد. به‌طوری که مقدار ناچیزی گلوکز و پروتئین در آن وجود دارد. اما منبعی غنی از هورمون‌های آندوژن، استروژن، K^+ اینوزیتول، اسیدگلوتامیک و اسیدآسپارتیک به حساب می‌آید. افزون بر این، اتصال بسته، سلول‌های نطفه را از اثرات زیانبار عوامل موجود در خون نگهبانی می‌کند و نیز مانع عبور فراورده‌های آنتی‌ژنی از سلول‌های نطفه به داخل خون می‌گردد. در صورت عدم حضور اتصال بسته، چه بسا چنین فراورده‌هایی به داخل خون رها می‌گردید و موجب پیدایش خود ایمنی نسبت به آنتی‌ژن‌ها را فراهم می‌آورد. ضمناً اتصال بسته شیبی از غلظت به وجود می‌آورد که احتمالاً حرکت مواد را به سوی مجاری منی‌ساز، امکان‌پذیر می‌سازد.

۲- اتصال‌های چسبنده[1]

دسموزوم‌ها: گستردگی زیادی در بافت‌ها دارند. اتصال‌های دسموزمی گروهی از سلول‌ها را که به بافت مشخصی تعلق دارند وادار می‌کنند که نظیر یک واحد فیزیولوژیک نقش خود را به انجام برسانند. این نوع اتصال به ویژه در بافت‌هایی چون ماهیچه قلب که در معرض فشارهای سخت مکانیکی قرار می‌گیرند و نیز بافت پوششی پوست و گردن رحم، وجود دارند. این امر نشان می‌دهد که اتصال‌های دسموزمی در نگه داشتن سلول‌ها در کنار یکدیگر حایز اهمیت‌اند. هرچند شکل دسموزم‌ها به‌طور عمده در سلول‌های پوششی به چشم می‌خورند (شکل ۶-۳۷).

مهم‌ترین اتصال‌های چسبنده عبارتند از:

A – دسموزم لکه‌ای یا صفحه‌ای[2]

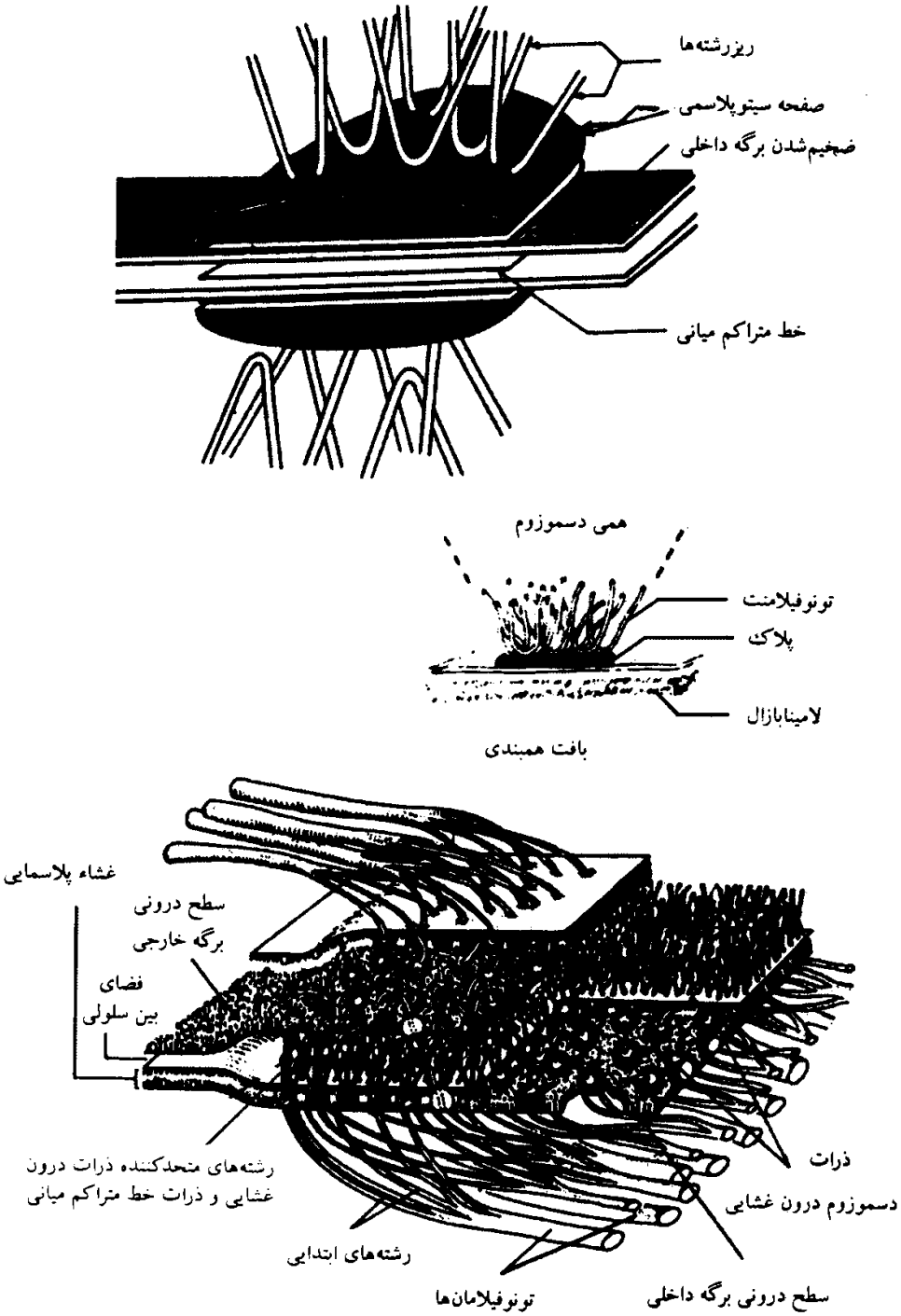
B – دسموزوم کمربندی[3]

C – همی دسموزم[4]

A – ***مهم‌ترین اختصاصات دسموزم صفحه‌ای:***

- به ساختمان تکمه چسبنده[5] معروف است و فاصله بین دو غشاء حدود ۲۰۰ A° می‌باشد و دقیقاً در زیر اتصال محکم (مسدود) قرار دارد.
- به‌صورت پل بین سلولی، اتصال دو غشاء مجاور را به عهده دارد، به‌صورت صفحه‌ای به نام پلاک‌های سیتوپلاسمی[6] مشاهده می‌شود و گروهی از رشته‌های بسیار ظریف[7] به نام تونوفیلامان[8] مانند سنجاق سر از غشاء سلول وارد در فضای بین سلولی شده و سپس به سیتوپلاسم داخل می‌شوند. بنابراین در فضای بین دو سلول رشته‌ها و دانه‌هایی که در اتصال دو سلول مؤثر است مشاهده می‌شود.
- فیلامان‌های فوق‌الذکر به درون صفحات متراکمی که بر روی سطح سیتوپلاسمی غشاهای اتصالی وجود دارند فرو رفته‌اند و این صفحات حاوی میوزین، تروپومیوزین، آکتینین، وینکولین می‌باشند (هنوز چگونگی عمل متقابل فیلامان‌های آکتین و غشاء دقیقاً معلوم نیست).
- این نوع اتصال را می‌توان در بافت‌های پوششی سنگفرشی مطبق پوست و استوانه‌ای روده مشاهده کرد.
- حدود بیش از ۱۲ نوع پروتئین در صفحه متراکم شناخته شده که گروه‌هایی از رشته‌های بینابینی از جنس سیتوکراتین یا به داخل صفحه اتصالی نفوذکرده و یا همچون سنجاق سر دور خود پیچیده به داخل سیتوپلاسم باز می‌گردند.
- در فاصله بین سلول‌ها ماده متراکمی از اسید موکوپلی‌ساکارید و پروتئین تشکیل شده و احتمال می‌رود که این

1- Adhering J. 2- Disc Desmosome (Spot) 3- Bell Desmosome
4- Hemidesmosome 5- Bottom Like Structure 6- Attachment Plaques
7- Intermediate .F 8- Tonufilament



شکل ۶-۳۷. ساختمان یک دسموزوم: a). نمای سه بُعدی b). سازمان مولکولی

مواد در محکم‌کردن سلول‌ها کمک می‌کنند.

B – ***مهم‌ترین اختصاصات دسموزم کمربندی:***

- این نوع اتصال شامل یک صفحه متراکم است که به شکل کمربندی اطراف سطح بالایی غشاء سلول را احاطه می‌کند.
- فاصله بین دو سلول در این نوع اتصال در حدود nm ۹۰ - ۲۰ می‌باشد.
- رشته‌های بسیار ظریف آکتین (میکروفیلامنت‌ها) از شبکه انتهایی[1] موجود در سیتوپلاسم به داخل این

1- Terminal Web

صفحه متراکم کشیده می‌شوند و باعث اتصال رأس سلول و استحکام بیشتر آن می‌شوند.

- این نوع اتصال بیشتر در زیر اتصال محکم و در سلول‌های مخاط روده و عضلات مشاهده می‌شود.
- در بررسی با میکروسکوپ‌های الکترونی تا حدی شبیه به دسموزم صفحه‌ای است یعنی غشاء ضخیم به‌نظر می‌رسد و ماده رابط غلیظ است ولی معمولاً در آن رشته‌ها وجود ندارند.
- در این نوع اتصال قسمت‌هایی از دو غشاء مجاور به‌هم نزدیک شده و در نقاط مشخصی با هم ارتباط برقرار کرده و نوعی شبکه را تشکیل می‌دهند که در گسترش‌های تهیه شده به روش انجماد و خرد کردن به خوبی مشخص هستند.
- ماده بین دو سلول منطقه اتصال که در حقیقت فضای بین سلولی را تشکیل می‌دهد از ماده‌ای رشته‌ای که آرایشی نامنظم دارد به وجود آمده است. این ماده نقش نگهدارنده دو غشاء مجاور را به عهده می‌گیرد.

C – ***اتصال همی‌دسموزم (پل یکطرفه):***

- بین سلول‌های پوششی و غشاء پایه‌ای به ویژه در سلول‌های استوانه‌ای روده پدید می‌آید و ساختمان شبیه به نیمی از پل بین سلولی است که رشته‌های ظریف در سمت غشاء بازال وجود ندارد.

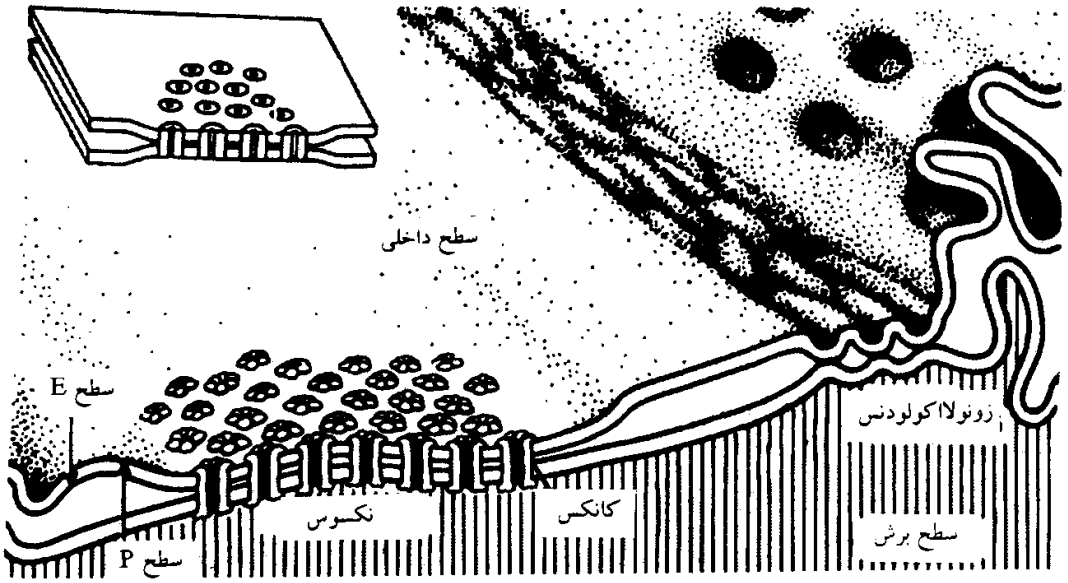
۳- اتصال‌های ارتباطی

که شامل دو نوع اتصال می‌باشد یکی اتصال باز (نکسوس) و دیگری اتصال سیناپسی

اتصال باز یا نکسوس (اتصال با روزنه[1])

- فاصله بین دو غشاء ۲ nm می‌باشد و به اشکال نواری، صفحه‌ای و یا نقطه‌ای شکل کوچک دیده می‌شود.
- این نوع اتصال بیشتر در بین سلول‌های کبد، لوزالمعده، مثانه، غدد فوق کلیه، عضلات صاف و استخوان متراکم دیده می‌شود.
- شامل اجسام ۶ ضلعی به قطر ۹۰ - ۷۰ آنگستروم می‌باشد که هر یک از این اجسام ۶ ضلعی دارای یک مجرای باریک مرکزی به قطر ۱۵ A° هستند که در فضای بین سلولی به‌هم ارتباط دارند، این مجاری باریک موجب ارتباط بین مواد بدون کوچک‌ترین تغییر از سلولی به سلول مجاور می‌شوند (شکل ۶-۳۸).
- این نوع اتصال می‌تواند در هر قسمت از طول غشاء جانبی اکثر سلول‌های اپی‌تلیال وجود داشته باشد ولی در بافت کبد، عدسی و عضله قلبی آنها را بهتر بررسی کرده‌اند.
- پروتئین اصلی تشکیل دهنده این نوع اتصال پلی‌پپتیدی است با وزن مولکولی ۲۶۰۰۰ تا D ۳۰۰۰۰۰. این پروتئین‌ها دارای یک سوراخ آب‌دوست در مرکز بوده و هر واحد آنها را کونکسون[2] گویند. کونکسون‌های غشاءهای سلولی مجاور در امتداد هم قرار می‌گیرند.
- پس از شکستن سلول در حالت یخ‌زده[3] تجمع ذرات داخل غشایی به‌صورت تکه‌های گرد در سطح P غشای پلاسمایی دیده می‌شود. وقتی که یک ردیاب خارج سلولی نظیر (هیدروکسید لانتانیوم) را مورد استفاده قرار می‌دهیم این ماده نمی‌تواند در تمامی فضاهای بین سلولی محل‌های اتصال‌های باز نفوذ نماید، مناطقی که ردیاب به آن وارد نشده توسط پروتئین‌هایی که سلول را به سلول مجاورش متصل می‌نمایند مسدود گشته است.
- بسیاری از سلول‌های بافت‌های مهره‌داران و بی‌مهرگان مستقل از یکدیگر نیستند و دارای ارتباطاتی بین سلولی می‌باشند که این امر باعث تبادل یون‌ها و مولکول‌های بزرگ‌تر می‌شود.

1- Gap Junction 2- Connexon 3- Freezing



شکل ۶-۳۸. شکلی شماتیک از فراساختمان اتصال‌های بین دو سلول کبدی که در آن اتصال‌های نکسوس (باز) نیز نشان داده شده است.

- پدیده مبادله توسط اتصال‌های باز به وسیله تکنیک‌های زیر مورد بررسی قرار گرفته است:

I. به دنبال تزریق داخل سلولی[1] مقدار کمی از رنگ‌ها با ترکیبات مختلف فلوئورسنت، مواد تزریق شده با آرامی به سلول‌های مجاور و از آنجا به سلول‌های دیگر می‌روند.

II. با قرار دادن میکرو الکترودهایی در داخل سلول‌های مجاور موجود در یک بافت مشخص می‌شود که یک جریان الکتریکی با مواجه شدن در برابر مقاومت بسیار ناچیز می‌تواند از بین سلول‌ها عبور کند. در برخی از حالات جریان در سلول مجاور دریافت نمی‌گردد.

بررسی دقیق این استثنائات نشان داده است که عبور جریان تنها هنگامی صورت می‌گیرد که اتصال‌های باز در میان سلول‌ها موجود باشند و زمانی که این اتصال‌ها موجود نیستند جریانی از بین سلول‌های مجاور عبور نمی‌نماید.

اندازه‌گیری‌های دقیق الکتریکی نشان داده‌اند که مقاومت، بین سلول‌های جدا از هم می‌باشد.

این نتایج از آنجا اهمیت دارند که ثابت می‌کنند اکثر بافت‌ها، صرفاً تجمع غیروابسته سلول‌ها نبوده بلکه همچون واحدهای یکپارچه‌ای عمل می‌کنند. ارتباطات سلولی طی رشد رویان پدیدار شده و احتمالاً در هماهنگی تکامل رویانی حایز اهیت هستند.

- اتصال‌های باز می‌توانند سریعاً بین سلول‌هایی که قبلاً از هم جدا شده‌اند به وجود آیند مهارکننده‌های متابولیک (به‌خصوص مواد مهارکننده فسفوریلاسیون اکسیداتیو) می‌توانند مانع از تشکیل این اتصال‌ها شده و یا حتی اتصال‌های بین سلولی رانیز تخریب نمایند؛ اتصال‌های جدید می‌توانند در غیاب ساخت پروتئین نیز ایجاد شوند.

در این حالت امکان دارد کونکسون‌ها از زیر واحدهایی که به مقدار زیاد در غشاءهای پلاسمایی پراکنده‌اند به وجود آیند.

یون‌ها، مولکول‌های کوچک و نوکلئوتیدها می‌توانند از سلولی به سلول دیگر مبادله شوند با مبادله یون‌ها اتصال الکتریکی بین سلول‌ها تأمین می‌شود و با مبادله یون‌ها و مولکول‌های ژنتیکی از جمله نوکلئوتیدها پیام‌های

1- Microinjection

مختلف بین سلول‌ها مبادله می‌شود که این پیام‌ها را نشان[1] (نشانه) گویند، با این نشانه‌ها عمل این سلول‌ها هماهنگ می‌شود ولی سلول‌هایی که سرطانی می‌شوند یا اتصال باز را ندارند و یا خیلی کم دارند در نتیجه پیام‌ها را از سلول‌های مجاور دریافت نمی‌کنند و شروع به تقسیمات بی‌کنترل کرده تومور ایجاد می‌کنند و به شکل سرطانی تظاهر می‌نمایند.

مولکول‌های کوچک محلول در آب مستقیماً از سیتوپلاسم یک سلول به سیتوپلاسم سلول دیگر بدون این که نیازی به عبور از فضای بین بافتی داشته باشند، انتقال می‌یابند. از این رو ارتباط مستقیم الکتریکی و متابولیکی بین سلول‌ها از طریق پل‌های دارای مجرا، برقرار می‌گردد.

عواملی که متابولیسم سلولی را مهار می‌کنند نظیر سرد کردن در ۸ درجه سانتیگراد یا دی‌نیتروفنل و یا اولیگومیلین، اتصال بین سلول‌ها را از بین می‌برند، این اتصال را می‌توان با تزریق ATP دوباره برقرار کرد.

اتصال‌های شکافدار به ویژه در جنین نقش مهمی را به عهده دارند. بسیاری از سلول‌ها در این هنگام با یکدیگر ارتباط الکتریکی برقرار می‌کنند. ظاهراً برقراری اتصال بین سلول‌های جنینی، پیش از آنکه گردش خون پا به عرصه وجود گذارد، در پراکنش مواد غذایی و یون‌ها نقش به عهده دارد. به‌طور مثال در جنین ماهی مرکب، سلول‌های زرده با دیگر سلول‌ها، ارتباط برقرار می‌کنند.

هنگام تمایز، سلول‌هایی که در ابتدا با سایر سلول‌های یک بافت و یا اندام ارتباط برقرار کرده بودند، از یکدیگر جدا می‌شوند. این امر نشان می‌دهد که هر بافت هنگام نمو رویانی، به‌تدریج هویت مستقلی برای خود کسب می‌کند. به‌طور مثال هنگامی که ناودان نخاعی در قورباغه به‌تدریج بسته می‌شود، سلول‌های آن از اکتودرم زیرین مجزا می‌شوند. در پاره‌ای موارد، سلول‌های جنینی به‌طور موقت میان خود ارتباط الکتریکی پدید می‌آورند. به‌طور مثال سلول‌های نارس ماهیچه (میوبلاست) اندکی قبل از آنکه با یکدیگر جوش خورده رشته‌های چندهسته‌ای را بسازند، پیوند الکتریکی پیدا می‌کنند. ظاهراً ارتباطات زودگذر الکتریکی، در حین نمو رویانی، روندی است که موجب می‌شود سلول‌ها ضمن نمو یکدیگر را شناسایی کنند و این شناسایی به منظور این که واکنش بین سلولی انجام پذیرد ضروری به‌نظر می‌رسد.

سیناپس

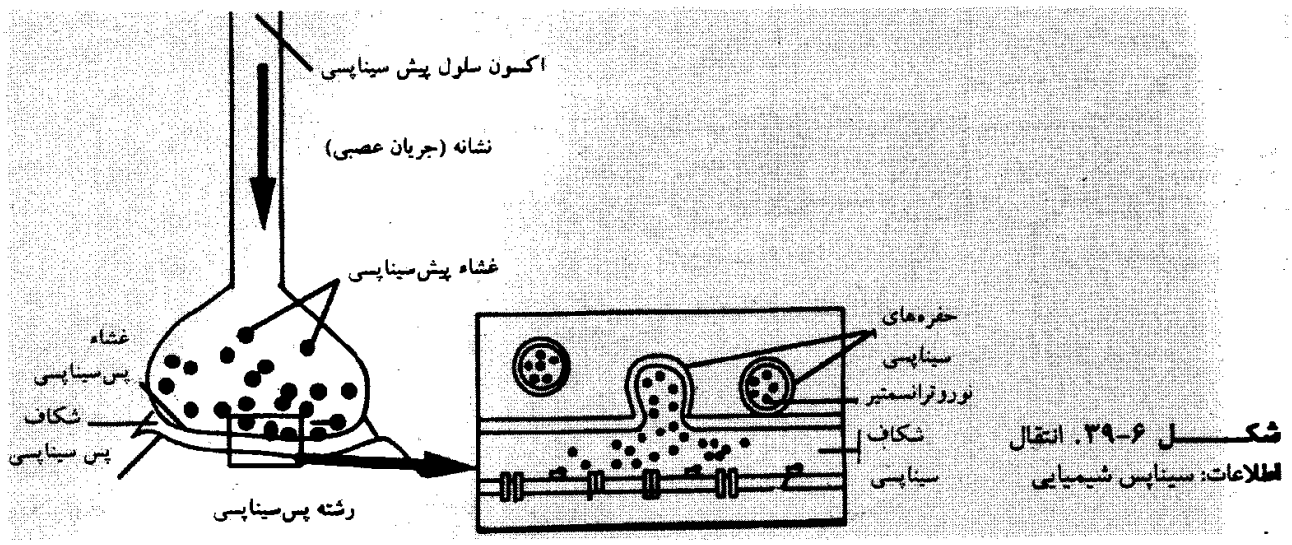
این واژه نخستین بار توسط شرینگتن[2] بکار رفت و در زبان لاتین به معنای در آغوش گرفتن است. برقراری ارتباط تنها نرون با نرون نیست بلکه نرون‌ها و سایر سلول‌ها نظیر سلول‌های بافت ماهیچه قلب، یاخته‌های وابسته به غدد، سلول‌های بافت جنینی و حتی بافت‌های گیاهی نیز به طرق مختلف بین خود ارتباط الکتریکی برقرار می‌کنند که جزیی از اتصال‌های سلولی به حساب می‌آیند. اما بیشترین دانش در قلمرو سیناپس کلاسیک است که به آن سیناپس شیمیایی اطلاق می‌شود و در برابر سیناپس الکتریکی قرار دارد.

در سیناپس چند جزء شرکت‌کننده قابل تشخیص است که عبارتند از: منطقه پیش سیناپسی، شکاف سیناپسی، منطقه پس سیناپسی (شکل ۶-۳۹).

در سیناپس شیمیایی ماده‌ای به نام ناقل عصبی[3] عامل انتقال پتانسیل الکتریکی به حساب می‌آید. در مقابل در سیناپس‌های الکتریکی ناقل وجود ندارد و عبور جریان الکتریسیته الزاماً تابع قطبیت نیست.

در پاره‌ای از سیناپس‌های الکتریکی، در منطقه‌ای که تبادل جریان الکتریسته صورت می‌گیرد، تغییرات غشایی

1- Signal 2- Shorrington 3- Neurotransmission



شکل ۶-۲۹. انتقال اطلاعات: سیناپس شیمیایی

به‌صورت اتصال‌های ویژه، تولید گردیده، فضای میان بافتی موجود از میان رفته است دو سلول از راه تولید کانال‌هایی با یکدیگر ارتباط برقرار می‌کنند.

در سلول‌های بافت عضله قلب، انتشار پتانسیل الکتریکی از طریق نکسوس[1] یا اتصال شکافدار صورت می‌گیرد. در بافت جنین، نرون‌ها در یافتن و برقراری ارتباط دقت شگفت‌انگیزی از خود نشان می‌دهند. به‌طور کلی سیناپس‌های شیمیایی از پیچیدگی بیشتری نسبت به سیناپس‌های الکتریکی برخوردارند. در سیناپس‌های شیمیایی، عرض شکاف سیناپسی را میان ۲۰ الی ۳۰ نانومتر و سطح تماس دو غشاء را یک الی دو میکرومتر تعیین کرده‌اند. ارقام یاد شده به‌طور عمده مربوط به سیناپس‌های شیمیایی موجود در نرون‌های مغزی است که از سطح تماس نسبی کمتری برخوردار هستند. حال آن که سطح تماس در سیناپس‌های محیطی از این مقدار بیشتر است. به‌طوری که در اتصال عصب - ماهیچه قورباغه طبق پژوهش‌های برناردکتس[2]، بین ۲۰۰۰ الی ۶۰۰۰ میکرون مربع و عرض شکاف سیناپسی ۵۰ الی ۶۰ نانومتر تخمین‌زده می‌شود.

ماهی الکتریکی وسیله مناسبی برای پژوهش سیناپسی است زیرا هر ماهی از وجود یک جفت اندام ویژه الکتریکی برخوردار است اندام‌های ویژه، جریانی از الکتریسیته به‌صورت انفجاری پدید می‌آورند که می‌تواند شکار و دشمن را میخکوب کند. این اندام از مجموعه بیشماری سیناپس‌کلینرژیک به وجود آمده است؛ کار کردن و ثبت نتایج به دلیل سادگی سیستم به سهولت انجام‌پذیر است.

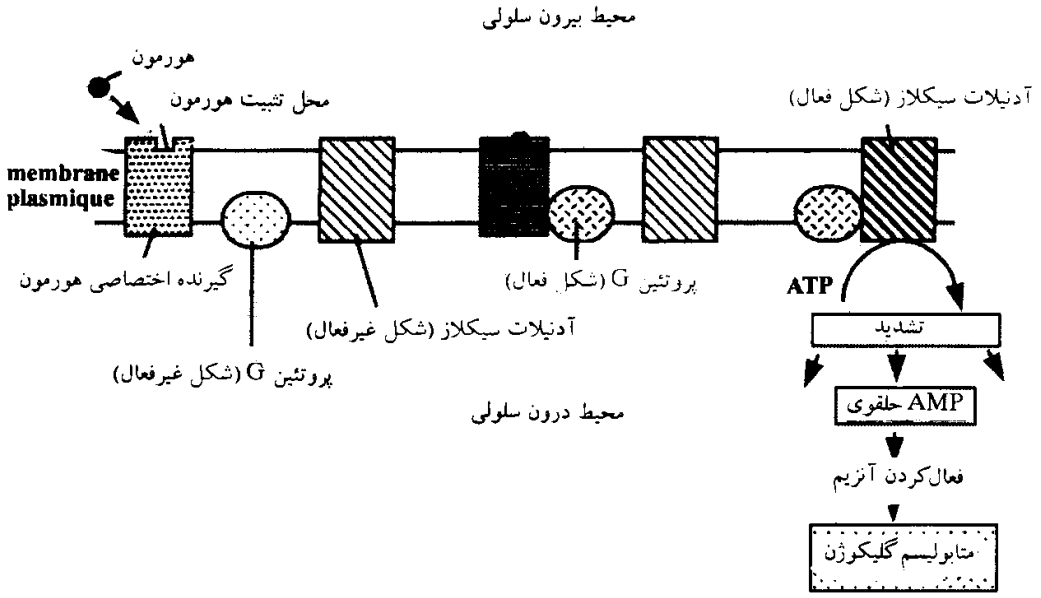
هر یک از دو اندام الکتریکی در یک ماهی یک‌ونیم کیلویی ۱۵۰ گرم وزن دارد.

هر اندام تقریباً از ۴۰۰ منشور تشکیل یافته است.

هر منشور از شماری سلول‌های پهن نازک زیر عنوان الکتروپلاک تشکیل می‌یابد. اتصال سیناپسی در الکتروپلاک‌ها وجود دارد و از این رو مولد الکتریسیته به حساب می‌آیند.

تعداد سیناپس‌ها را در هر یک از دو اندام الکتریکی بالغ بر پانصدمیلیارد عدد می‌دانند. سلول‌های سازنده الکتروپلاک، به هنگام نمو جنینی با از دست دادنِ پروتئین‌های انقباضی، از سلول‌های ماهیچه پدید می‌آیند. لازم به تذکر است که یک سمت چنین سلول‌های تخصص یافته‌ای، ارتباط عصبی دارد، در حالی که سمت دیگر فاقد این ارتباط است. از این رو با نشستن استیل کولین بر روی گیرنده‌ها، تنها سمتی که مجهز به گیرنده باشد در معرض پلاریزاسیون قرار می‌گیرد، در حالی که پتانسیل غشاء در سمت دیگر، دست نخورده باقی می‌ماند. لذا پتانسیل غشاءِ

1- Neuxus 2- Bernard Kats



شکل ۶-۴۰. غشاء پلاسمایی وهدایت پیام با انتقال هورمونی

سمت گیرنده از ۹۰- به ۴۰+ میلی‌ولت یعنی ۱۳۰ میلی‌ولت تغییر می‌کند. در حالی که غشاء سمت بدون گیرنده در حد ۹۰- میلی‌ولت باقی می‌ماند.

از نقش‌های مهم دیگر پلاسمالم در هدایت نشانه‌ها، دخالت آن در انتقال پیام‌های هورمونی است. شکل ۶-۴۰ چگونگی هدایت هورمونی مثل آدرنالین را نشان می‌دهد.

میکروویلی‌ها

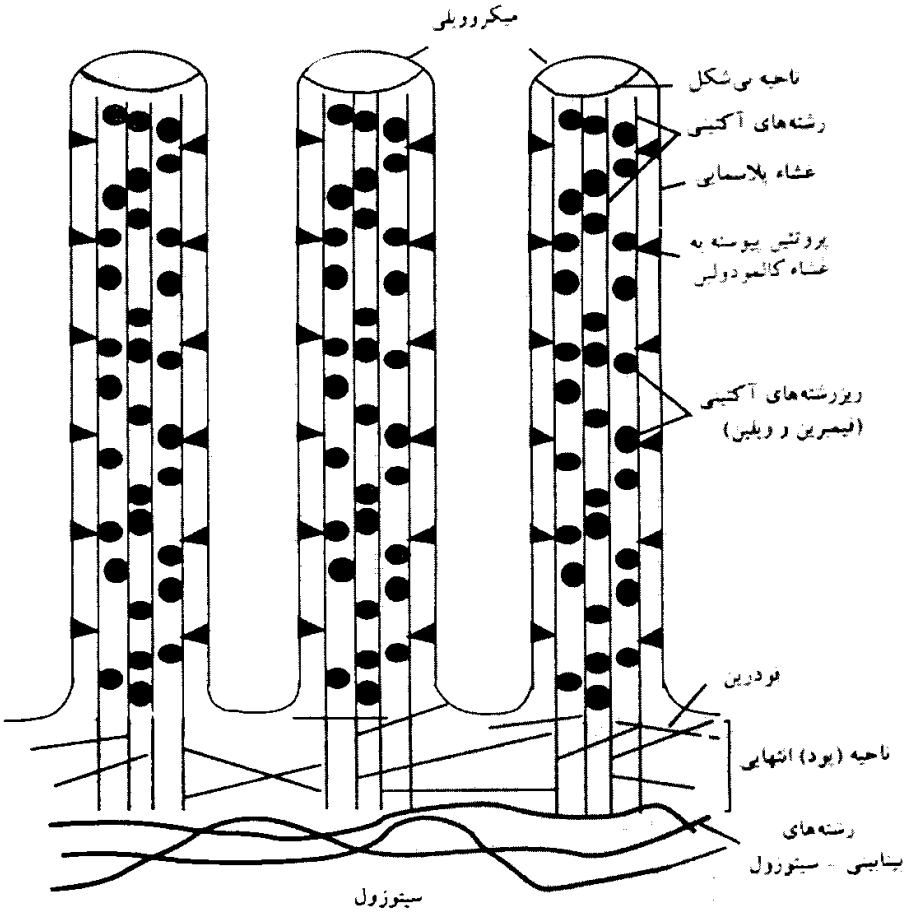
از تمایزهای دیگر سطح سلول‌ها، تشکیل میکروویلی‌ها است. هر میکروویلی به‌صورت برآمدگی (چین‌خوردگی) غشایی به اندازه حدود ۰/۸ تا ۱ میکرومتر است که درون آن به وسیله دنباله سیتوزول پر شده است و در آن تعدادی رشته‌های نازک و سخت آکتینی (ریز رشته‌های آکتینی) در جهت طول میکروویلی قرار گرفته‌اند.

ریز رشته‌های آکتینی به‌صورت دستجاتی موازی با هم به وسیله فیمبرین[1] و ویلین[2] به‌هم پیوسته‌اند. تثبیت ویلین با واسطه یون‌های کلسیم است و در نتیجه موجب پایداری میکروویلی‌ها می‌شود. پروتئین دیگر ۱۱۰ کیلودالتونی وابسته به کالمودولین نیز پل‌هایی را با غشاء پلاسمایی پوشاننده میکروویلی‌ها برقرار می‌کند. در بخش‌های عمقی‌تر، فودرین[3] نیز دستجات ریز رشته‌های آکتینی را به‌هم متصل می‌کند (شکل ۶-۴۱).

میکروویلی‌های در سطح آزاد عده‌ای از سلول‌های لوله گوارش به ویژه سلول‌های روده باریک به طرف فضای درونی روده تشکیل می‌شوند. در حد فاصل میکروویلی‌ها اغلب فرورفتگی‌های غشایی دیده می‌شود که حکم غربال تغذیه‌ای را دارند و از محل آنها مواد غذایی گوارده شدهٔ درون روده باریک به مقدار قابل توجهی به سلول‌ها نفوذ می‌کند. در زیر محل میکروویلی‌ها در سلول، رشته‌های سخت آکتینی عمود بر محور طولی میکروویلی‌ها کشیده شده‌اند که استحکام بخش انتهایی سلول و پایداری میکروویلی‌ها را زیاد می‌کنند. در مجاورت میکروویلی‌ها در درون سیتوزول سلول میتوکندری‌ها فراوانند تا بتوانند انرژی لازم برای جذب فعال مواد به وسیله میکروویلی‌ها را تأمین کنند.

پوشش گلیکوپروتئینی «گلیکوکالیکس» سطح پلاسمالم بر روی سطح میکروویلی‌ها ضخیم‌تر است و به بیش از ۱۰

1- Fimbrine 2- Villine 3- Fodrine



شکل ۶-۴۱. نمایی از سازمان میکروویلی‌های سلولی پوششی روده باریک مهره‌داران

تا ۲۰ نانومتر می‌رسد. در درشت‌نمایی‌های بالا با میکروسکوپ‌های الکترونی دارای دو بخش است: بخش ذره‌ای و بخش رشته‌ای. بخش ذره‌ای (دانه‌ای) عمقی که با پلاسمالم به‌صورت فشرده‌ای متصل است. بخش قابل توجهی از بخش ذره‌ای، ذرات مالتاز هستند که قند مالتوز را به یک مولکول گلوکز و یک مولکول گالاکتوز هیدرولیز می‌کنند، بنابراین هیدورلیز بخشی از دی‌ساکاریدها در حد بخش ذره‌ای «گلیکوکالیکس» انجام می‌شود. بخش رشته‌ای سطحی‌تر است و از رشته‌های بسیار ظریف و کوچک کشیده شده به سوی فضای درونی روده تشکیل شده است (شکل ۶-۳۶).

تعداد میکروویلی‌ها در سطح آزاد سلول‌های روده باریک بسیار زیاد است، وجود و فراوانی آنها سطح تماس غشاء سلول‌ها را با مواد قابل جذب به مقدار وسیعی می‌افزاید بنابراین به جذب غذا کمک زیادی می‌کند.

شناسایی سلول

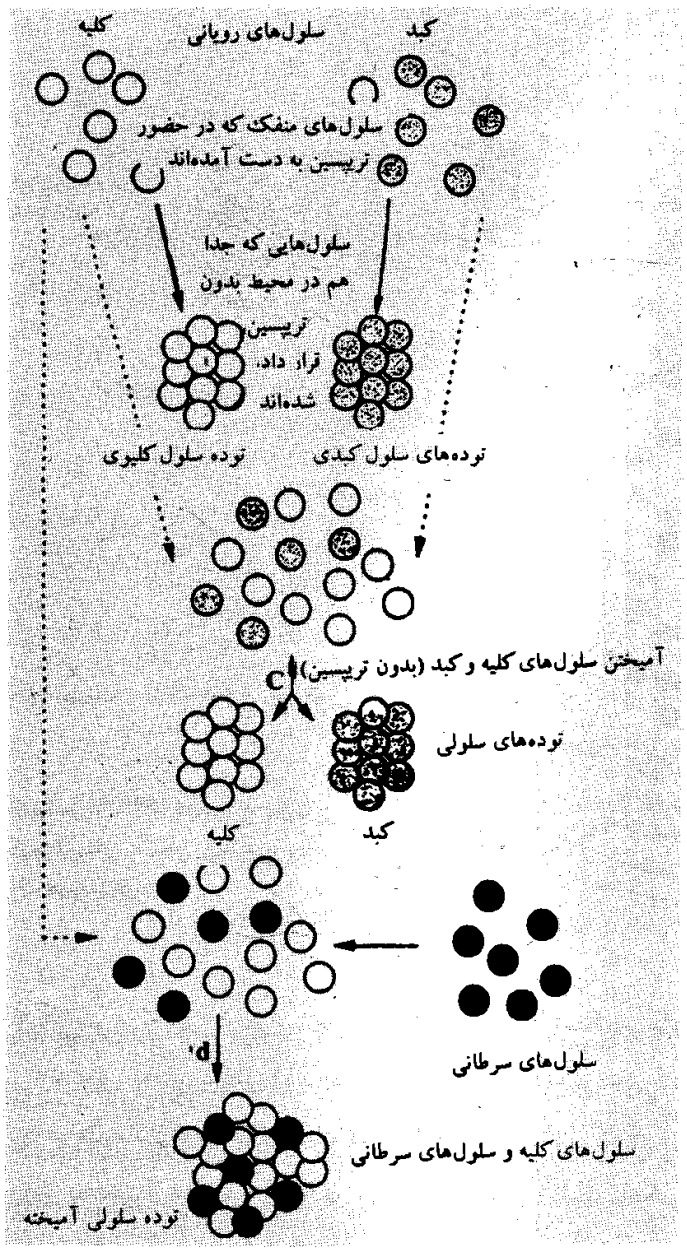
یکی از سؤالات مهم کنونی در زیست‌شناسی سلولی و مولکولی این است که سلول‌ها چگونه یکدیگر را شناسایی می‌کنند؟ گرچه پاسخ این سؤال شرح طولانی لازم دارد اما به کمک تجربه‌ای ساده می‌توان نشان داد که سهم مهمی از شناسایی سلول - سلول به ویژگی‌های سطح پلاسمالم وابسته است.

توده‌های سلولی رویانی از نوع سلول‌های کلیوی تحت تأثیر تریپسین که سیمان پروتئین بین سلولی را هضم می‌کند و با حضور EDTA (اتیلن - دی‌آمین‌تترااستات) که یک جداگر کلسیم است قرار گرفته و به‌صورت سلول‌های منفک در آمده‌اند. سلول‌های منفک در غیاب تریپسین شروع به تجمع کرده و توده‌های سلولی را به وجود آورده‌اند (شکل ۶-۴۲، a). این وضعیت نشان می‌دهد که سلول‌ها در سطح خود سیستمی دارند که امکان شناسایی تجمع دوباره آنها را فراهم می‌سازد. همین تجربه به صورتی مشابه با سلول‌های رویانی کبدی انجام شده

است (شکل ۶-۴۲، b).

پس از جداسازی دو نوع سلول مذکور، سلول‌های کلیوی و کبدی مخلوط شده و در محیط فاقد تریپسین قرار گرفته‌اند، توده‌های سلولی جدا از همی از هر یک از دو تیپ سلول‌های کبدی و سلول‌های کلیوی ایجاد شده است. این وضع نشان می‌دهد که شناسایی سلولی تنها برای سلول‌های هم نوع انجام شده است. یعنی: بازشناسی سلولی اختصاصی است (شکل ۶-۴۲، c).

سلول‌های منفک شده کلیوی با سلول‌های تبدیل شده (سلول‌های سرطانی) آمیخته شده و در محیطی بدون تریپسین قرار داده شده‌اند. توده‌های سلولی که مخلوطی از سلول‌های کلیوی و سلول‌های سرطانی بوده‌اند به‌دست آمده که در آنها سلول‌های سرطانی به‌طور تصادفی در توده سلولی پراکنده شده‌اند (شکل ۶-۴۲، d). این تجربه نشان می‌دهد که سلول‌های سرطانی شده توانایی بازشناسی اختصاصی و برقراری اتصال‌های سلولی اختصاصی را از دست داده‌اند.



شکل ۶-۴۲. تجربه مشخص‌کننده اختصاصی بودن شناسایی و تجمع سلول‌ها

دیوارهٔ سلول‌های گیاهی

مقدمه و تاریخچه

اطراف اکثر سلول‌های گیاهی به وسیله پوششی محکم، قابل نفوذ با زیر بنای ساختمانیِ پلی‌ساکاریدی پوشیده شده است که آن را دیوارهٔ اسکلتی نامند. آنتروزوئیدها، سلول‌های موجود در کیسه رویانی گیاهان، میکسومیست‌ها، میکسامیب‌های قارچ‌ها و نیز ریسه‌های برخی جلبک‌ها از سلسله آغازیان دیواره اسکلتی ندارند.

در بین اولین تحقیقات بر روی دیواره، هنشاو[1] (۱۶۶۱) برای اولین‌بار وجود دیواره‌های سلولی در آوندهای چوبی‌را مطرح کرده است اما در واقع برای اولین بار هوک[2] در ۱۶۶۷ موفق به مشاهده میکروسکوپی دیواره اسکلتی شد و آن را به‌عنوان سلول درنظر گرفت.

1- Henschaw 2- Robert Hook

مالپیگی[1] وجود انواع مختلفی از دیواره اسکلتی را مطرح ساخت. به‌نظر می‌رسد مالپیگی وگری[2] اولین زیست شناسانی هستند که به اهمیت دیواره‌های سلولی در ساخت و کار سلول‌های زنده توجه کرده‌اند. به کمک پژوهش‌های این محققان مقدمات «نظریه رشته‌ای» فراهم شد که در نهایت به وسیله وان هالّر[3] در ۱۷۵۷ ارائه گردید. هالّر چنین پنداشت که سلول به وسیله پوشش محکمی احاطه شده و درون آن از مایعی چسبنده پر شده است.

والف[4] در ۱۷۵۹ بررسی‌های شیمیایی را در مورد دیواره آغاز کرده است. او و سپس میربل[5] (۱۸۰۹) چنین پنداشته‌اند که بخش‌های بسیار جوان گیاه از یک ژل شفاف درست شده است که بتدریج با تثبیت شیره غذایی به‌صورت سلول‌های سازمان یافته تکامل می‌یابد؛ تراکم این ژل منشاء دیواره است و امکان می‌دهد سلول‌ها همدیگر را بین خود بگیرند. از همبستگی سلول‌ها، بافت‌ها به وجود می‌آیند. بررسی بافت‌ها از سال ۱۸۰۰ مورد توجه بیشا[6] قرار گرفت. مولدن‌هاور[7] در ۱۸۱۲ با ساییدن قطعاتی از اندام‌های گیاهی موفق به جدا کردن سلول‌ها و به‌دست آوردن سلول‌های منفرد (سلول‌های منفک) گیاهی شد و نشان داد که هر سلول دارای دیواره‌ای مستقل است نه آن که همانند پندارهای گذشته سلول‌ها تنها به‌صورت حفره‌ای کنده شده در یک توده همگن زمینه‌ای باشند. به این ترتیب دیواره به‌عنوان یکی از اجزای ساختمانی سلول منظور شد که عمل اصلی آن جدا کردن درون سلول از محیط خارج و ایجاد شکل خاص هر سلول است.

در سال‌های اخیر با به کارگیری میکروسکوپ‌های الکترونی و نیز استفاده از روش‌های نوین سیتوشیمی و تیمارهای شیمیایی و آنزیمی بر روی دیواره آگاهی‌های زیادی در مورد فراساختمان، ترکیب شیمیایی، خاستگاه، طرز رشد طولی و قطری و تمایز دیواره در سلول‌های مختلف به‌دست آمده است. همچنین اطلاعات جالبی در مورد وجود و نقش آنزیم‌ها در دیواره با ایمنی سلول‌های گیاهی و مانند آن کسب شده است که در بخش‌های آینده بررسی خواهد شد.

ترکیب شیمیایی دیواره اسکلتی

مطالب عمومی: ترکیب شیمیایی دیوارهٔ اسکلتی آشکارا به درجهٔ تکاملی گیاه مورد مطالعه بستگی دارد. به‌طور کلی دیوارهٔ اسکلتی هر جا وجود دارد محصولی از تجمع پلی‌ساکارید مختلف به همراه موادی مثل پروتئین‌ها (به مقدار کم) یا مختصری لیپیدها است. از آنجا که مشابه چنین ترکیباتی بر سطح سلول‌ها جانوری نیز کم‌وبیش قابل تشخیص است، بنت[8] پوشش گلوسیدی سطح سلول‌های را گلیکوکالیکس[9] نامید. در گیاهان پیشرفته مواد اصلی دیواره پکتین‌ها، همی‌سلولزها، سلولزها و چوب است، مقدار کمی پروتئین‌های ساختمانی و آنزیمی و گاه مقداری کالوز نیز در این دیواره‌ها دیده می‌شود. مواد اصلی دیواره‌ای در ساختمان دیواره اسکلتی عده‌ای از گیاهان ساده‌تر نیز وجود دارد. حتی عده‌ای از جلبک‌های سبز و برخی از جلبک‌های قرمز دارای سلولزند اما بسیاری از جلبک‌ها در دیوارهٔ خود گلزیلان‌ها و مانّان‌ها را دارند. عدهٔ دیگری از جلبک‌ها در دیوارهٔ سلول‌های خود موکوپپتید دارند که به ویژه از مواد سازنده دیواره باکتری‌هاست. قارچ‌ها بیشتر دارای کیتین هستند و گاه نیز کالوز دارند. در دیوارهٔ باکتری‌ها علاوه بر موکوپپتیدها، لیپوپلی‌ساکاریدها و فسفولیپو پروتئین‌ها وجود دارد.

به این ترتیب هیچ یک از ترکیبات دیواره در واقع به یک گروه خاص تعلق ندارد. در این بحث به بررسی ترکیب شیمیایی دیواره در گیاهان پیشرفته می‌پردازیم و به اختصار در مورد دیواره در جلبک‌ها، قارچ‌ها و باکتری‌ها نیز بحث خواهیم کرد.

1- Malpigie 2- Grey 3- Van Haller 4- Walff 5- B.Mirbele
6- Bichat 7- Moldenhaver 8- benntt 9- glycocalix

گسترش اطلاعات در مورد ترکیب شیمیایی دیواره با گسترش کاربرد میکروسکوپ‌های الکترونی و استفاده از فیسکاتورهای مختلف (پرمنگنات‌پتاسیم، آلدئیدفرمیک، آلدئیدگلوتاریک، اسمیوم) و رنگ‌کننده‌هایی چون استات‌اورانیل، سیترات‌سرب، تیوکاربوهیدرازید[1] (TCH) و پروتئینات نقره بستگی داشته است. به کارگیری روش‌های نوین با استفاده از تیمارهای آنزیمی یا حل برخی ترکیبات دیواره‌ای توسط حلال‌های شیمیایی اطلاعات جدیدی را در مورد ترکیبات شیمیایی دیواره به‌دست داده است.

به کارگیری روش‌های ایمنولوژی و استفاده از پادتن‌ها به همراه روش فلوئورسانس نیز آگاهی‌های بسیار پیشرفته‌ای را در مورد ترکیب شیمیایی دیواره اسکلتی به‌دست داده است.

در گیاهان پیشرفته، برخی جلبک‌ها و عده‌ای از قارچ‌های ابتدایی دیواره اسکلتی به‌طور عمده از سلولز و ترکیبات پکتیکی ساخته شده است (دیواره پکتوسلولزی) اما در گروه‌های مختلف آغازیان تا گیاهان پیشرفته تفاوت‌های عمده‌ای در ترکیب دیوارهٔ اسکلتی مشاهده می‌شود.

به‌طور کلی موادی را که در ساختمان دیوارهٔ اسکلتی گیاهان پیشرفته وجود دارد به دو گروه مواد زمینه‌ای[2] و بخش سلولزی تقسیم می‌کنند.

مواد زمینه‌ای دیواره شامل ترکیبات پکتیکی، همی‌سلولزها و پروتئین‌ها هستند. در برخی سلول‌ها مثل سلول‌های بافت اسکلرانشیم مقدار قابل توجهی چوب[3] نیز به مواد زمینه‌ای دیواره اسکلتی افزوده می‌شود و بالاخره برخی دیواره‌ها مثل محل منافذ در سلول‌های آبکشی دارای مقداری کالوز می‌باشد.

سلولزها: سلولزها درشت مولکول‌های گلوسیدی (پلی‌ساکاریدی) هستند که از ترکیب n مولکول β گلوکز با اتصال‌های ازیدی ۴ ← ۱ به وجود آمده‌اند. در مولکول سلولز مولکول‌های β گلوکز نسبت به همدیگر چرخش ۱۸۰ درجه‌ای دارند. ضمن برقراری اتصال بین دو مولکول β گلوکز از OH متصل به کربن ۴ یک مولکول و OH کربن ۱ مولکول بعدی، یک مولکول آب جدا می‌شود و پل اکسیژنی برقرار می‌گردد (شکل ۶-۴۳، د). از سوی دیگر در مولکول سلولز امکان برقراری پیوندهای هیدروژنی نیز وجود دارد. این پیوندها در شکل (۶-۴۳، ه) با نقطه‌چین مشخص شده است (پیوندهای هیدورژنی درون مولکولی).

پیوستن دو مولکول βگلوکز موجب تشکیل یک مولکول سلّوبیوز می‌شود (شکل ۶-۴۳، ج).

بر بنای تصورات قبلی هر ۵ مولکول سلوبیوز با آرایش فضایی مکعّبی شکل، بلور سلولز را به وجود می‌آورند و از مجموعه بلورهای سلولز، رشته ابتدایی یا میسل سلولزی تشکیل می‌شود. مجموعه‌ای از میسل‌ها، میکروفیبریل سلولزی را به وجود می‌آورند که قطری حدود ۲۵ نانومتر دارد.

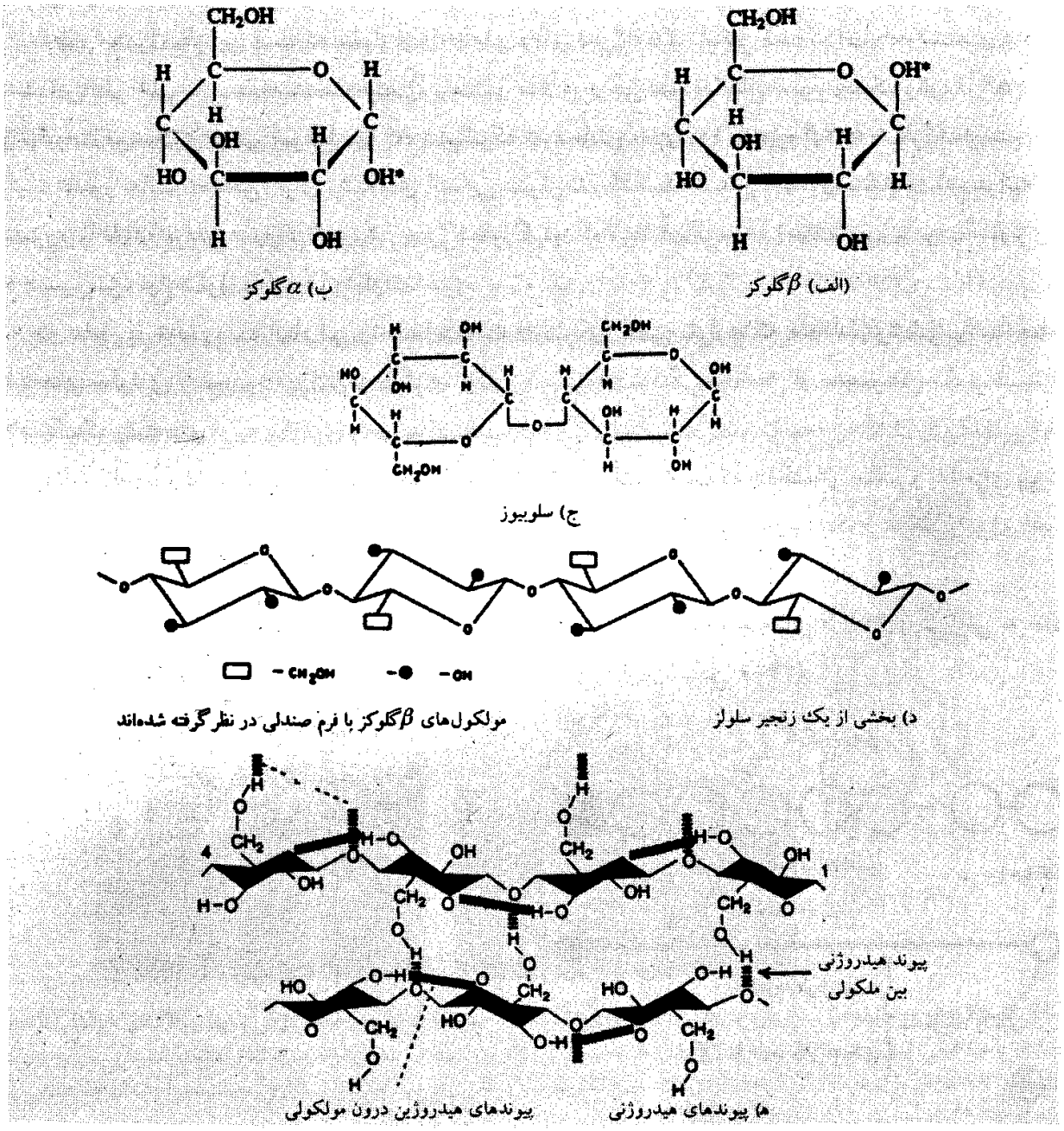
از مجموع حدود ۲۰ میکروفیبریل، ماکروفیبریل سلولزی تشکیل می‌شود. سطوح مختلف سازمان یافتگی سلولز تا حدّ ماکروفیبریل سلولزی در طرح زیر مشخص شده است:

βگلوکز ← سلّوبیوز ← بلورسلولز ← رشته ابتدایی (میسل) ← میکروفیبریل ← ماکروفیبریل

با آگاهی‌های کنونی می‌دانیم که مولکول سلولز قطبی است، دارای یک سر با عامل آلدئیدی موجود بر روی کربن شمارهٔ ۱ (C_1) اولین قند است. این سر احیاکننده است سر دیگر، سر C_4 آخرین گلوکز است که احیاکننده نیست. محل واکنش و اثر آنزیم‌های طویل‌کننده مولکول سلولز (سلولز سنتتازها) و نیز اتصال عده‌ای از آنزیم‌های هیدرولیزکنندهٔ سلولز (سلولازها) همین ناحیه C_4 است.

نوع اتصال‌های کووالان C_4 ← C_1 موجب می‌شود که سایر هیدروکسیل‌های موجود بر روی کربن‌های هر گلوکز

1- Thiocarbohydraside 2- matrix 3- Lignine



شکل ۶-۴۳. الف) β گلوکز، ب) α گلوکز، ج) سلوبیوز، د) نمای کلی بخشی از یک مولکول سلولز، ه)پیوندهای هیدروژنی

آزاد بماند. این عوامل خاستگاه دو نوع اتصال هیدروژنی هستند:

الف - اتصالات هیدروژنی درون زنجیره‌ای که مولکول را در آرایش خطی خود پایدار ساخته و به آن تا حدی استحکام می‌بخشند.

ب - اتصالات هیدروژنی بین زنجیره‌ای که موجب می‌شوند مولکول‌های بسیار طویل سلولزی نسبت به‌هم به وضع موازی قرار گیرند و به این ترتیب دستجاتی بسیار پایدار و کدر را به وجود آورند. این دستجات به وسیله پیوندهای سست اما به تعداد زیاد به‌هم مربوط هستند. این وضعیت تجمع موازی مولکول‌های سلولز در سه جهت فضا را ریزبلور (میکروکریستال) یا بلور (کریستال) سلولز نامند که موجب انکسار مضاعف نور پلاریزه و نیز پراش پرتوهای X و الکترون‌ها می‌شود.

قطر بلور سلولز و بنابراین تعداد مولکول‌های سلولزی که با پیوندهای هیدروژنی به‌هم پیوسته و بلور سلولز را

تشکیل می‌دهند، در گونه‌های مختلف و حتی در سلول‌های بافت‌های مختلف یک گونه متفاوت است.

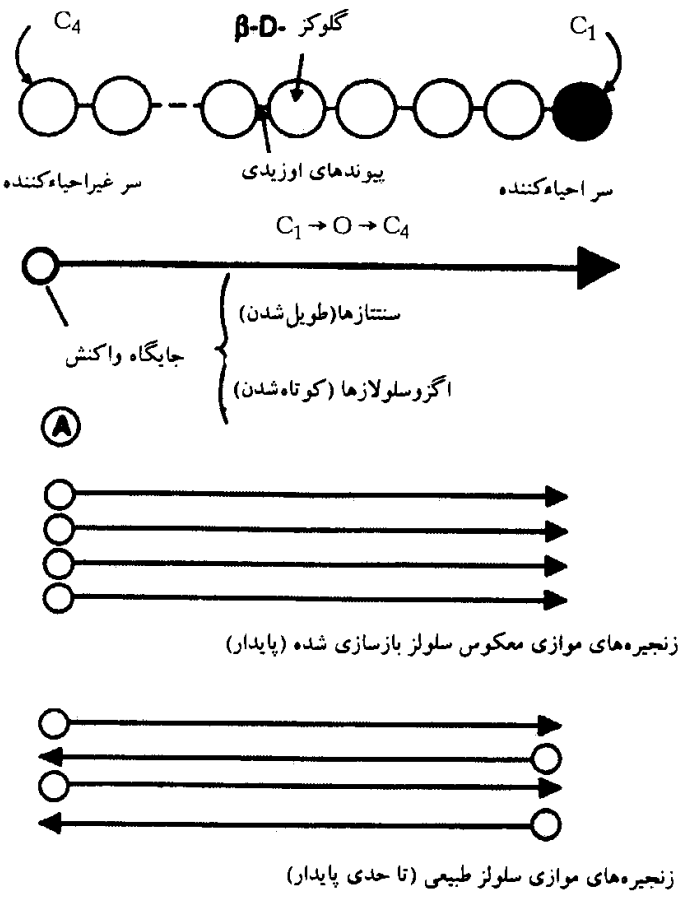
به‌طور معمول نظر این است که سلولز از واحدهای دارای قطر ۳۵ A° تشکیل شده که آنها را «رشته‌های ابتدایی» نامند. این قطر اغلب درست است اما «حتمی» نیست و مثلاً در برخی نمونه‌ها مثل سلولز جلبک والونیا[1] ۳۰۰ A° و در ترکیبات موسیلاژی برخی میوه‌ها تنها ۱ A° است که خود دارای حدود ۱۰ زنجیره β ۴ ← ۱ گلوکان است. به این ترتیب تصور حالت «همگن» برای رشته‌های ابتدایی سلولز کنار گذاشته شد و اشکال مختلف (استوانه‌ای - منشوری با قاعده مربعی - روبان کم‌وبیش پهن) منظور گردید که ابعاد آنها با درجه (میزان) بلوری بودن سلولز و نیز به حسب سن، نوع سلول و گونه‌ها متفاوت است.

دو عامل در محدودیت ابعاد این واحدها دخالت دارد: یکی همی‌سلولزها که همانند پوششی رشد جانبی رشته‌های سلولزی را محدود می‌کنند و دیگری آرایش یا سازمان یافتگی حاصل از مجموعه سلولز سنتتازی پلاسمالم که رشته‌های اولیه سلولزی را می‌سازد.

به‌طور کلی سلولز، درشت مولکولی خطی (بدون انشعاب جانبی) است که ساختمانی منظّم و با اجزای پیوسته به‌هم دارد (همانند کی کابل)، کدر است، در برابر تیمارهای آنزیمی و شیمیایی مقاوم است و به خوبی برای اعمال مکانیکی (نیروهای کشش) سازگاری دارد.

در سلولز طبیعی که در ساختمان دیواره اسکلتی سلول‌ها وجود دارد زنجیره‌های β ۴ ← ۱ گلوکانی به حالت موازی ولی در سلولز مصنوعی[2] به حالت موازی معکوس[3] قرار دارند (شکل ۶-۴۴).

آرایش موازی معکوس رشته‌ها مقاومت و پایداری مکانیکی بیشتری دارد.



شکل ۶-۴۴. نزدیک‌شدن و کنار هم قرارگرفتن زنجیره‌های سولزی هر پیکان در جهت سر احیاکننده زنجیر کشیده شده است.

1- Valonia

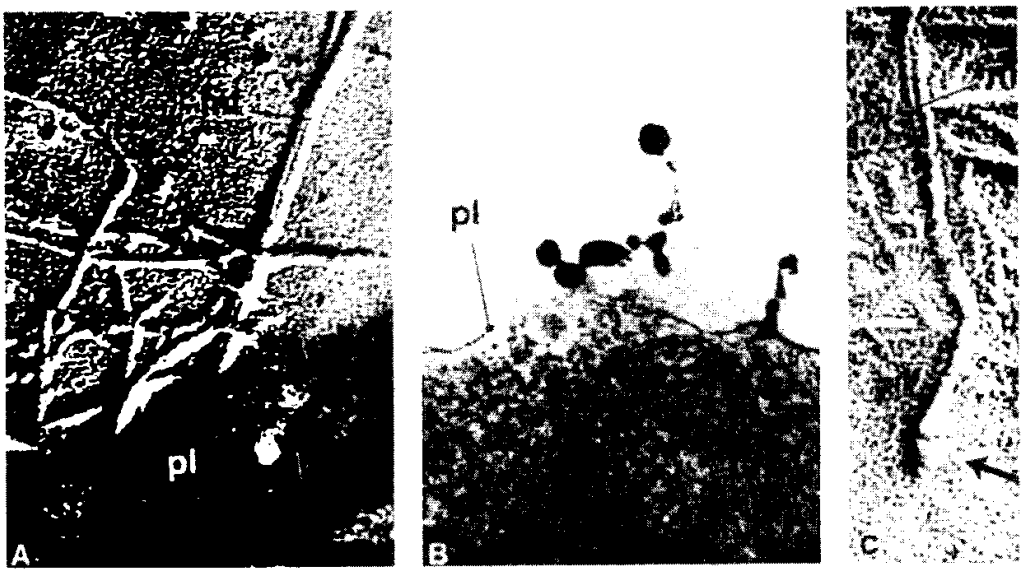
۲- سلولز مصنوعی در نتیجه آنزیم‌های اگزوسلولاز بر میکروفیبریل‌های سلولزی، تفکیک رشته‌های ۴ ← ۱ گلوکانی و سپس با حذف آنزیم و خودآرایی مجدد این رشته‌ها در شرایط آزمایشگاهی ایجاد می‌شود. (مؤلف)

3- anti parallel

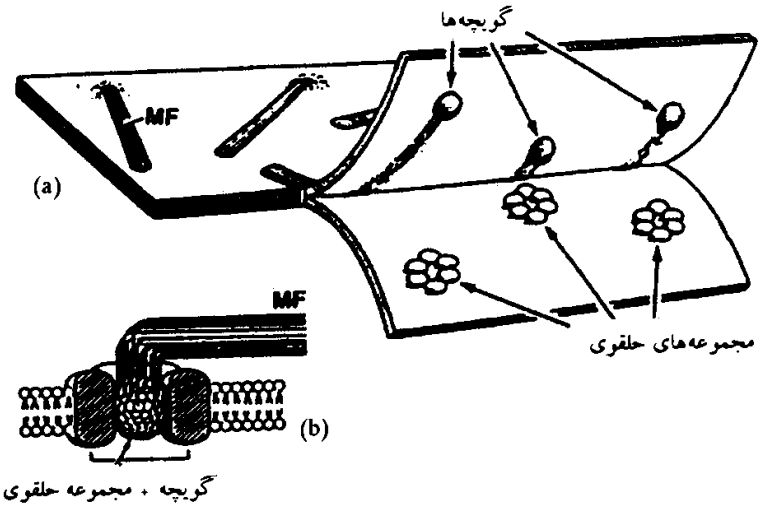
تولید و تجزیه زیستی سلولز

مجموعه پژوهش‌هایی که در مورد چگونگی بیوسنتز سلولز انجام شده است، نشان می‌دهد که پیش‌ساز از سلولز یوریدین‌دی‌فسفوگلوکز (UDPG) است که به وسیلهٔ حفره‌های گلژی به مجموعه‌های آنزیمی سلولز سنتتازی موجود در غشاء سلولی می‌رسد. با دخالت این مجموعه‌های آنزیمی از پلیمریزاسیون مولکول‌های UDP − G، مولکول‌های سلولز تشکیل می‌شود.

به کارگیری روش انجماد و شکستگی یا روش انجماد و برش دهی وجود گویچه‌هایی را بر برگه درونی غشاء نشان داده است (D.Delmer، ۱۹۸۷) (شکل ۶-۴۵). نظر کنونی این است که این گویچه‌ها و ساختمان‌های روزتی بر روی هم نشان دهندهٔ مجموعهٔ سلولز سنتتازی پلاسمالم است که موجب تشکیل مولکول‌های سلولز از پلیمریزاسیون مولکول‌های UDP − G می‌باشد (شکل ۶-۴۵). به کارگیری گلوکز تریسیوم‌دار و استفاده از روش خود پرتونگاری نشان می‌دهد که بخش‌های در تماس با پلاسمالم به شدت رادیواکتیو می‌شوند (شکل ۶-۴۶).



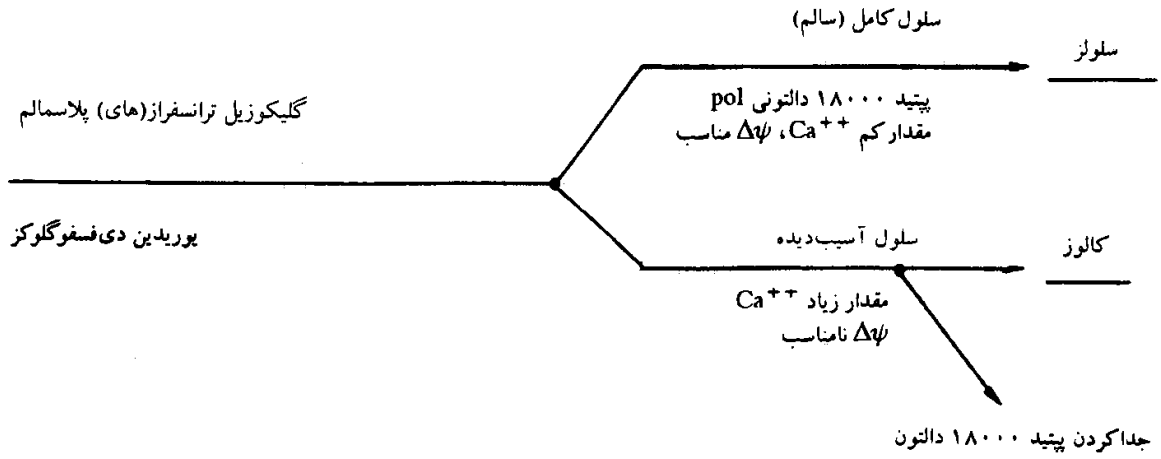
شکل ۶-۴۵. خروج سلولز a) میکروفیبریل‌های mf، در پری‌پلاسم با یک سر فشرده شده در غشاء pl فن سایه‌زنی b) اتورادیوگرافی ناحیه‌ای مشابه با ناحیه قبلی، پس از قرار دادن نمونه (۳۰ دقیقه + ۱۵ دقیقه) در گلوکز تریسیوم‌دار. تداخل ماده نشانه‌گذار فعالیت شدید پلیمرازی در سطح پلاسمالم. pl را نشان می‌دهد. c) پس از جدا کردن پلاسمالم؛ سر وسیع و چوگانی یک میکروفیبریل سلولزی. چسبیده به یک گویچه غشایی باقی می‌ماند که، به گروه آنزیمی سلولز سنتتازی شبیه است (پیکان).



شکل ۶-۴۶. شکستگی غشاء پس از اعمال فن انجماد و شکستگی a) میکرفیبریل‌های سلولزی، MF. b) ذرات غشایی به‌هم چسبیده و مجتمع شده به حالت حلقه‌ای

این وضع نشان دهنده این است که مولکول‌های جدید UDP − G به سر متصل به پلاسمالم که محل قرارگرفتن آنزیم‌های سلولز سنتتازی است افزوده می‌شود.

تجربیات انجام شده با پلاسمالم جدا شده در شرایط آزمایشگاهی نشان می‌دهد که برای تشکیل سلولز از مولکول‌های یوریدین‌دی‌فسفوگلوکز، نه تنها حضور مجموعه‌های سالم آنزیمی غشاء، بلکه عوامل همراه یا کوفاکتورهای مختلف از جمله عامل پروتئینی ۱۸ کلیو دالتونی، غلظت مناسب Ca^{++} و نیز پتانسیل الکتروشیمیایی مناسب غشایی لازم است. چنانچه هر یک از عوامل نامبرده فراهم نباشد به جای سلولز، کالوز تشکیل می‌شود. کالوز ماکرومولکولی است که از پلیمریزاسیون مولکول βگلوکز با اتصال‌های ۳-۱ تشکیل می‌شود. نظر کنونی این است که مجموعه‌های آنزیمی سلولز سنتتازی موجود در غشاء سلولی به حسب شرایط حاکم در جهت بیوسنتز سلولز یا بیوسنتز کالوز عمل می‌کنند (شکل ۶-۴۷).



شکل ۶-۴۷. پدیدهٔ بیوسنتز سلولز و کالوز

پس از تشکیل مولکول‌های سلولز، تجمع آنها به‌صورت بلورهای سلولز و رسیدن به حد میکروفیبریل‌ها و ماکروفیبریل‌های سلولزی بر بنای پدیده خودآرایی با برقراری پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی است. این تجمع نیاز به آنزیم ندارد. بنابراین پدیده بیوسنتز سلولز راکه پدیده‌ای است آنزیمی، بایستی از تجمع مولکول‌های سلولز که نیاز آنزیمی ندارد، جدا کرد. با به کارگیری ترکیبات رنگی مثل قرمز کنگو که به سطح مولکول‌های سلولز می‌چسبد، می‌توان از تجمع مولکول‌های سلولز جلوگیری کرد. در این حالت پلیمریزاسیون مولکول‌های یوریدین‌دی‌فسفوگلوکز و تشکیل مولکول‌های سلولز انجام می‌شود اما تجمع و بلوری شدن آنها انجام نمی‌گیرد.

تجزیه زیستی سلولز به وسیله سلولازها انجام می‌شود. سلولازها را به دو گروه اگزوسلولازها و آندوسلولازها تقسیم‌بندی می‌کنند. اگزوسلولازها قدرت عمل بیشتری دارند و بر انواع مختلف سلولز، چه سلولز بلوری و چه سلولز غیربلوری که در نتیجه کوبیدگی، زخم یا تخریب بخش‌های سلولزیِ بلوری ایجاد می‌شود، اثر می‌کنند و در مرحله اول عمل خود، موجب گسستن پیوندهای بین مولکولی می‌شوند. آندوسلولازها بر محصول عمل اگزوسلولازها اثر می‌کنند و موجب گسستن پیوندهای درون مولکولی می‌گردند بنابراین سلولازها اشتراک یا تعاون عمل دارند.

تنها تعداد کمی از جانداران سلولازها را تولید می‌کنند و قادر به استفاده از سلولز هستند. گیاهان سبز، که بخش عمده سلولز را می‌سازند، قدرت تجزیه سلولز ضعیفی دارند که به آنها امکان رشد و تجزیه‌های موضعی (برای مثال

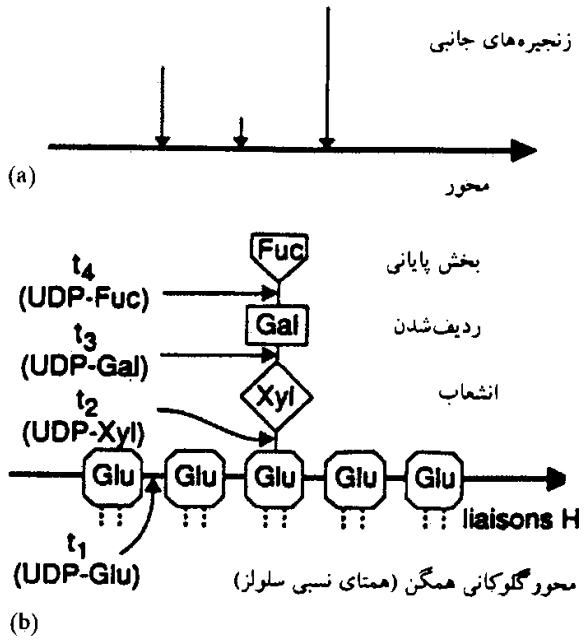
سوراخ‌دارشدن آوندها) را می‌دهد. این گیاهای به‌طور معمول قادر به تجزیه دیواره‌های پسینی که خود ساخته‌اند نمی‌باشند.

همچنین تنها تعداد کمی از جانوران، حتی علفخواران، قادر به گوارش مستقیم و استفاده از سلولز هستند. برخی نشخوارکنندگان نیز به روش همزیستی می‌توانند از سلولز استفاده کنند. در مجموع تجزیهٔ زیستی سلولز عملاً به میکروارگانیسم‌ها از جمله عده‌ای از باکتری‌ها و قارچ‌ها محدود می‌شود. این تجزیه زیربنای بسیاری از صنایع تخمیری است.

ونگ[1] در سال ۱۹۸۸ در یک برنامه جالب پژوهشی با روش‌های مهندسی ژنتیک و استفاده از پلاسمید به‌عنوان ناقل، ژن‌هایی را از باکتری خاکزی سلّولوموناس فی‌می[2] به مخمّر نان انتقال داد و به این ترتیب مخمّری به‌دست آورد که هم هیدرولیز و هم تخمیر مواد سلولزی مختلفی، حتّی قطعات چوب و خاک ارّه را هم که در آنها تجزیه سلولز دشوار است، انجام می‌دهد.

همی سلولزها

همی سلولزها بخشی از مواد زمینه‌ای دیواره هستند که از نظر شیمیایی از اشتراک پنتوزان‌ها (آرابان‌ها، گزیلان‌ها)، هگزوزان‌ها (مانّان‌ها، گلوکومانّان‌ها و گالاکتان‌ها) با مقدار کمی اسیدهای‌اورونیک (اسیدگلی‌کورونیک و اسیدگالاکتورونیک) ساخته شده‌اند. در بیشتر موارد، واحدهای همی سلولزی از یک محور اوزیدی «ستون مهره» با ساختمان خطی ساخته شده که در جایگاه‌های مختلف به وسیله پیوندهای هیدروژنی با سلولز مشترک می‌شود (اتصال‌های میکروفیبریل‌های ماده زمینه‌ای). بر روی محور اوزیدی انشعابات جانبی متشکل از تعداد و انواع مختلفی از اوزها وجود دارد (شکل ۶-۴۸).



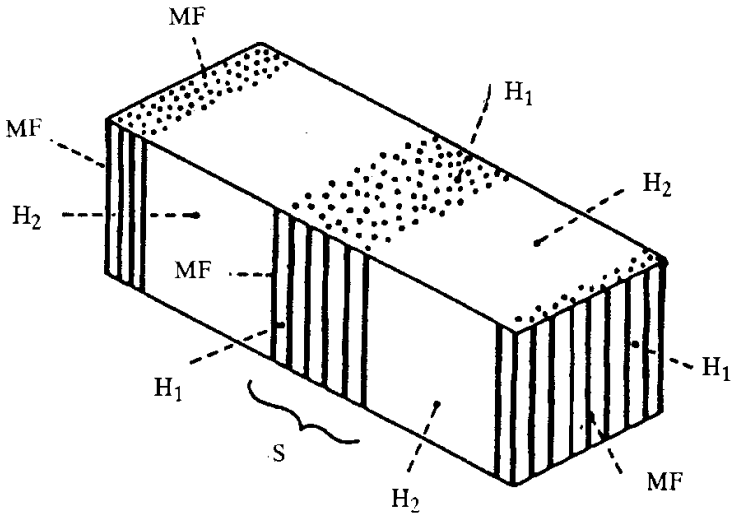
شکل ۶-۴۸. نمای عمومی همی سلولزها

برای نامیدن ترکیبات همی سلولزی، ابتدا نام زنجیره‌های جانبی یا بخشی از آن، سپس نام قند تکرار شده در محور میانی و بعد پسوند «ان» را می‌آورند مثلاً ترکیبی که طرح ساختمانی آن در بالا آورده شده را «گزیلو - گلوکان» می‌نامند.

در دیواره‌های پسین و به ویژه دیواره‌های چوبی شده، گزیلان‌های مختلف و گلوکومانان‌ها با محوری آمیخته از قطعات مانوزی و گلوکزی فراوان است.

رولان[3] در بافت کلانشیم که مقدار همی سلولز زیاد است، همی سلولزهای درون تیغه‌ای و بین تیغه‌ای در نظر گرفته است. او معتقد است که همی سلولزهای درون تیغه‌ای به‌طور فشرده‌ای میکروفیبریل‌های سلولزی را در بخش‌های ناهمگن دیواره احاطه کرده‌اند در حالی که همی سلولزهای بین تیغه‌ای فاصلهٔ بین توده‌های

1- Wang 2- Cellulomonas fimi 3- Roland



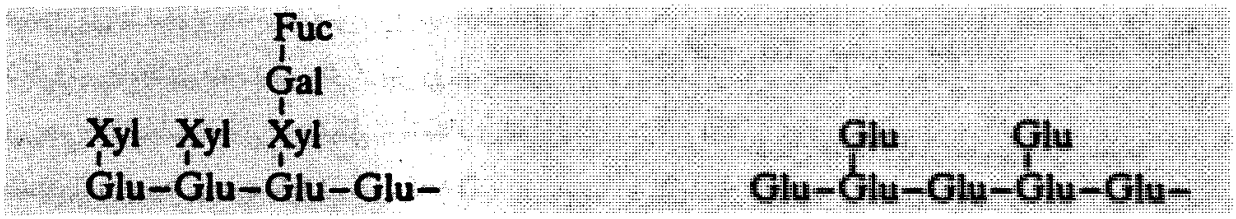
شکل ۶-۴۹. همی سلولزهای دیواره سلولی در بافت کلانشیم همی سلولزهای درون تیغه‌ای (H_1) و بین تیغه‌ای (H_2) با میکروفیبریل‌های سلولزی (MF) که به‌صورت لایه‌لایه (S)، مجتمع شده‌اند

میکروفیبریلی سلولزی را پر می‌کنند (شکل ۶-۴۹).

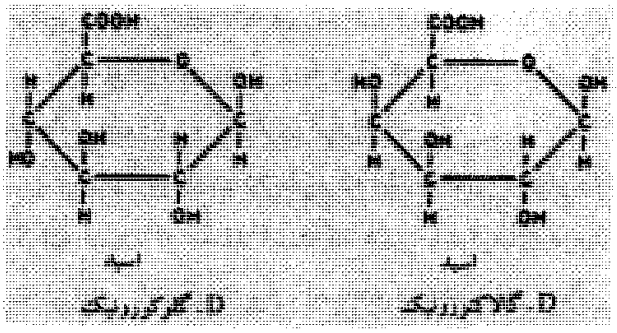
همی سلولزها مثل سلولز در آب نامحلولند و با کارمن زاجی رنگ قرمز می‌گیرند. به خلاف سلولز در محلول شوایتزر[1] و یا محلول هیدروکسیدمس‌آمونیاکی نامحلولند. در قلیاییات گرم تا حدّی حل و صابونی می‌شوند.

به دلیل وجود انشعابات جانبی در مولکول‌های همی سلولزی این ترکیبات به خلاف سلولزها امکان بلوری شدن را ندارند و به حالت خمیری یا بی‌شکل[2] هستند.

همی سلولزها می‌توانند تحت تأثیر آنزیم‌های رها شده از عوامل بیماری‌زای گیاهی، قطعات اولیگوساکاریدی را را رها کنند و این ترکیبات به‌عنوان القاکنندگان برخی ژن‌ها عمل می‌کنند، از این رو در ایمنی سلول‌های گیاهی اهمیت زیادی دارند. هم‌اکنون مشخص شده است که اولیگوساکاریدها به حالت بسیار اختصاصی عمل می‌کنند و حتی حذف یا جابه‌جایی یکی از قندهای سازنده مولکول آنها موجب توقف کار آنها می‌شود. اولیگوساکاریدها در پدیده‌های رشد و تمایز سلولی نیز دخالت دارند و برخی از آنها نقش ضد اکسین دارند، فرمول ساختمانی برخی اولیگوساکاریدها به شرح زیر است:



پکتین‌ها



این مواد شبیه همی سلولزها هستند اما مقدار اسیدهای اورونیک آنها خیلی بیشتر است. اسید اورونیک موجود در ساختمان پکتین‌ها عبارتند از اسید D گالاکتورونیک و اسید D گلوکورونیک که فرمول شیمیایی آنها به‌صورت روبرواست:

1- Schwatzer 2- Amorphe

به‌طور کلی تمام ترکیبات پکتیکی از مشتقات اسیدهای اورونیک (اسید د- گلوکورونیک و د- گالاکتورونیک) که با اتصال‌های ۴ ← ۱ پیوسته‌اند، تشکیل شده‌اند. در این زنجیره‌ها در برخی قسمت‌ها را منوز با اتصال‌های (۴ ← ۱) و (۲-۱) قرار گرفته است. این وضع موجب ایجاد «تاخوردگی‌هایی» در زنجیره‌های پکتینی می‌شود. رامنوز و اسید گالاکتورونیک می‌توانند زنجیره‌های جانبی از نوع گالاکتان‌ها و آرابان‌ها و یا مخلوط آربنیوگالاکتان‌ها را داشته باشند (شکل ۶-۵۰).

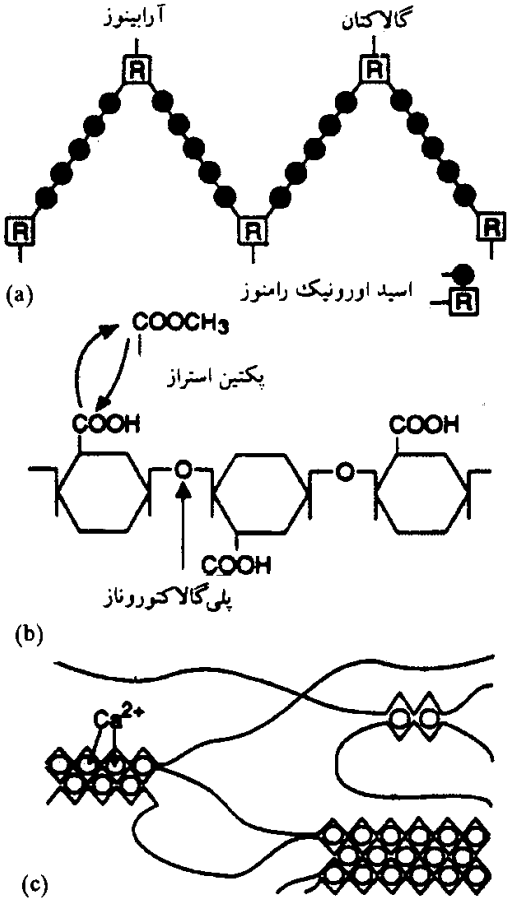
پکتین‌ها بیشتر زنجیره‌های پلی‌گالاکتورونیکی هستند که به وسیله مولکول‌های رامنوز به‌هم پیوسته‌اند. زنجیره‌های جانبی آنها از آرابان، گالاکتان یا آرابنیوگالاکتان است.

عامل کربوکسیل C_6 یا آزاد است، یا به وسیله الکل متیلیک استری شده و یا می‌تواند به وسیله Ca^{2+} خنثی شده و تولید پکتات را بکند. بخش عمدهٔ تیغه میانی سلول‌ها (سیمان بین سلولی) از پکتات کلسیم است.

حضور پکتات‌ها، قابلیت کشش دیواره‌های سلولی را کاهش می‌دهد. وجود کلسیم موجب به‌هم پیوستن زنجیره‌های پلی‌گالاکتورونیکی و تولید شبکه‌ای می‌شود که مقدار زیادی آب را به خود می‌گیرد و به این ترتیب ژل پکتیکی به وجود می‌آید.

دیویس[1] و همکارانش در ۱۹۶۴ سه گروه عمده برای ترکیبات پکتیکی در نظر گرفته‌اند:

الف - اسیدهای پکتیک: از زنجیره‌های خطی ساخته شده‌اند که نتیجه اشتراک (اتصال‌های β-۴ و ۱) ۵ تا ۱۰۰ مولکول اسید د- گالاکتورونیک‌اند.



شکل ۶-۵۰. پکتین‌ها a) بخش‌های پلی‌گالاکتورونیکی در محل رامنوز تاشدگی دارند. شاخه‌های جانبی خنثی (آرابینان، گالاکتان یا آرابینوگالاکتان). b) بخش پلی‌گالاکتورونیک. عامل کربوکسیل C_6 یا آزاد است و یا به وسیله آنزیم و با استفاده از الکل متیلیک، استری شده است. پکتین استراز یا پکتین متیل استراز، تعداد گروه‌های اسیدهای آزاد را تغییر می‌دهد. یک پلی‌گالاکتورونات می‌تواند با گسستن این پیوندهای بین مونومرها آنها را بشکند. c) ژل اسیدپکتیک دارای کلسیم. یون‌های Ca^{2+} به‌طور منظم بین بخش‌های همگن پلی‌گالاکتورونی قرار گرفته‌اند (قرارگرفتن شبیه شانه تخم مرغ).

ب - اسیدهای پکتینیک: از ۱۰۰ تا ۲۰۰ مولکول اسید د- گالاکتورونیک ساخته شده‌اند. این دو گروه از ترکیبات پکتیکی در گرما و یا حضور برخی اسیدها به‌صورت ژل در می‌آیند. به‌علاوه تعدادی از ریشه‌های کربوکسیل آنها می‌تواند با اسیدهای امینه مختلفی (به ویژه میتونین) خنثی (استری) شود.

ج - پروتوپکتین‌ها: گروه سوم مواد پکتیکی هستند که دارای وزن مولکولی زیادند. زنجیره‌های ساختمانی آنها به احتمال دارای انشعاب است و می‌تواند با مولکول‌های سلولز مشترک شود.

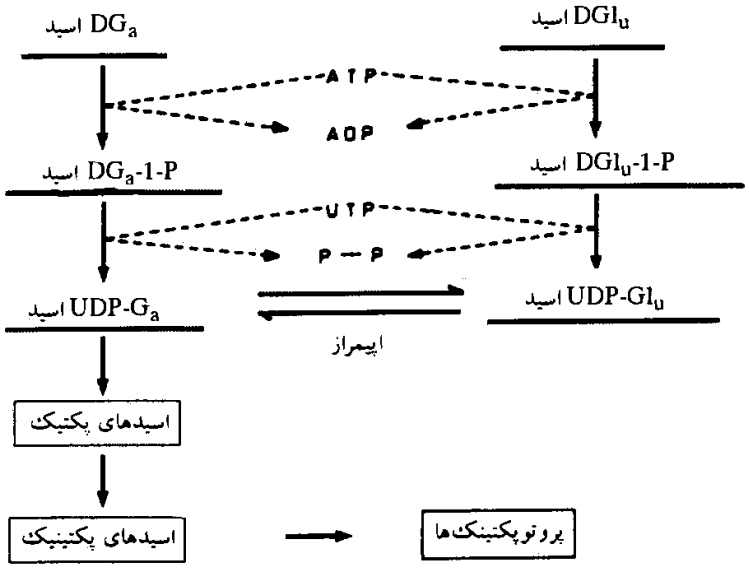
عامل COOH − در پکتین‌ها می‌تواند با Ca^{2+} ترکیب و تولید پکتات‌ها را بکند.

$$R - COOH + HOOC - R \xrightarrow[+\,Ca^{2+}]{-\,2H} R - COO - Ca - OOC - R$$

1- Davies

حضور پکتات‌ها قابلیت کشش دیواره‌های سلولی را کاهش می‌دهد. پکتات کلسیم تیغه میانی بین سلول‌های گیاهی را تشکیل می‌دهد.

بیوسنتز پکتین‌ها تا حدی شناخته شده است (هاسید[1] ۱۹۶۰) و می‌دانیم که گالاکتان‌ها که با اتصال‌های β مشترک می‌شوند پیش‌سازهای پکتین‌ها هستند. ضمن بیوسنتز پکتین‌ها از ATP و UTP در تشکیل مواد حد واسط تا رسیدن به حد اسیدهای پکتیک استفاده می‌شود، سپس اسیدهای پکتیک به اسیدهای پکتینیک و این اسیدها به پروتوپکتین‌ها تبدیل می‌شوند. تجزیه پکتین‌ها به وسیله عده‌ای از آنزیم‌ها (پکتیناز، پکتولاز، پکتین دپلیمر) صورت می‌گیرد که، موجب شکستن اتصال‌های گلوکزی α ۱ و ۴ می‌شوند. همچنین می‌توان از پرتوپکتینازها نام برد که عامل تجزیه پروتوپکتین‌ها هستند. در برش‌های بافت‌های گیاهی، مواد پکتیکی با یُد به رنگ زرد در می‌آیند. پس از هیدرولیز با یُد رنگ آبی می‌گیرند. (مشابه سلولز) باکارمن مثل سلولز به رنگ قرمز در می‌آیند. به‌طور تقریباً اختصاصی با قرمز روته نیوم رنگ مایل به بنفش می‌گیرند. ترکیبات پکتیکی ساختمان قابل رؤیت با میکروسکوپ الکترونی ندارند. (شکل ۶-۵۱).



شکل ۶-۵۱. مسیرهای بیوسنتز پکتین‌ها.
گرفته شده از:
D.D.DAVIES,J.GIOVANELLI et T.AP REES. Plant biochemistry, p.151,Blackwell,Oxford, 1964.

پروتئین‌ها

در سال ۱۹۲۴ توپر[2] و همکارانش برای اولین‌بار پروتئین‌ها را از دیوارهٔ سلول‌های گیاهی استخراج کردند اما تا مدت‌ها تصور می‌شد که این پروتئین‌ها نتیجهٔ تخریب سیتوپلاسم‌اند و دیوارهٔ اسکلتی فاقد پروتئین می‌باشد. از ۱۹۵۸ با تحقیقات بیشاپ[3] کی‌ویلان[4] و همکارانش وجود پروتئین‌ها در دیوارهٔ اسکلتی مسلّم شد. در سال ۱۹۶۱ پرستن[5] نظر داد که دیوارهٔ اسکلتی از یک قالب پروتئینی ساخته شده که در آن پلی‌اوزیدهای مختلف قرار گرفته‌اند. ساداوا[6] و همکارانش در ۱۹۶۹ نیز با تجزیه‌هایی که به کمک روش‌های اتورادیوگرافی در سلول‌های هویج انجام دادند، این نظر را تأیید کردند. پروتئین‌های موجود در دیواره بیشتر از مشتقات پرولین به‌خصوص ۳- سیس، ۴- ترانس‌دی‌هیدروکسی پرولین‌اند (دوگال[7] ۱۹۶۰). این پروتئین‌ها با آرابینوز -گالاکتان مشترک‌اند. لامپورت[8] ۱۹۷۰-۱۹۶۳، این ترکیب پیچیده گلوکوپروتینی را به دلیل نقشی که در قابلیت کشش دیواره‌ها دارد اکستانسین[9] نامیده است. به نظر می‌رسد اکستانسین از راه پل‌های O — از یک طرف به مولکول‌های سلولز و از طرف دیگر به یک آرابینوز -گالاکتان متصل است. به‌علاوه

1- Hassid 2- Tupper 3- Bishap 4- Kivillan 5- Preston
6- Sadava 7- Dougal 8- Lamport 9- Extensine

پل‌های دی‌سولفوره (– S – S –) ترکیبات پیچیدهٔ سازندهٔ اکستانسین را به‌هم می‌پیوندند. احیای دی‌سولفور به تیول موجب سستی موقت این زنجیرها و کشش زیاد سلولز خواهد شد.

هم‌اکنون می‌دانیم که در دیواره اسکلتی، پروتئین‌های ساختمانی و پروتئین‌های آنزیمی وجود دارند.

پروتئین‌های ساختمانی دیواره دارای ترتیب پلی‌پپتیدی ویژه‌ای متشکل از تکرار چهار هیدروکسی‌پرولین (HYP) هستند که اغلب به وسیله سرین یا بخش‌های بینابینی دیگر به‌هم پیوسته‌اند:

$$Ser - Hyp - Hyp - Ser - (Hyp)_4 \text{ و } \ldots$$

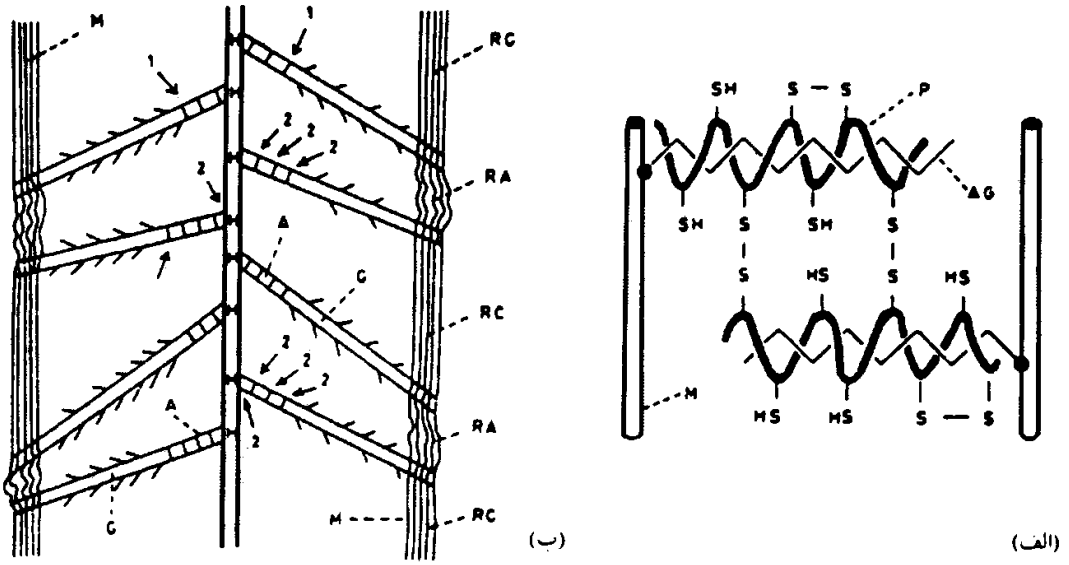
نوع اسیدهای امینه در بخش‌های بین قطعات تتراهیدروکسی‌پرولین به حسب منشاء پروتئین‌ها متفاوت است. برای مثال در دیواره‌های سلول‌های گوجه‌فرنگی ترتیبی از والین (Val)، تیروزین (Tyr) با خاصیت فنلی و لیزین (Lys) بازی وجود دارد:

$$Ser - (HHyp)_4 - Val - Tyr - Lys$$

وجود بخش‌های فنلی قابل توجه است زیرا این بخش‌ها می‌توانند موجب اتصال‌های دی‌فنلی و ایجاد حالت شبکه‌ای پایدار در دیواره باشند. وجود بخش‌های بازی (با NH_2 اضافی) نیز ویژگی‌های قلیایی این بخش‌ها را تشدید کرده و آنها را به‌صورت پلی‌کاتیون در می‌آورند. این بخش‌ها می‌توانند با پکتین‌ها (بخش‌های پلی‌آنیونی) ترکیب شوند.

پروتئین‌های ساختمانی دیواره اسکلتی با پیوندهای مختلفی از جمله پیوندهای هیدروژنی، پل‌های اکسیژن با بخش‌های پلی‌ساکاریدی دیواره پیوستگی دارند.

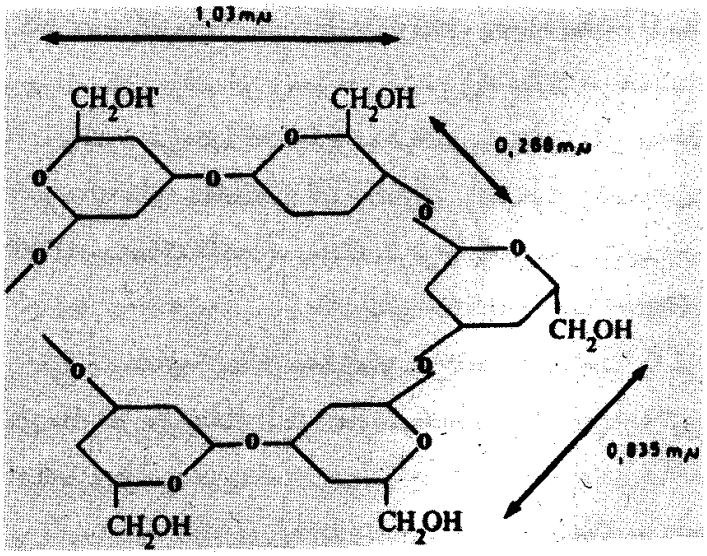
از سال ۱۹۶۳ لمپورت پروتئین دیواره‌ای غنی از هیدروکسی‌پرولین را اکستانسین نامید زیرا معتقد بود که این ترکیب در قابلیت کشش دیواره و اتساع‌پذیری آن نقش دارد. اکستانسین با گالاکتوآرابان‌های خود به میکرو-ماکروفیبریل‌های سلولزی متصل است. در پروتئین‌های غنی از هیدروکسی‌پرولین، پل‌های SH – و S – S وجود دارند که این پل‌ها نیز در قابلیت کشش دیوارهٔ مؤثر هستند. زمانی که مقدار S – S زیاد است، اکستانسین، استحکام شبکه میکروفیبریل‌های سلولزی را موجب می‌شود، در حالی که افزایش مقدار SH – به انبساط و کشیدگی سلولز می‌انجامد (شکل ۶-۵۲).



شکل ۶-۵۲ الف) ساختمان مولکولی اکستانسین. «پروتئین دارای هیدروکسی پرولین» AG، آرابینوگالاکتان؛ M، میکروفیبریل سلولزی. ب) طرح فرضی مربوط به نمایش اکستانسین M، میکروفیبریل‌ها؛ G، β- ۱، ۳ -گالاکتان؛ A؛ آرابینان؛ RC بخش بلوری؛ RA، بخش بی‌شکل ۱- پیوندهای سست در محیط قلیایی؛ ۲، پیوندهای سست در محیط اسیدی. گرفته شده از:

D.T.A. LAMPORT, Ann. Rev. Plant Physiol., 21.235, 1970

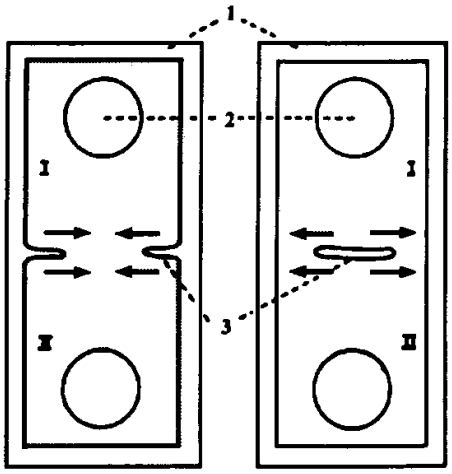
در بین پروتئین‌های آنزیمی دیوارهٔ اسکلتی، پراکسیدازها، اکسیدازها و انواع مختلفی از هیدرولازها شناسایی شده‌اند. بنابراین دیواره، به خلاف پندارهای گذشته، یک کانون پویای فعالیت‌های آنزیمی است.



شکل ۶-۵۳. طرح ساختار مولکول کالوز. (گرفته شده از جی. کسلر و همکار، ۱۹۵۸).

کالّوزها

کالّوز در ترکیب دیواره لوله‌های غربالی، در دانه‌های گرده و لوله‌های گرده، در دیوارهٔ برخی قارچ‌ها و در سلول‌های زخمی شده یا گاهی سلول‌هایی که تحمل پلاسمولیز شدیدی را کرده‌اند دیده می‌شود. اگر سلول‌های الودا را در محلول بسیار غلیظی از ساکارز قرار دهیم شروع به پلاسمولیز می‌کنند و به سرعت کالوز در فاصلهٔ بین پلاسمالم چروکیده شده و دیوارهٔ اسکلتی آنها مجتمع می‌شود. این کالوز تحت تأثیر کالّاز به سرعت تجزیه می‌گردد.



شکل ۶-۵۴. دو حالت از تقسیم سلول. a) روش مرکزگرا، b) روش گریز از مرکز 1 = دیوارهٔ سلول اولیه 2 = هسته تلوفازی 3 = دیواره جدید در حال تشکیل

بیوسنتز کالوز در سطح پروتوپلاست نتیجهٔ عمده‌ای دارد و عدّه‌ای از پژوهشگران معتقدند که برخی پروتوپلاست‌ها قادر به بازسازی دیوارهٔ اسکلتی برای خود هستند و در این بازسازی احتمالاً کالوز نقش مهمی را بازی می‌کند. از مشخصات عمده کالوز سرعت تشکیل و تجزیه آن است. از نظر شیمیایی کالوزپلی‌مری بدون انشعاب با پیوندهای ۱-۳ از β گلوکز است. آرایش نامنظّم مولکول‌های گلوکزِ سازندهٔ آن نشان دهندهٔ این است که مولکول کالوز ساختمان بلوری ندارد. (شکل ۶-۵۳).

کالوز تقریباً به‌طور اختصاصی با آبی‌آنیلین یا بهتر با آبی‌کوتن[1] رنگ می‌شود. فلوئورسانس ثانویه مایل به سبز دارد و با میکروسکوپ الکترونی بعد از کاربرد آلدئید گلو تاریک و اسیموم رنگ مایل به سفید به خود می‌گیرد.

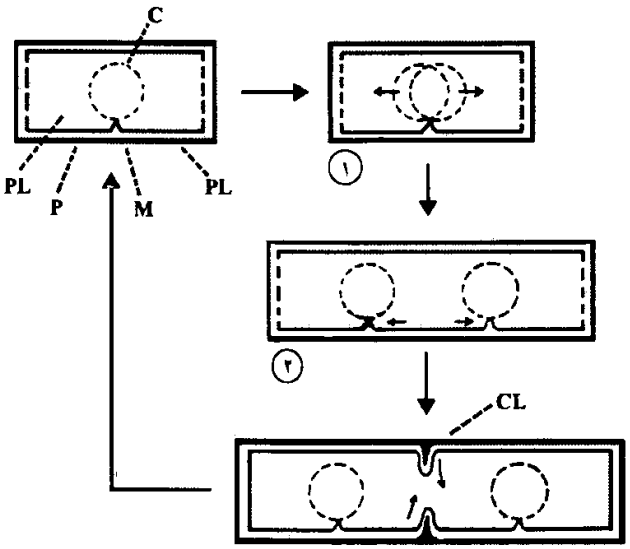
منشاء (خاستگاه) دیوارهٔ اسکلتی

دیوارهٔ اسکلتی در اکثر موارد به دنبال تقسیم هسته (کاریوکینز[2])، از مواد سیتوپلاسمی سلول در منطقهٔ استوایی دوک تشکیل می‌شود. وقتی تلوفاز رو به پایین می‌رود دیوارهٔ اسکلتی که تفکیک دو سلول جدید را موجب خواهد

1- Coton blue 2- Caryocinesis

شد، شروع به رشد می‌کند. گرچه در جانوران و در ریسه‌داران، تفکیک سلول مادر به سلول دختر اغلب به روش مرکزگرا[1] است یعنی از بخش‌های کناری سلول مادری به سوی مرکز صورت می‌گیرد (شکل A) اما در گیاهان عالی تقریباً همیشه تفکیک دو سلول جدید به روش گریز از مرکز[2] است (شکل B) (شکل ۶-۵۴).

به منظور درک روشن‌تری از خاستگاه و چگونگی تشکیل دیوارهٔ اسکلتی حالات مختلف زیر را بررسی می‌کنیم.



شکل ۶-۵۵. تقسیم دوتایی در باکتری و تشکیل دیواره با روش مرکزگرا ۱- همانندسازی و تفکیک دو کروموزوم ۲- دوتایی شدن مزوزوم. C، کروموزوم؛ M، مزوزوم؛ CL، دیواره در حال تشکیل؛ H، سیتوزول؛ P، دیواره؛ PL، پلاسمالم

الف - در باکتری‌ها: به دنبال همانندسازی کروموزوم حلقوی باکتری که معمولاً بر روی مزوزوم تثبیت شده است، سلول باکتری طویل می‌شود، دو کروموزوم از یکدیگر فاصله می‌گیرند سپس قسمت میانی باکتری از خارج به داخل (روش مرکزگرا) فرورفتگی پیدا می‌کند و به‌تدریج دو باکتری از هم جدا می‌شوند. (شکل ۶-۵۵).

ب - در جلبک کلوستریوم نیز که از ریسه‌داران است تشکیل دیوارهٔ اسکلتی به روش به سوی مرکز به وسیله لوتمن[3] نشان داده است.

ج - در برخی گیاهان عالی نیز تشکیل دیوارهٔ اسکلتی به روش به سوی مرکز به وسیله پژوهشگران مختلف نشان داده شده است. (نوگارد[4] و همکارش) این مطلب را در افرا[5] در محیط مایع به سال ۱۹۶۸ و رولان[6] و پیله[7] آن در تمشک به سال ۱۹۷۱ مشخص کرده‌اند. (شکل ۶-۵۴).

شکل ۶-۵۶. شروع تقسیم سلولی به روش به سوی مرکز در جلبک کلوستریوم

د - در اکثر گیاهان عالی تشکیل دیوارهٔ اسکلتی به روش گریز از مرکز صورت می‌گیرد و به این ترتیب است که: از اواخر آنافاز تقسیم میتوزی که رشته‌های دوکی بینابینی شروع به تحلیل رفتن می‌کنند، میکروتوبول‌های جدیدی در قسمت استوایی دوک تقسیم پدیدار می‌شوند. تراکم تعدادی از این میکروتوبول‌ها موجب تشکیل رشته‌های دوکی جدید می‌شود که آنها را رشته‌های بینابینی[8] و گاه مجموعهٔ آنها را دوک تقسیم سیتوپلاسم نامند. معمولاً این رشته‌ها تا نزدیکی پلاسمالم گسترش می‌یابند. این رشته‌ها و بیشتر سیتوپلاسم محصور شده بین این رشته‌ها و به‌خصوص بخش استوایی آن را فراگموپلاست[9] از کلمهٔ یونانی (Fragma به معنی جدایی و تفکیک) نامند.

اندامک‌های سیتوپلاسمی و جریانات سیتوپلاسم معمولاً وارد ناحیه فراگموپلاست نمی‌شوند و تنها ریبوزوم‌ها

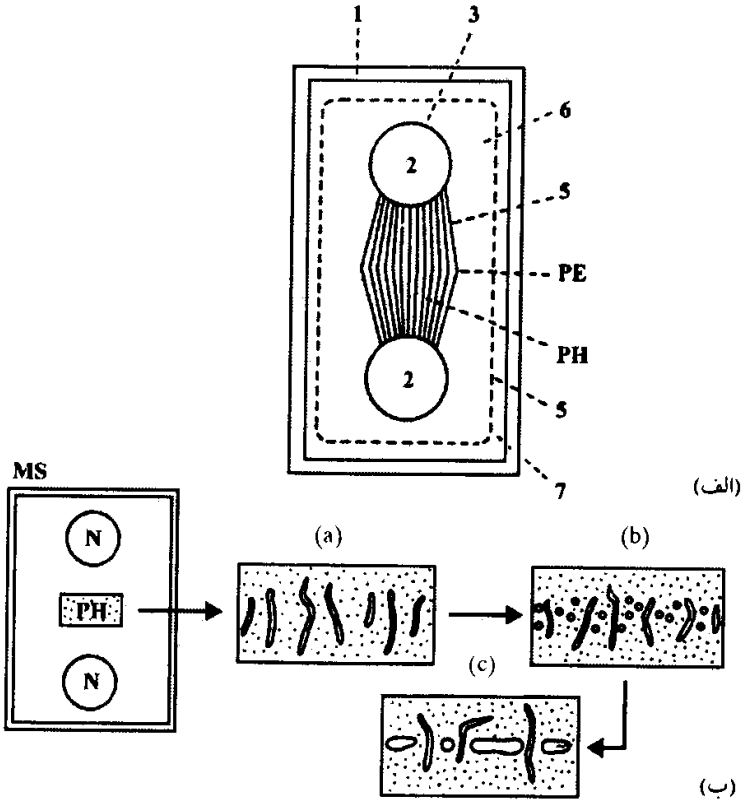
1- Centripetale 2- Centrifuge 3- Lutman 4- Nugarede 5- Acer
6- Roland 7- Pilet 8- fibers Interzonales 9- Phragmoplast

و چند رشته‌ای از شبکه درون سیتوپلاسمی در فراگموپلاست وجود دارند.

همزمان با این تغییرات تعداد زیادی حفره‌های کوچک که به نام مولن‌هاور و وعالی (۱۹۶۳) از دستگاه گلژی منشاء گرفته‌اند، در فراگموپلاست مجتمع شده به‌تدریج در سطح استوایی آن ردیف می‌شوند و فراگموزوم‌ها[1] را به وجود می‌آورند.

پیوستگی تدریجی فراگموزوم‌ها که به روش گریز از مرکز صورت می‌گیرد موجب تشکیل صفحهٔ سلولی[2] می‌شود که طرح اولیه دیوارهٔ اسکلتی جدید است به این ترتیب که غشاء این حفره‌ها و فراگموزوم‌ها منشاء پلاسمالم‌های جدید است و محتویات آنها که بیشتر از جنس مواد پکتیکی است منشاء دیواره اسکلتی جدید خواهد بود. (شکل ۶-۵۷).

همزمان با پیوستن فراگموزوم‌ها در برخی نقاط رشته‌هایی از شبکه درون سیتوپلاسمی بین آنها قرار می‌گیرند این نقاط محل پلاسمودسم‌های آینده هستند.



شکل ۶-۵۷. نمایی از تشکیل دوک تقسیم سیتوپلاسم و تشکیل تدریجی دیواره اسکلتی بین دو سلول. الف) منظره سلول با دو هسته و رشته‌های دوکی تقسیم سیتوپلاسم. ۱، دیواره سلول مادری؛ ۲، هسته تلوفازی؛ ۳، پوشش هسته‌ای در حال تشکیل؛ ۴، سیتوزول؛ ۵، رشته‌های دوک؛ ۲۲۶، غشاء؛ ۷، پری پلاسم. PE، صفحه استوایی؛ PH، فراگموپلاست ب) تحول فراگموپلاست. MS دیوارهٔ اسکلتی سلول مادری؛ N، هسته؛ PH، فراگموپلاست a) لوله‌های شبکه آندوپلاسمی در محل صفحهٔ استوایی قرار می‌گیرد. b) فراگموزوم‌ها پدیدار می‌شوند. c) تورم و در هم‌آمیختگی فراگموزوم‌ها

هـ- در زمان تشکیل بافت آلبومن و برخی رویان‌های گیاهی بلافاصله پس از تقسیم هسته دیوارهٔ اسکلتی تشکیل نمی‌شود، در نتیجه ساختمان چند هسته‌ای (سنوسیتی[3]) به وجود می‌آید. سپس در بین هسته‌های مختلف دوک‌هایی تشکیل می‌شوند که مجموعه‌ای از دیواره‌ها را فراهم می‌آورند. همان‌طور که جریان جرس[4] در آلبومن زنبق نشان داده است، این شکلِ بسیار ویژه از تشکیل جدارها نیز با ظهور دوک تقسیم سیتوپلاسم همراه است.

و - در گیاهان دو لپه‌ای که تفکیک ۴ تتراسپور حاصل از هر سلول مادر گروه به‌طور همزمان صورت می‌گیرد. در اولین میتوز، اثری از فراگموپلاست ظاهر می‌شود که ناپایدار است و بزودی محو می‌گردد. سپس در زمان تقسیم سیتوپلاسم ریز لوله‌های شعاعی در اطراف هر یک از ۴ هسته متراکم می‌شوند. این ریز لوله‌ها در وسط محورهایی که هسته‌ها را دوبه‌دو به‌هم مربوط می‌کنند در ۶ سطح عمود بر هم تلاقی کرده و باین ترتیب سطوح تقسیم سلول تشکیل می‌شوند که در آنها حفره‌های سازنده صفحات سلولی جمع می‌شوند. این ساختمان‌ها با

- Mollen hauer - Whaley 1- Phragmosomes 2- Cell plate 3- Cenocyty
4- Jungers

سه دوک تقسیم که قبلاً در زمان تقسیم سلول مادر گرده ایجاد شده‌اند هیچ ارتباط مستقیمی ندارند.

ز - در پروتوپلاست‌هایی که در شرایط مناسب کشت می‌شوند بازسازی دیوارهٔ اسکلتی با کاهش محسوسی از مواد موجود در محیط همراه است. سنتز مواد اساسی سازندهٔ دیواره با فعالیت شدید دستگاه گلژی همراه است. پس از این مراحل حفره‌های دارای پلی‌اوزیدها به سوی سطح سلول رانده می‌شوند و محتویاتشان تخلیه می‌گردد. در همین زمان در تماس با پلاسمالم عناصر رشته‌ای پدیدار می‌شوند و به‌تدریج بافت درهمی را که خاصّ دیوارهٔ اولیه است به وجود می‌آورند (پارت[1] و رولان[2]، ۱۹۷۱).

در همهٔ موارد ذکر شدهٔ قبلی پس از تشکیل دیوارهٔ ابتدایی (جدار اولیه) که در واقع همان تیغه میانی بین سلول‌هاست، سیتوپلاسم سلول مواد جدیدی از جنس سلولز، ترکیبات پکتیکی و همی‌سلولزها را با دخالت حفره‌های گلژی بر روی دیواره ابتدایی ترشح می‌کند و به این ترتیب بر ضخامت دیواره افزوده می‌شود و دیوارهٔ اولیه به وجود می‌آید.

میکروفیبریل‌های سلولزی دیواره اولیه به وسیله ماده زمینه‌ای یا ماتریکس احاطه شده‌اند که از همی سلولز تشکیل شده است و معمولاً دارای مقدار کمی از پکتین‌ها نیز می‌باشد. به این ترتیب دیوارهٔ اولیه، دیواره‌ای نرم، قابل انعطاف و دارای قابلیت کشش و رشد است که در آن میکروفیبریل‌های سلولزی، و ماده زمینه‌ای شامل همی‌سلولزها و ترکیبات پکتیکی وجود دارند:

ساختار: دیواره اسکلتی از مجموعه لایه‌هایی تشکیل شده که به‌تدریج در تماس با پلاسمالم ساخته شده‌اند: لایه‌های قدیمی‌تر، بیرونی‌تر هستند، در حالی که لایه‌های جدیدتر به غشاء سلولی نزدیک‌ترند. به‌طور معمول در ساختار دیوارهٔ اسکلتی، تیغه میانی، دیوارهٔ نخستین و دیواره پسین در نظر گرفته می‌شود و برای برخی سلول‌ها بندرت دیواره سومین نیز مطرح می‌گردد.

تیغه میانی اولین بخش دیواره است که هنگام تقسیم سلولی از محتوای پکتیکی فراگموزوم‌ها شکل می‌گیرد. به نظر می‌رسد که این پدیده با نوعی تراکم همراه باشد زیرا تیغه میانی پس از تشکیل خیلی نازک‌تر از صفحه سلولی است (بوواوپوئیسان، ۱۹۵۸). تیغه میانی بین دو یاخته مجاور، جز در محلّ مئآها، ممتد است. این تیغه اساساً از ترکیبات پکتیکی ساخته شده و فاقد سلولز است.

تیغه میانی به دلیل این که ساختمانی همگن و ایزوتروپ دارد، از بخش‌های دیگر دیواره که آنیزوتروپ هستند (یعنی در تمام جهات ویژگی یکسانی ندارند)، متفاوت و قابل تشخیص است.

دیواره نخستین: پس از تشکیل تیغه میانی با ادامه فعالیت دیکتیوزوم‌ها و با دخالت حفره‌های گلژی پیش‌سازها و ترکیبات دیواره‌ای (مواد گلوسیدی و پروتئین‌ها) به پلاسمالم می‌رسند و پس از شکل‌گیری‌های لازم، بر روی تیغه میانی ته‌نشین می‌شوند و لایه‌های دیواره نخستین را به وجود می‌آورند. دیواره نخستین اغلب دارای یک تا دو لایه و گاهی لایه‌های بیشتر است. این لایه‌ها را با L_1 و L_2...نشان می‌دهند. در لایه‌های دیواره نخستین تراکم نسبی میکروفیبریل‌ها و ماکروفیبریل‌های سلولزی کم است و مواد زمینه‌ای دیواره فراوان‌ترند. این دیواره به ترتیبِ کاهشیِ قابل توجّهی از: همی سلولزها، سلولزها، پکتین‌ها و پروتئین‌ها ساخته شده است.

در بررسی با میکروسکوپ الکترونی، پلی‌ساکاریدهای دیواره‌ای واکنش ضعیفی با نمک‌های اورانیل و سرب دارند به همین دلیل برای بررسی فراساختمان دیواره از روش‌های مختلفی مثل روش سایه‌دهی و اخیراً از روش

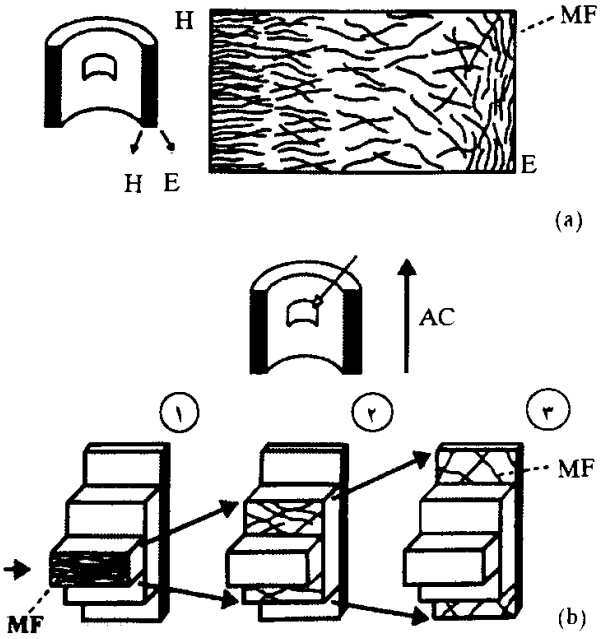
1- Part 2- Roland

سیتوشیمی (آزمون: اسیدپریودیک تیوکربوهیدرازید، پروتئینات نقره، سلیگمن[1] و همکارش، ۱۹۶۵، اصلاح شده به وسیله تیری[2] ۱۹۶۷) استفاده می‌شود.

نتایج به‌دست آمده از کاربرد روش‌های نوین به ارائه نظریه‌های مختلفی برای شرح ساختمان و همچنین نحوهٔ رشد دیواره در ارتباط با ساختمان آن منجر شده‌اند:

فری ویسلینگ[3] و مولت‌هالر[4] در ۱۹۶۵ نظر داده‌اند که میکروفیبریل‌های سلولزی در ساختمان دیوارهٔ اولیه تراکم چندانی ندارند و به صورتی نامنظم و اتفاقی در جهات مختلف قرار گرفته‌اند و به‌تدریج در لایه‌های جدیدتر این دیواره، میکروفیبریل‌های سلولزی متراکم‌تر و منظم‌تر می‌شوند. به دنبال کارهای پژوهشگران مختلف و به‌خصوص (رولان) استقرار بی‌نظم میکروفیبریل‌های سلولزی حتی در ساختمان لایه‌های قدیمی دیواره اولیه مورد تردید قرار گرفته است.

نظریه دیگری که در سال‌های اخیر بیشتر مورد توافق بوده است «نظریه رشد تار عنکبوتی MGH»[5] (یا نظریه رشد لایه‌های زیاد است که در ۱۹۵۳ به وسیله رولُفزن[6] و هووینگ[7] ارائه شده و بر بنای آن دیواره‌های اولیه که قابلیت رشد دارند دارای اسکلتی با تار و پودی (بافتی) پراکنده (کم تراکم) و میکروفیبریل‌هایی با جهت نامشخص و اتفاقی‌اند.



شکل ۶-۵۸. a) «رشد تار عنکبوتی» تحول تدریجی میکروفیبریل‌های سلولزی در دیواره‌ای که لایه‌لایه نیست H، سطح داخلی؛ E، سطح خارجی؛ MF، میکروفیبریل‌ها b) «رشد تار عنکبوتی» تغییر وضع میکروفیبریل‌های سلولزی در لایه‌های مختلف دیواره. AC، محور رشد. ۱، ۲، ۳، مراحل نوآرایی میکروفیبریل‌ها (MF).

این اسکلت در سلول‌های جوان به خوبی مشخص نیست. میکروفیبریل‌های جدید در سطح داخلی دیواره و کم‌وبیش عمود بر محور رشد سلول استقرار می‌یابند. وقتی سلول طویل می‌شود، میکروفیبریل‌ها کشیده شده، تغییر جهت می‌دهند و به موازات محور رشد سلول قرار می‌گیرند. به این ترتیب رشد سلول با تغییر آرایش میکروفیبریل‌ها مشخص می‌شود. این نظر برای دیواره در حال رشد وضعیتی بسیار موقت و گذرا در نظر می‌گیرد. بررسی‌های جدید سیتوشیمیایی و فراساختمانی نشان داده‌اند که ساختمان دیوارهٔ اولیه از همان آغاز تشکیل مشخص‌تر و روشن‌تر از آنست که در نظریه (رشد لایه‌های زیاد) آورده شده است. در عین حال نظریه رشد لایه‌های زیاد و تغییر آرایش میکروفیبریل‌ها و ماکروفیبریل‌های سلولزی در لایه‌های قابل رشد دیوارهٔ اولیه هم‌اکنون به‌عنوان یکی از نظریه‌های مورد قبول مطرح است (شکل ۶-۵۸).

نظریه دیگری که به دنبال مطالعات سیتوشیمیایی و فراساختمانی سلول‌های در حال رشد به وسیله رولان و همکارش (۱۹۷۵، ۱۹۷۷) ارائه شده نظریه «میکروفیبریل‌های منظم» است. بنابراین نظریه دیواره اولیه از لایه‌های پشت‌سرهمی ساخته شده است، هر لایه سازمان منظمی دارد، میکروفیبریل‌ها از لایه نخستین لایه‌ها دارای نظم

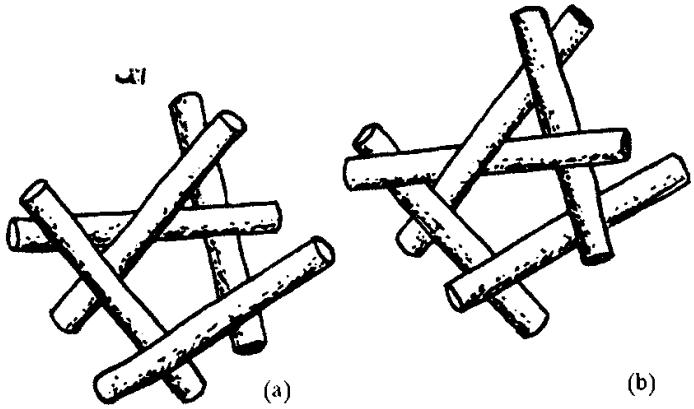
1- Seligman 2- Thiery 3- Fery - Wyssling 4- Muhlethaler
5- multinet growth hypothese 6- Roelofsen 7- Houvink

هستند و به‌طور اختصاصی به تنظیم‌کننده‌های رشد و به کشش‌های سلولی (تورژسانس) پاسخ می‌دهند.

این نظریه برای دیوارهٔ اولیه در کنترل شکل سلول نقش عمده‌تری قایل است و معتقد است امکانات رشد هر سلول به وسیله ساختمان دیوارهٔ آن سلول و ارتباطات سه بعدی اجزای سازنده دیوارش مشخص می‌شوند. نظریهٔ میکروفیبریل‌های منظم در ۱۹۸۰ به وسیله رجائی[1]، ضمن بررسی اثر ژئوتروپیسم بر رشد محور زیر لپه‌ای (هیپوکوتیل) گیاه آفتابگردان نیز مورد تأیید قرار گرفته است.

چگونگی رشد دیوارهٔ اولیه

نحوهٔ افزایش مولکول‌های جدید، به‌خصوص مولکول‌های سلولزی به دیوارهٔ اولیه در ضمن رشد آن مورد بحث است. ضمن کشیده شدن دیواره، پیوندهای هیدروژنی بین میکروفیبریل‌های سلولزی گسسته شده و بدین ترتیب شبکه‌های سلولزی گسیخته و سست می‌شوند، و مواد جدید می‌توانند در فاصله‌هایی که بدین نحو ایجاد شده‌اند جایگزین شوند (پدیدهٔ Intussusception = نفوذ مولکول‌های جدید بین میکروفیبریل‌های سلولزی). از طرف دیگر لایه‌های جدیدی از دیوارهٔ اولیه نیز در تماس با پلاسمالم تشکیل می‌شوند (پدیده Opposition = تشکیل و برقراری لایه‌های جدید بر روی هم).



شکل ۶-۵۹. a) ساختارهای مربوط به رشد با روی هم قرار گرفتن میکروفیبری‌ها (قرار گرفتن رشته‌های جدید در سطح). b) با در هم رفتن آنها (نفوذ رشته‌های جدید در ساختاری که از قبل وجود داشته است).

شکل ۶-۵۹ تجسمی از چگونگی رشد عرضی یا افزایش ضخامت دیواره را بنابه دو پدیده «روی هم قرار گرفتن مواد» یا «نفوذ مواد جدید در بین مواد قبلی» را نشان می‌دهد. ری[2] (۱۹۶۷) در کولئوپتیل جوی سیاه، در ساقه نخود با استفاده از تداخل گلوکز تریسیوم‌دار و به کار گرفتن روش اتوهیستورادیوگرافی با میکروسکوپ الکترونی نشان داده است که مواد جدید دیواره‌ای، هم بر سطح و هم به درون دیواره جایگزین می‌شوند و این مطلب دخالت هم زمان پدیده‌های Opposition و Intussusception در رشد دیواره را مشخص می‌سازد.

بررسی‌های جدیدی که با میکروسکوپ‌های الکترونی انجام شده‌اند، به‌خصوص مطالعات زاننسکی[3] ۱۹۷۰، رولان، ۱۹۷۴ و ۱۹۷۷ نشان داده‌اند که در سلول‌های گیاهی در حال رشد ریز لوله‌های زیادی در سیتوپلاسم کناری، در مجاورت پلاسمالم وجود دارند (برخی کلیشه‌ها حتی عبور برخی از ریز لوله‌ها از پلاسمالم و امتداد آنها تا مجاورت دیواره را نشان می‌دهند)، این ریز لوله‌ها با جدیدترین میکروفیبریل‌های سلولزی دیواره هم جهت‌اند. برخی تصاویر (شکل ۶-۶۰) نشان می‌دهند که ریز لوله‌های مجاور با پلاسمالم به‌صورت گروه‌های ۵ یا ۶ تایی مجتمع شده‌اند. گرچه محل و جهت قرار گرفتن این ریز لوله‌ها موجب این نظر است که در برقراریِ نظم و آرایش میکروفیبریل‌های سلولزی دیواره نقش مهمی داشته باشند اما تاکنون هیچ نشانه مستقیمی از این دخالت گزارش نشده است.

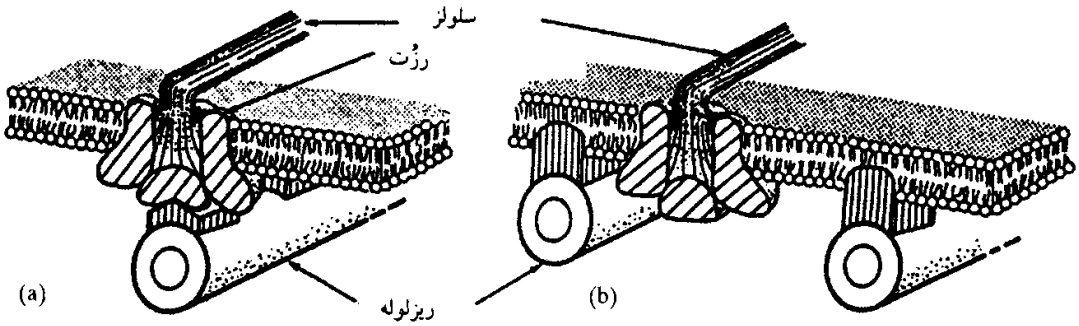
تصور کنونی این است که ریز لوله‌ها حداقل به دو شکل در آرایش میکرو- ماکروفیبریل‌های سلولزی دیواره دخالت می‌کنند:

1- H.Rajai 2- Ray 3- Czaninski

شکل ۶-۶۰. ریز لوله‌ها هنگام سازمان یافتن دیواره. ریز لوله‌ها به موازات آخرین میکروفیبریل‌های سلولزی دیواره قرار گرفته‌اند؛ به نظر می‌رسد که برخی ریز لوله‌ها از پلاسمالم گذشته‌اند (پیکان‌ها). درشت‌نمایی: شکل a ×۲۰۰۰۰ و شکل b ×۲۶۰۰۰

الف - از راه ارتباط مستقیم یا غیرمستقیم (با واسطه مولکول‌های پروتئینی) با مجموعه‌های آنزیمی سولز - سنتتازی غشاء سلولی، تغییر آرایش این مجموعه‌های آنزیمی و از این راه تعیین جهت آرایش میکرو - ماکروفیبریل‌های سلولزی (شکل ۶-۶۱، A).

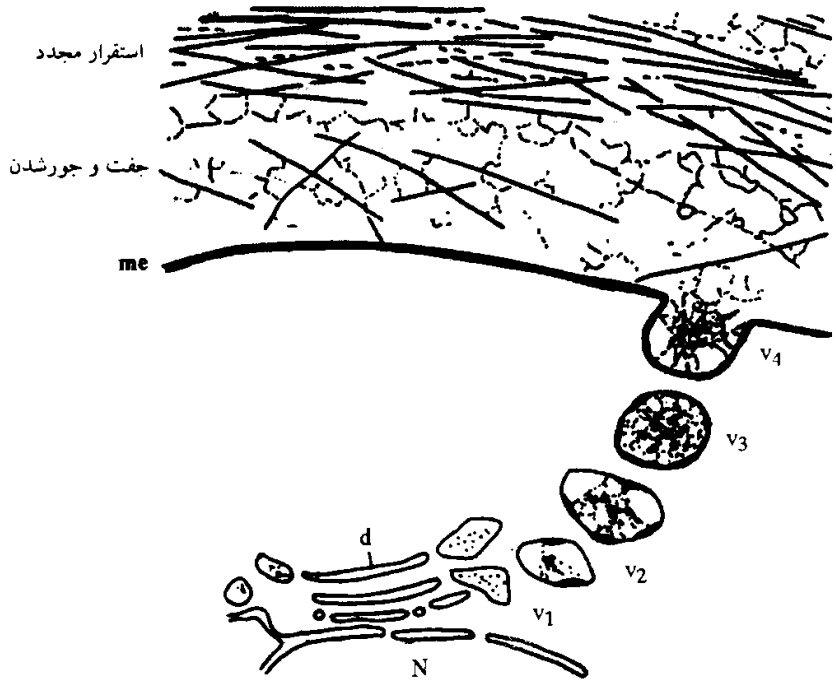
ب - تراکم و آرایش ویژه ریز لوله‌ها در مجاورت پلاسمالم حتی شبیه پیست اسکی را ایجاد می‌کند که مجموعه آنزیمی سلولز سنتتازی در این جایگاه قرار می‌گیرد و مواد پیش ساخت دیواره که به وسیله حفره‌های گلژی به



شکل ۶-۶۱. کنترل غشاء بر روی جهت آرایش سلولز به وسیله ریز لوله‌های حاشیه‌ای: دو نظریه. مجموعه سلولز سنتتازی (مجموعه ذرات پروتئینی درون غشایی با آرایش حلقوی) می‌تواند: a) به‌طور مستقیم و به کمک پروتئین‌های انقباضی با ریز لوله‌ها ارتباط داشته باشد. b) تنها در یک پیست (جایگاه) بین ریز لوله‌ای قرار گیرد. (گرفته شده از: L.A.Staelehing، ۱۹۸۸)

سوی پلاسمالم و سپس دیواره آورده می‌شوند نیز با سُر خوردن در این پیست جهت مشخصی را هم‌سو با آرایش ریز لوله‌ها پیدا می‌کنند و نیروی حاصل از این وضع، به آرایش هم جهت میکرو - ماکروفیبریل‌های سلولزی با ریز لوله‌ها کمک می‌کند (شکل ۶-۶۱، B).

ترکیبات جدیدی که به دیواره افزوده می‌شوند در اثر فعالیت شبکه آندوپلاسمی و به‌خصوص دستگاه گلژی فراهم آورده می‌شوند (مرحله گلژیی). پلیمریزاسیون پیش‌سازهای مواد ساختمانی دیواره در حفره‌های گلژی، انتقال این حفره‌ها به مجاورت پلاسمالم و تخلیه محتویاتشان به دیواره اسکلتی به وسیله پژوهشگران مختلف و پس از کاربرد روش‌های متفاوتی مشخص شده است (رولان، دیسون، بوا، وین[1]، ژنوس[2] و دیگران) (شکل ۶-۶۲).



شکل ۶-۶۲. بیوسنتز و ترشح مواد سازندهٔ دیوارهٔ غشای اکتوپلاسمی و غشای حفره‌های گلژیی (که با خط تیرهٔ ضخیم مشخص‌اند) یک گروه آنزیمی به وجود می‌آورند که به آنها امکان پلیمری کردن مواد اولیه دیواره را می‌دهد. این عناصر به وسیلهٔ دفع یاخته‌ای ترشح شده سپس مجتمع می‌شوند و در نهایت تغییر و تبدیل می‌یابند. N: هسته. d: دیکتیوزوم. V_1، V_2، V_3، V_4: مراحل تدریجی بلوغ حفره‌های گلژیی. me: غشای اکتوپلاسمی (گرفته شده از: ویان Vian و رولان، با تغییراتی که در آن داده شده است).

همچنین در جریان تشکیل لایه‌های دیواره، سیتوپلاسم کناری سلول و پلاسمالم فعالیت زیادی دارند و تغییر شکل و گسیختگی‌هایی در پلاسمالم دیده می‌شود.

شیگنون[3] (۷۴ - ۱۹۷۲) با بررسی تغییرات ساختمانی دیواره ضمن رشد طولی سریع میله پرچم‌های ذرت چنین نتیجه‌گیری می‌کند که قبل از مرحله رشد حقیقی سلول یک مرحله رسیدگی (بلوغ) وجود دارد که ضمن آن ترکیبات موجود قبلی دیواره دستخوش تغییر می‌شوند.

ترکیبات پکتیکی و همی سلولزی که (سیمان) یا ماده زمینه‌ای دیواره را می‌سازند به سرعت هیدرولیز می‌شوند و دیواره به‌طور موقت به این مواد آغشته می‌شود، در اواخر مرحله طویل شدن میکروفیبریل‌های سلولزی جدید در دیواره استقرار می‌یابند.

دیوارهٔ پسین (دوّم - ثانویه)

در برخی سلول‌ها دیوارهٔ اسکلتی در تمام عمر سلول به حالت دیواره اولیه باقی می‌ماند، در عده‌ای دیگر از سلول هاوقتی قابلیت رشد سلول پایان یافت، لایه‌های دیواره پسین که تعداد و ضخامت متفاوتی دارند در سطح

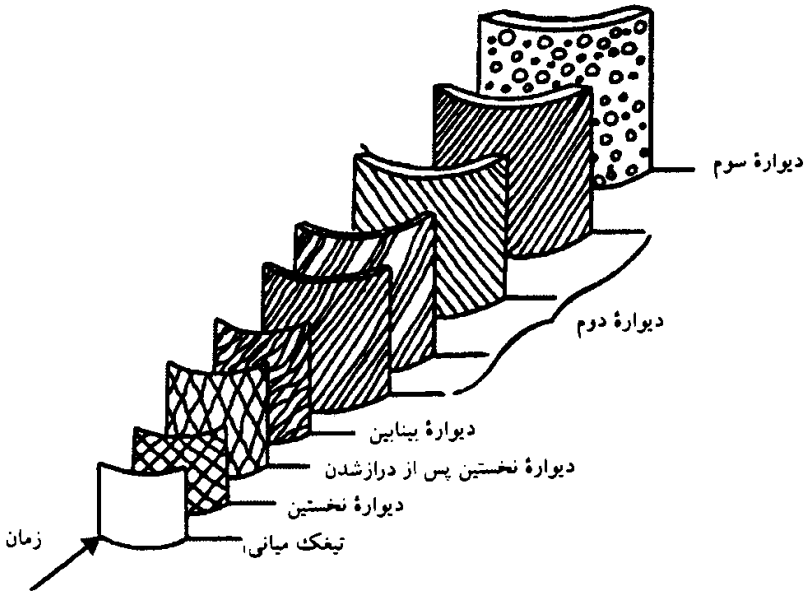
1- Vian 2- Genues 3- Cheignon

داخلی دیوارهٔ اولیه به‌تدریج تشکیل می‌شوند.

دیواره پسین با مقدار آب کمتر، و تراکم بیشتری از میکروفیبریل‌های سلولزی، مشخص می‌شود. هیچ ترکیب پکتیکی در دیواره پسین وجود ندارد و ماده سیمانی یا زمینه‌ای آن منحصراً از همی‌سلولزهاست. در لایه‌های جدیدتر دیواره پسین فضای اشغال شده به وسیله ماده زمینه‌ای به‌تدریج کاهش می‌یابد و بر تراکم میکروفیبریل‌های سلولزی افزوده می‌شود. لایه‌های دیواره پسین را با S_1، S_2، S_n نشان می‌دهند.

نحوه تشکیل میکروفیبریل‌های سلولزی، چگونگی استقرار و عوامل مؤثر در نظم و آرایش این میکروفیبریل‌ها در لایه‌های مختلف دیواره پسین همانند چگونگی تشکیل، ترشح و استقرار میکروفیبریل‌ها در لایه‌های جدید دیواره اولیه است یعنی با فعالیت شبکه آندوپلاسمی، دستگاه گلژی، جایگزین خاص ریز لوله‌ها در مجاورت پلاسمالم و تغییراتی در وضع پلاسمالم همراه است.

دیوارهٔ پسین به خاطر کاربردهای صنعتی که دارد موضوع مطالعات زیادی بوده است. این دیواره در تشکیل چوب، رشته‌های منسوجات، رشته‌های کاغذ، کاه، چوب پنبه وارد است. دیواره پسین ضخیم در تراکئیدهای چوب بازدانگان، کرک‌های پنبه، رشته‌های کتان و شاهدانه به خوبی مطالعه شده است. به نظر فری‌ویسلینگ و مولت‌هالر و بسیاری از پژوهشگران تغییر ساختمان و جهت میکرو - ماکروفیبریل‌های سلولزی در دیواره نظیر شکل ۶-۶۳ است.



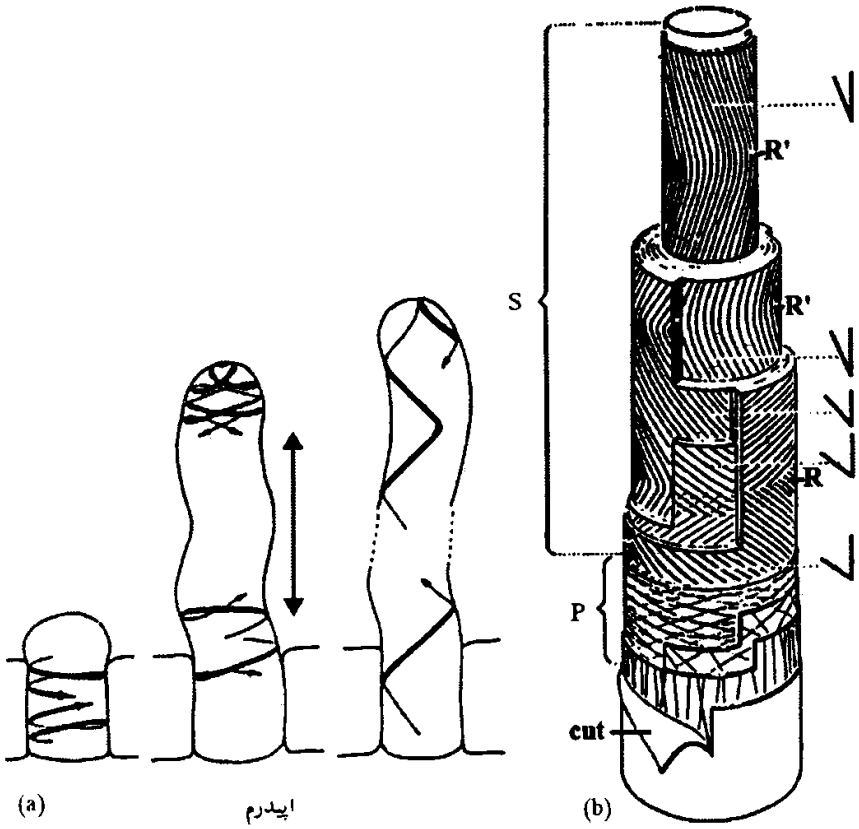
شکل ۶-۶۳. لایه‌های مختلف دیوارهٔ اسکلتی (گرفته شده از: مولت‌هالر).

تراکم میکروفیبریل‌ها در لایه‌های جدید دیواره بیشتر است. در دیواره اولیه فیبرهای سلولزی نامنظم‌اند! (نظری که همان‌طور که بیان شد هم‌اکنون مورد تردید است) و در لایه‌های مختلف دیواره ثانویه میکروفیبریل‌های هر یلایه با لایه دیگر زاویه ۴۳/۵ تا ۶۰ درجه یا محور آرایش فیبریل‌های یک لایه به لایه بعدی چرخش تا ۱۲۰ درجه دارد (استوارد[1] و مولت‌هالر، ۱۹۵۳).

دلیل این تغییرات منظم هنوز ناشناخته است اما بی‌تردید با آرایش ریز لوله‌های سیتوپلاسمی و مجموعه‌های آنزیمی سلولز سنتتازی وابسته است.

در پنبه، سطح دانه دارای الیاف، یا کرک‌های پنبه است. در برخی از نواحی سطح دانه، سلول‌های بشره‌ای از طرف سطح آزاد خود طویل می‌شوند و ابتدا به‌صورت برجستگی‌های کوچکی پدیدار می‌شوند که پس از

1- Steward



شکل ۶-۶۴. دیواره یک رشته پنبه. رشته انتهایی نامحدود. a) مراحل طویل شدن سلولی از اپیدرم تخمک. طول ابتدایی سلول، از ناحیه انتهایی چند هزار برابر افزایش می‌یابد. سلولزها حالت مارپیچی دارند (گرفته شده از: M.Willison، ۱۹۸۲). b) رسوب دیوارهٔ پسین، S، روی دیوارهٔ نخستین Cut.P: پوستک (گرفته شده از Waterkeyn، ۱۹۸۰) میکروفیبریل‌های سلولزی به‌صورت مارپیچی قرار دارند؛ آرایششان می‌تواند تغییر کند و می‌توانند نواحی تغییر جهتی را داشته باشند، P.R: دیوارهٔ نخستین؛ S، دیواره پسین.

طویل‌شدن به‌صورت «کرک» در می‌آیند. طول هر کرک ۱۰۰۰ تا ۳۰۰۰ برابر عرض آن است. ضمن طویل شدن هر یک از این سلول‌ها (کرک‌ها) دارای یک دیواره اولیه نازک است. از وقتی که رشد طولی کرک پایان می‌پذیرد، دیوارهٔ ثانویه در داخل دیوارهٔ اولیه تشکیل می‌شود که افزایش ضخامت آن تا زمان رسیدن میوه و دانه ادامه می‌یابد. دیوارهٔ ثانویه در هر یک از این سلول‌ها دارای ۲۵ لایه با ضخامت حدود ۰/۴ میکرون است، از آنجا که افزایش ضخامت دیواره ثانویه تا ۲۵ روز ادامه می‌یابد می‌توان هر لایه را مربوط به یک روز در نظر گرفت. (شکل ۶-۶۴).

شکل روبرو مراحل مختلف تشکیل از β گلوکز تا رسیدن به رشته قابل رؤیت با چشم در کرک پنبه را نشان می‌دهد. در حال حاضر این کرک‌ها تنها ماده زیستی هستند که ساختمان آنها از حد مولکولی تا رسیدن به حالت قابل رؤیت با چشم به دقّت مشخص شده است.

در مورد چگونگی ارتباط عوامل مختلف سازنده دیواره با یکدیگر و به عبارت دیگر آرایش مولکولی مواد دیواره‌ای طرح‌های مختلفی ارائه شده که از بین آنها دو طرح اهمیت بیشتری دارد.

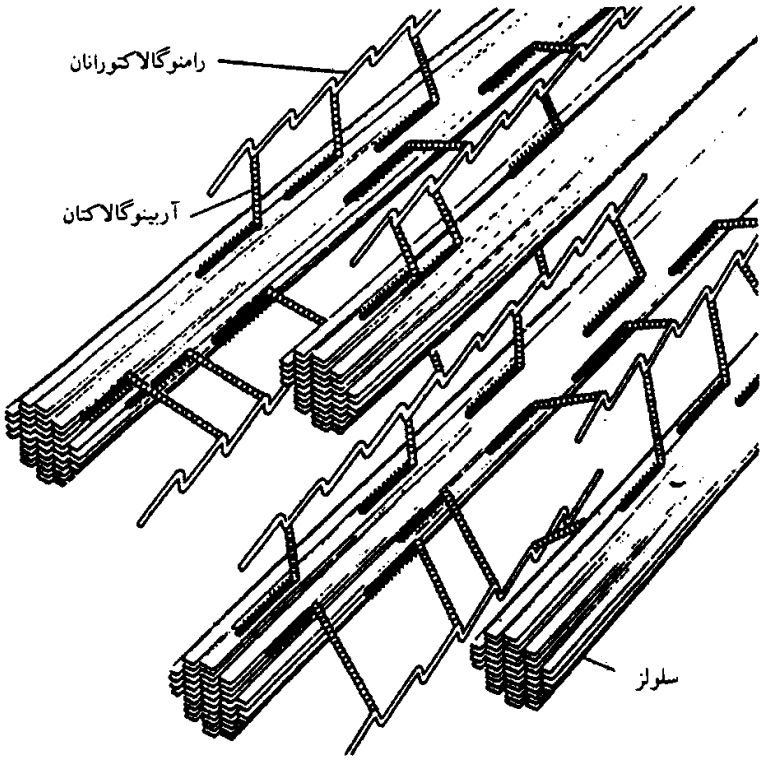
۱- طرح آلبرشیم[1]: این طرح از ۱۹۷۴ پیشنهاد شد و به‌صورت یک طرح متداول درآمد. این طرح به ویژه برای توضیح نظر ساختمان شبکه‌ای ممتد و بستهٔ دیواره که دارای دو نوع ارتباط است مورد استفاده

دیواره اولیه:
زنجیر B -گلوکوپیرانوز
↓
رشته اولیه (فیبر ابتدایی)
۱۰۰ زنجیر گلوکوپیرانوز
↓
میکروفیبریل

دیواره ثانویه:
(۲۰ رشته یا فیبر ابتدایی)
↓
ماکروفیبریل
(۲۵۰ میکروفیبریل)
↓
فیبر
(۱۵۰۰ فیبریل)

1- P.Albersheim

می‌باشد: یکی پیوندهای محکم کووالانسی که با دخالت آنزیم‌ها تشکیل یا گسسته می‌شوند و دیگری پیوندهای سست الکتروستاتیکی یا هیدروژنی که بین گزیلوگلوکان‌های مواد زمینه‌ای و سلولز میکروفیبریلی برقرار شده است. (شکل ۶-۶۵).

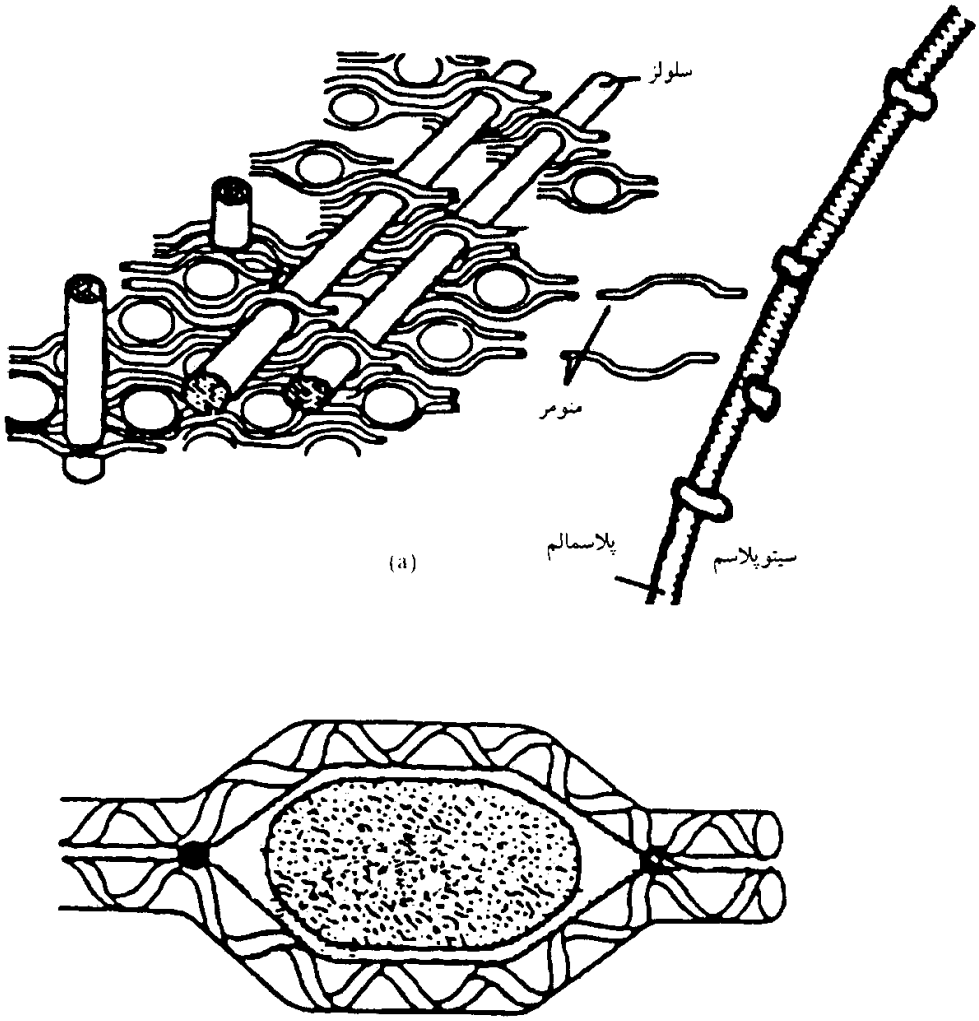


شکـــل ۶-۶۵. شبکه چندین مولکولی بنا به نظریه پ، آلبرشیم در یک نمای ترسیمی. میکروفیبریل‌های سلولزی به‌طور فشرده‌ای به وسیله گلزیلوگلوکان‌ها احاطه شده و با پیوندهای هیدروژنی به محورهای آنها پیوسته‌اند. همی سلولزها و پکتین‌ها با پیوندهای کووالانسی متصلند.

۲- نظریه د.ت. لامپورت[1]: در این مدل که جدیدتر و مربوط به سال ۱۹۸۵ می‌باشد، گلیکوپروتئین‌های اکستانسین یا HRGP[2]، مجموعه مشخصی را می‌سازند که با میکروفیبریل‌های سولزی تلاقی و تداخل دارند (شکل ۶-۶۶).

در برخی سلول‌ها بندرت، پس از تشکیل لایه‌های دیواره پسین، بخش‌های جدیدی به طرف پلاسمالم تشکیل می‌شود که آن را دیواره سومین[3] می‌نامند. دیواره سومین ساختمان لایه‌لایه ندارد، به‌صورت برجستگی‌های نامنظم به اشکال مختلف و موضعی است. این برجستگی‌ها اغلب از تراکم گزیلان‌ها، مانّان‌ها یا بقایای تجزیه شده سلولی تشکیل شده‌اند.

1- D.T.Lamport 2- Hydroxiprolin Rich Glycoprotein 3- Tertiary wall



شکل ۶-۶۶. بافت دیواره‌ای بنا به نظر د.ت.لامپورت a) نمای عمومی: میکروفیبریل‌های سلولزی با زمینه‌ای از اکستانسین تلاقی و تداخل دارند. زمینه از ترشحات محلول سیتوپلاسمی ایجاد شده است b) جزئیات یک میکروفیبریل سلولزی که در خمیره‌ای از اکستانسین فشرده شده است.

۷ سیتوزول[1] - اسکلت سلولی[2]

با همه مرزهای تفکیک‌کننده‌ای که در سلول وجود دارد، یک قالب یا بستر سیتوپلاسمی تمام فضاهای موجود بین اندامک‌هایی راکه به وسیله غشاء سلولی احاطه شده‌اند، پر می‌کند. این سیتوپلاسم زمینه‌ای سیتوزول است. اگر با اولتراسانتریفوگاسیون مرحله‌ای تمام اندامک‌ها حتی میکروزوم‌ها و ریبوزوم‌ها را هم از سیتوپلاسم جدا کنیم، بخشی شناور باقی می‌ماند که همان سیتوزول است. سیتوزول به ویژه در سلول‌های در حال تمایز اهمیت خاصی دارد. از آنجایی که پروتئین‌های سازنده ریزلوله‌ها [3] و ریزرشته‌ها[4] که اساس اسکلت سلولی‌اند در سیتوزول موجودند و تحولات ریزلوله‌ها و ریزرشته‌ها موجب تغییرات عمده‌ای در حالت سُل - ژل سیتوزول می‌شود، در مقدمهٔ این مبحث به معرفی اجمالی سیتوزول توجه می‌کنیم.

در سیتوزول پروتئین‌های محلول، پروتئین‌های آنزیمی، تمام آنزیم‌های گلیکولیز، آنزیم‌های فعال کنندهٔ اسیدهای امینه برای ورود به سنتز پروتئین‌ها، تمام ماشین سنتز پروتئین‌ها و دیگر بخش‌های محلول سیتوپلاسم وجود دارد. به‌طور کلی حدود ۲۰ تا ۲۵ درصد از کل پروتئین‌های سلول از جمله پروتئین‌های آنزیمی که به برخی از آنها اشاره شد در سیتوزول موجودند. آنزیم‌های بسیاری از واکنش‌های سلولی که به ATP نیاز دارند (بسیاری از بیسنتزها) و tRNAها بخش‌های دیگری از سیتوزول هستند. تغییر حالت سُل به ژل و به تَبَع آن تغییرات مختلفی از جمله تغییرات غلظت جنبش درون سلولی یا سیکلوز، حرکت آمیبی، تشکیل دوک تقسیم، جابه‌جایی کروموزوم‌ها، برخی از تغییر شکل‌های سلولی، تسهیم یا شکافتگی سلول و مانند آن به سیتوزول وابسته است.

در گذشته سیتوزول به‌صورت ماده‌ای همگن درنظر گرفته می‌شد تا این که در اواخر قرن نوزدهم مشخص گردید که در برخی سلول‌ها به ویژه سلول‌های ترشحی و سلول‌هایی که سنتز پروتئینی فعالی دارند، بعضی قسمت‌های سیتوزول باز دوست‌تر است و رنگ‌های بازی از جمله پیرونین را بهتر می‌پذیرد به همین دلیل بخش‌های بازدوست سیتوزول را سیتوپلاسم رنگ‌پذیر (کرومیدیال) نامیدند. در سال ۱۸۸۷ گارنیر کلمهٔ ارگاستوپلاسم[5] را برای بخش‌های بازوفیل سیتوپلاسم که به نظر او در بیوسنتز مواد نقش فعالی داشتند به کار برد. ارگاستوپلاسم، بخش‌های بازدوستی نظیر ذرات نیسل موجود در جسم سلولی سلول‌های عصبی، سیتوپلاسم فعال و بازدوست سلول‌های مخاطی و سلول‌های ترشحی لوزالمعده، غدد بناگوشی، سلول‌های اصلی غدد معدی و بخش‌های بازدوست سلول‌های کبدی را نیز شامل می‌شود.

کاسپرین، براشه و پژوهشگران دیگر نشان داده‌اند که بازدوستی زیاد ارگاستوپلاسم به دلیل وجود اسیدهای ریبونوکلئیک است و به همین دلیل با تأثیر ریبونوکلئازها این بازدوستی از بین می‌رود. از آنجا که اسیدهای ریبونوکلئیک سیتوپلاسمی به ویژه در ریبوزوم‌ها متراکمند، می‌توان بازدوستی و فعال بودن سنتز پروتئین‌ها در ارگاستوپلاسم را نتیجهٔ فراوانی ریبوزوم‌ها در این بخش از سیتوزول دانست.

در گذشته به جای سیتوزول بیشتر از کلمهٔ هیالوپلاسم استفاده می‌شد که خود نشانه‌ای از تصور همگن و شفاف بودن سیتوپلاسم زمینه‌ای بوده است، تصوری که امروزه دگرگون شده است.

1- Cytosol 2- Cytoskeleton 3- Microtubules 4- Microfilaments 5- Ergastoplasm

در سیتوزول ۸۵ درصد آب و حدود ۱۵ درصد مواد مختلف موجود است. از این مواد بخش عمده را پروتئین‌ها به ویژه پروتئین‌های آنزیمی، اسیدهای امینه، گلوکز، یون‌ها، mRNAها، tRNAها و به‌طور خلاصه تمام مولکول‌های لازم برای ایجاد انرژی و مواد لازم برای اعمال مختلف سلولی را شامل می‌شوند. پروتئین‌های سازنده اسکلت سلولی از جمله توبولین‌ها، آکتین‌ها، میوزین، تروپومیوزین[1]، تروپونین[2] نیز بخشی از پروتئین‌های موجود در سیتوزول‌اند. برخی مواد موجود در سیتوزول می‌توانند به نحوی تجمع یابند که به ساختمان‌های قابل رؤیت با میکروسکوپ الکترونی تغییر شکل دهند. از جمله این ذرات: گلیکوژن، گویچه‌های لیپیدی (سازنده واکوئل‌های دارای تری‌گلیسریدها که آنها را اسفروزم نامند) و پروتئین‌های اسکلت سلولی هستند که به‌صورت ریزلوله‌ها و ریزرشته‌ها سازمان می‌یابند. یادآوری این نکته جالب است که سانتریول‌ها، رشته‌های دوک تقسیم و حتی تاژک‌ها و مژک‌ها زیر بنای ساختمانی ریزلوله‌ای دارند.

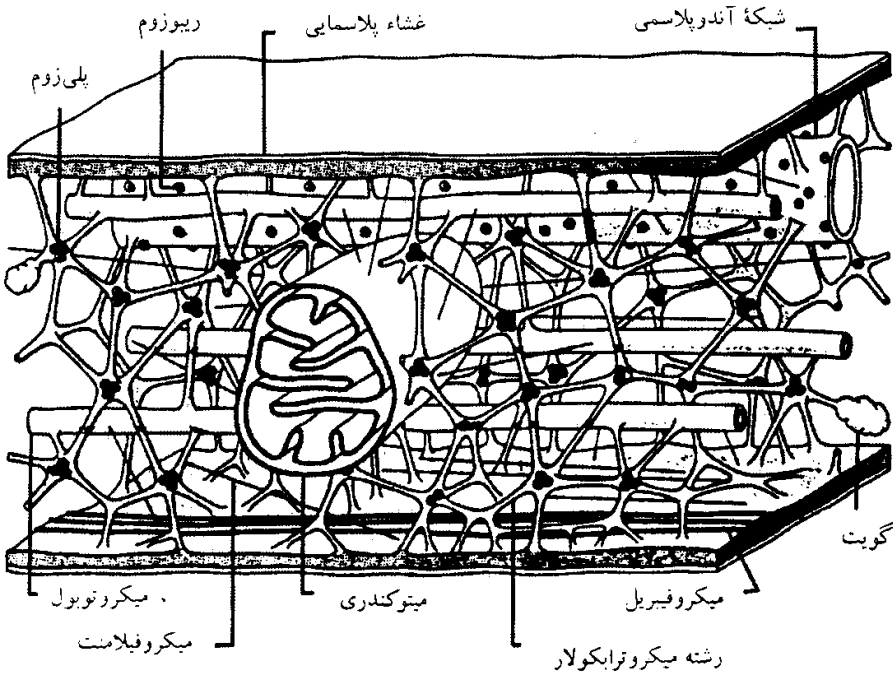
اسکلت سلولی

سلول‌های یوکاریوتی دارای اشکال متنوع و نیز درجه بالایی از سازمان یافتگی درونی‌اند. به‌علاوه این سلول‌ها قادر به تغییر شکل هستند، اندامک‌های درونی خود را جابه‌جا می‌کنند و می‌توانند از جایی به جای دیگر تغییر مکان دهند. این ویژگی ریختی، سازمان یافتگی درونی و امکان جابه‌جایی وابسته به شبکه درهمی از رشته‌های پروتئینی است که در سیتوپلاسم جای دارد و «اسکلت و عضله سلول» یا اسکلت سلولی را تشکیل می‌دهد. طرح نام اسکلت سلولی از سال‌های قبل صورت گرفت، اما به دلیل عدم امکان مشاهده سلولی با میکروسکوپ‌های نوری به فراموشی سپرده شد و حتی برخی پژوهشگران ساختمان‌های قابل رؤیت در سیتوزول را که با میکروسکوپ‌های نوری دیده می‌شدند به‌عنوان ساختمان‌های غیرحقیقی و ضایعات ناشی از عمل تثبیت و رنگ‌آمیزی سلول‌ها منظور داشتند. در سال ۱۹۲۸ کولتزوف برای اولین بار وجود یک ساختمان رشته‌ای منظم و سازمان یافته را در سیتوپلاسم اعلام کرد و از تجربیات خود چنین نتیجه گرفت که هر سلول دارای سیستمی متشکل از ترکیبات مایع و رشته‌های سختی است که موجب شکل آنند. اگر به ندرت رشته‌های اسکلتی را در سلول‌های زنده و یا در سلول‌های تثبیت شده می‌بینم به دلیل آن است که این رشته‌ها بسیار باریک‌اند و یا ضریب شکست آنها از محیط کلوئیدی اطرافشان اختلاف زیادی ندارد. مطالعات بعدی که با میکروسکوپ‌های الکترونی انجام شد، فرضیه کولتزوف را تأیید کرد و نشان داد که سیتوپلاسم سلول‌های یوکاریوتی دارای ساختمان‌های اسکلتی مشتمل بر ریزلوله‌ها و ریزرشته‌ها می‌باشد.

پیشرفت روش‌های مشاهده سلول‌ها با میکروسکوپ‌های الکترونی و نیز روش‌های مبتنی بر ایمونوفلوئور سانس وجود شبکه درهم رفته‌ای را که از مجموع ریزلوله‌ها، ریزرشته‌ها، رشته‌های بینابینی و رشته‌های نازک آکتینی با قطر حدود ۳ تا ۴ نانومتر در سیتوزول را نشان داده است که مجموع آنها در فضای سه بعُدی سلول شبکه میکروترابکولر[3] را به وجود می‌آورند. بسیاری از اجزای سلولی به ویژه ریبوزوم‌ها به اجزای این شبکه متصلّند و یا در بین آن محصور شده‌اند (شکل ۷-۱ و ۷-۲).

مطالعات ریخت‌شناسی و تجربی ساختمان‌های مذکور نشان می‌دهد که این اندامک‌ها در اعمال مختلف و رفتارهای سولی چون سیکلوز، حرکت آمیبی، میتوز و تقسیم سیتوپلاسم سلولی نقش اساسی دارند. به‌علاوه در ساختمان‌هایی مثل مژه‌ها، تاژک‌ها و سانتریول‌ها که در حرکات سلولی نقش عمده دارند نیز واردند (شکل ۷-۲).

1- Tropomiosine 2- Troponine 3- Microtrabecular lattice



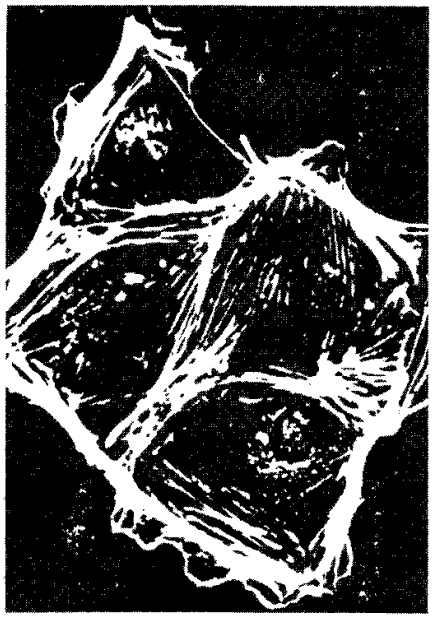
شکل ۷-۱. شبکه میکروترابکولر در سیتوپلاسم. اندامک‌های سلولی به این سیستم آویخته‌اند یا در بین آن محصور شده‌اند.

در سال‌های اخیر پیشرفت‌های زیادی در زمینه جداسازی پروتئینه‌های اسکلتی‌سلول حاصل شده و ترکیباتی چون توبولین، آکتین، میوزین، تروپومیوزین و مولکول‌های مشابه آنها از سلول‌ها استخراج شده‌اند. به‌علاوه آگاهی‌های زیادی از چگونگی اتصال و نحوه ردیف شدن و یا تفکیک واحدهای ساختمانی ریزلوله‌ها و ریزرشته‌ها به‌دست آمده است. پادتن‌های اختصاصی برای هر یک از پروتئین‌های مذکور ساخته شده و با فلوئورسان کردن این پروتئین‌ها به کمک پادتن‌ها، امکان بررسی محل و حتی جابه‌جایی ریزلوله‌ها و ریزرشته‌ها به وسیله میکروسکوپ‌های نوری و الکترونی فراهم شده است (شکل ۷-۳).

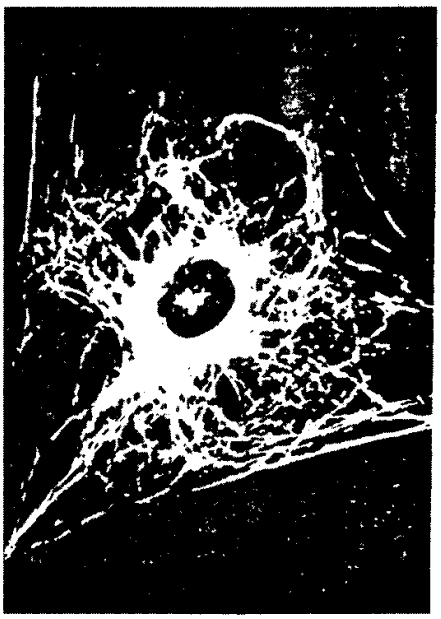
در حال حاضر نظر اکثر پژوهشگران این است که تنوع شکل سلول‌ها، تغییرات شکل یک سلول و تحرک سلولی وابسته به اسکلت سلولی و اعمال متقابل انواع مختلف ریزرشته‌ها است. بیشترین مطالعه در زمینه رابطه تحرک سلولی با اعمال متقابل ریزرشته‌ها مربوط به ریزرشته‌های عضلات مخطط است که در آنها ماکرومولکول‌های کاملاً تخصص یافته‌ای، اساس انقباض‌اند.

هم‌اکنون مسلم شده است که سلول‌های غیرعضلانی نیز با داشتن پروتئین‌های خاصی شبیه پروتئین‌های سلول‌های عضلانی، به حسب ضرورت، مکانیسم‌های مشابهی با سلول‌های عضلانی را به کار می‌گیرند. از آنجا که

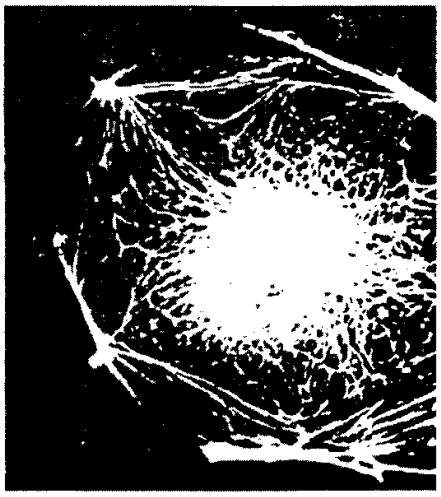
شکل ۷-۲. بخشی از یک سلول پس از ثابت کردن و خشک کردن. به منظور ظاهر شدن اسکلت سلولی، سلول‌ها قبل از ثابت کردن برای یک دقیقه در ۰/۱۵ درصد تریتون ۱۰۰-× عصاره‌گیری شده‌اند. فلش بزرگ: ریزلوله سرفلش بزرگ: ریزرشته ۱۰ نانومتری فلش کوچک: ریزرشته آکتین سرفلش کوچک: ریزرشته‌های ۳ نانومتری با طبیعت هنوز ناشناخته.



(a)



(b)



(c)

شکل ۷-۳. سیستم رشته‌ای اسکلت سولی یک سلول پوششی در محیط کشت. a) دسته‌های ریزرشته ۶ نانومتری ظاهر شده با آنتی‌بادی ضدآکتین. b) ریزلوله‌ای ۲۴ نانومتری، ظاهر شده با آنتی‌بادی ضدتوبولین. c) رشته حدواسط از نوع سیتوکراتین ۱۰ نانومتری، ظاهر شده با آنتی‌بادی ضدکراتین.

پروتئین‌های اصلی اسکلت سلولی شامل توبولین‌ها (در ریزلوله‌ها)، آکتین، میتوزین، تروپومیوزین و چند پروتئین وابسته دیگر (در ریزرشته‌ها) هستند و در عضلات نیز نظیر چنین پروتئین‌هایی وجود دارند. بنابراین پروتئین‌های مشابهی در انقباض عضلات و سلول‌های غیرعضلانی به کار گرفته می‌شود.

مهم‌ترین اجزای ساختمانی اسکلت سلولی رشته‌های آکتینی که آنها را ریزرشته‌ها نیز می‌نامند و ریزلوله‌ها هستند. هر دو نوع این ساختمان‌ها از زیر واحد (اجزای) پروتئینی گویچه‌ای تشکیل شده‌اند که می‌توانند به سرعت در سلول مجتمع یا پراکنده شوند. در اغلب سلول‌های جانوری نوع سومی از رشته‌های پروتئینی نیز وجود دارد که دارای ضخامتی حدواسط بین رشته‌های آکتینی و ریزلوله‌ها هستند و آنها را رشته‌های بینابینی نامند. این رشته‌ها نیز از واحدهای پروتئینی ساخته شده و از رشته‌های آکتینی و ریزلوله‌ها بسیار پایدارترند.

علاوه بر سه نوع اصلی از رشته‌های پروتئینی فوق‌الذکر، اسکلت سلولی دارای انواع مختلفی از «پروتئین‌های وابسته» است که موجب اتصال رشته‌ها با یکدیگر یا اتصال رشته‌ها با اجزای دیگر سلولی مثل غشاء سلولی هستند و یا بر سرعت پلیمریزاسیون و سازمان یافتن رشته‌های اسکلت سولی اثر می‌گذارند. برخی از پروتئین‌های وابسته

نیز به رشته‌های پروتئینی اسکلت سلولی ضمیمه شده و با تداخل عملی که با آنها دارند موجب جنبش‌های سلولی می‌شوند. دو مثال مشخص از این مورد، یکی انقباض عضله است که وابسته به رشته‌های آکتینی و میوزینی است و دیگری مژک‌ها و تاژک‌ها هستند که زیر بنای ساختمانشان ریزلوله است. گرچه این حرکات به کمک مجموعه‌ای از پروتئین‌های مختلف صورت می‌گیرد اما هر دو به هیدرولیز ATP و به سُر خوردن رشته‌های پروتئینی بر روی همدیگر وابسته است.

شبکه‌های رشته‌ای که مسئول حرکات عضلانی و حرکات مژکی هستند بسیار پایدار و سازمان یافته‌اند و به دلیل همین ویژگی‌ها، امکان شناسایی دقیق عوامل تشکیل دهندهٔ آنها و چگونگی عملشان فراهم‌تر بوده است. رشته‌های آکتینی سیتوپلاسمی و ریزلوله‌های سیتوپلاسمی، پایداری کمتری دارند و درجه سازمان یافتگی آنها نیز کمتر است. به کمک مجموعه رشته‌های سازندهٔ اسکلت سلولی، سلول‌ها سازمان فضایی خود را حفظ می‌کنند و در عین حال جابه‌جا می‌شوند.

ریزلوله‌ها

ریزلوله‌ها ساختمان‌های ظریفی هستند که تنها در سیتوپلاسم سلول‌های یوکاریوتی وجود دارند ویژگی آنها شکل لوله مانند و حالت یکنواختی ساختمانشان در همهٔ سلول‌ها است.

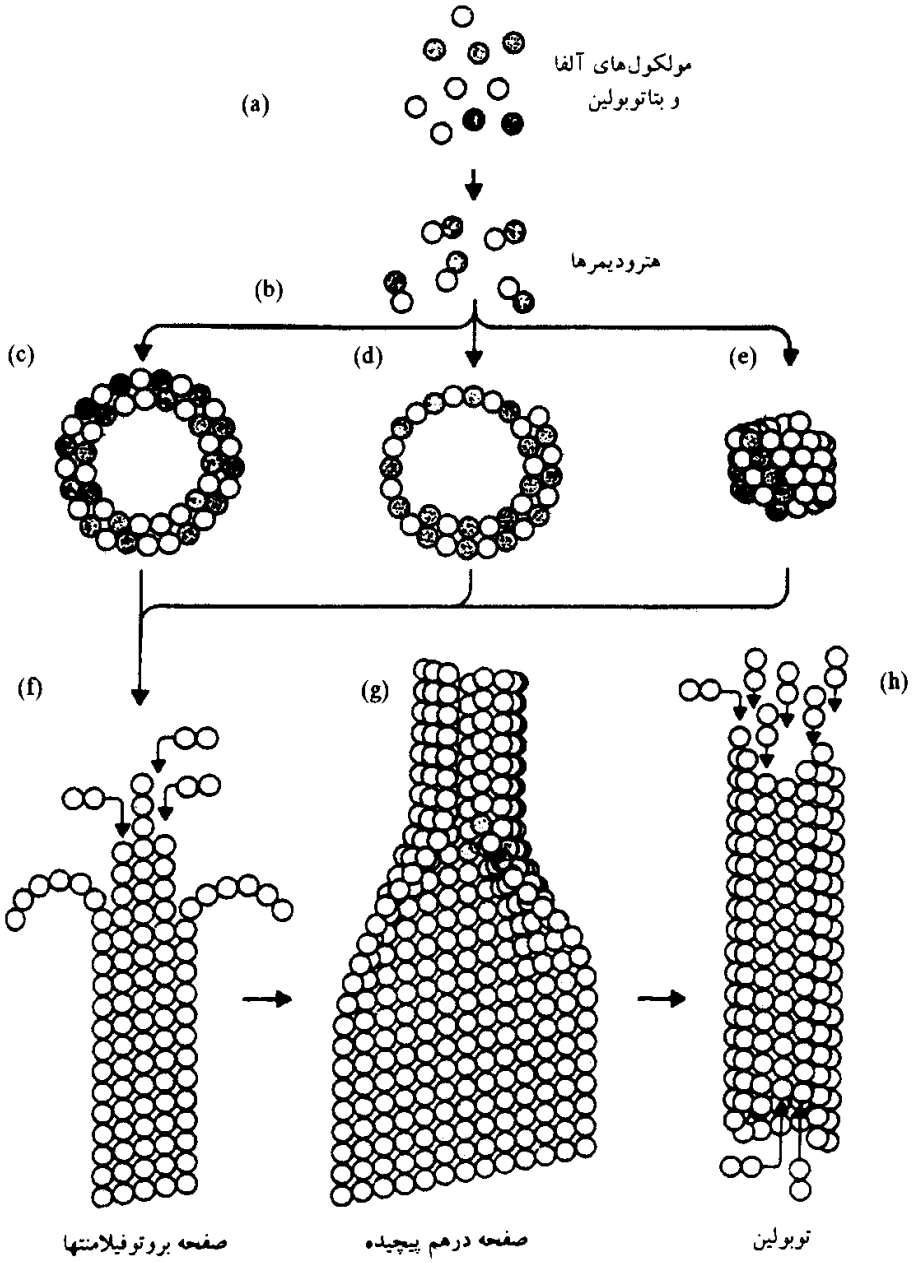
شناخت اولیه ریزلوله‌ها در سال ۱۹۵۳ به وسیله دوروبرتیس[1] و فرانکی[2] در سلول‌های عصبی بوده است. کشف ریزلوله‌ها با میکروسکوپ‌های الکترونی و پس از کاربرد فیکساتورهای مناسب مثل آلدئید گلوتاریک صورت گرفته است. این اندامک‌ها تشکیلات استوانه‌ای شکلی هستند که نوعی اسکلت را برای سلول تشکیل داده و در اعمال مختلفی به ویژه تحرک سلول، تمایز ریختی سلول‌ها، شکل ویژه هر سلول و انتقال مواد در سلول‌ها دخالت دارند (شکل ۷-۴).

ترکیب شیمیایی ریزلوله‌ها

ریزلوله‌ها اساساً از دیمرهای پروتئینی به اسم توبولین ساخته شده‌اند. پروتئین‌های مختلف دیگری نیز به اسم «پروتئین‌های وابسته MAP[3]» یا «پروتئین‌های ضمیمه» در ساختمان ریزلوله‌ها وجود دارند. پروتئین‌های وابسته به حسب نوع توبولین و ریزلوله تنوع دارند. پایداری و ناپایداری ریزلوله‌ها نیز مربوط به نوع «پروتئین‌های وابسته» آنهاست. ریزلوله‌ها حتّی در سلول‌های مختلف از زیر واحدهای (اجزای) پروتئینی مشابهی ساخته شده‌اند. کلمه توبولین که برای نامگذاری پروتئین‌های مژک‌ها و تاژک‌ها به کار گرفته می‌شود برای نامیدن پروتئین‌های ریزلوله‌ای سیتوپلاسمی نیز مورد استفاده است.

توبولین، دیمری (متشکل از دو منومر یا واحد ساختمانی) به وزن مولکولی ۱۲۰ - ۱۱۰ کیلودالتون است. منومرهای تشکیل دهنده توبولین اندازه مشابهی دارند و از زیر واحدهایی به اندازه ۶ × ۴ نانومتر ساخته شده‌اند (شکل ۷-۴). منومرهای تشکیل دهنده توبولین که آنها را توبولین‌های C و B یا I و II و یا a و b و یا α و β می‌نامند پلی‌پپتیدهای گویچه‌ای هستند که وزن مولکولی هر یک حدود ۵۰ کیلودالتون است. این منومرها اندازهٔ تقریباً یکسانی دارند و نوع و ترتیب اسیدهای امینه سازنده آنها نیز بسیار مشابه است و تنها اختلالات جزیی در برخی اسیدهای امینه منومرها وجود دارد.

1- De Robertis 2- Franchi 3- M.A.P. = Microtubules Associated Proteins



شکـــــل ۷-۴. تشکیل میکروتوبول‌ها. در مطالعات In vitro مولکول‌های آلفا و بتا توبولین a) به یکدیگر پیوسته و تشکیل هترودیمرها را می‌دهند. b). سپس هترودیمرها به یکدیگر متصل شده و ساختارهای حلقه‌ای، مارپیچی و یا حالاتی حدواسط را به‌وجود می‌آورند (e,d,c)، که در نهایت به صورت خطی در آمده و تشکیل پروتوفیلامنت‌ها را می‌دهند f) سپس از پهلو به پهلو قرارگرفتن پروتوفیلامنت‌ها، صفحه‌ای ایجاد می‌گردد g) طویل‌شدن ریزلوله که بدین نحو به‌وجود آمده با اضافه‌شدن مستقیم هترودیمرهای جدید به وقوع می‌پیوندد h).

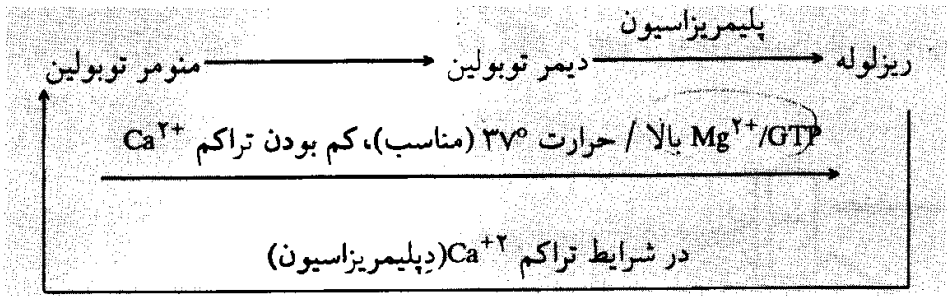
توبولین در اکثر موارد به‌صورت هترودیمری است که دارای دو منومر متفاوت (α و β) است.

توبولین فعالیت‌های آنزیمی نیز از خود نشان می‌دهد و مثلاً نقش پروتئین کینازی دارد. برخی تحقیقات نشان می‌دهند که توبولین علاوه بر این که مخزنی از دیمرهای آزاد است و در تشکیل ریزلوله‌ها سهم دارد می‌تواند بخش مهمی از برخی غشاها را نیز تشکیل دهد. یک دیمر توبولین با یک مولکول کولشی‌سینِ تریسیوم‌دار اتصال پیداکرده و این ویژگی امکان جابه‌جایی و بررسی‌های علمی در مورد توبولین را فراهم می‌سازد. توبولین با وینبلاستین، الکالوئیدی که از قارچ وینکا به‌دست می‌آید نیز اتصال پیدا می‌کند اما محل اتصالش با جای اتصال با کولشی‌سین متفاوت است. توبولینِ سیتوپلاسمی تحت تأثیر وینبلاستین حالت بلوری به خود می‌گیرد. در هموژنای سلولی، این ایکالوئید، توبولین را رسوب می‌دهد. با این ترتیب می‌توان به سرعت توبولین را به‌طور خالص جدا کرده (راه تصفیه).

سلول‌های جانوری و گیاهی هر دو دارای ریزلوله‌ها هستند و سیتوپلاسم اطراف ریزلوله‌ها فاقد ریبوزوم و سایر اندامک‌های سیتوپلاسمیَ است به همین جهت سیتوپلاسم مجاور هر ریزلوله تا حدّی روشن است. درون ریزلوله‌ها

تراکم زیادی ندارد و به اصطلاح گود یا خالی به‌نظر می‌رسد.

در سلول بین مقدار توبولین و تراکم ریزلوله‌ها توازنی وجود دارد. هرچه مقدار ریزلوله‌ها بیشتر شود تراکم توبولین کمتر می‌شود و بالعکس.



در سلول به حالت طبیعی، به کمک سانتریول‌ها، کینه‌توکور[1] کروموزوم‌ها، و با دخالت اجسام پایه‌ای مژک‌ها و تاژک‌ها پلیمریزاسیون توبولین به ریزلوله صورت می‌گیرد. پروتئین‌های وابسته ریزلوله‌ای که تعدادی از آنها جرم مولکولی زیادی (حدود ۲۸۰ کیلودالتون) دارند نیز در فرآیند تجمع ریزلوله‌ای دخالت می‌کنند.

در شرایط تجزیه رشته‌های دوک میتوزی و تبدیل آنها به ریزلوله‌ها، سازمان دوک میتوزی درهم می‌ریزد و موجب اختلال در تقسیم سلول‌ها می‌گردد. کولشی‌سین ترکیبی است که از پلیمریزاسیون ریزلوله‌ها جلوگیری می‌کند و تجزیه ریزلوله‌های موجود را به‌وسیله اتصال به واحدهای کوچک‌تر توبولین تسهیل می‌نماید (مشتق آن کولسمید[2] اثرات مشابهی دارد).

آندومیتوز نوعی تقسیم درون سلولی است که در آن دوک تشکیل می‌شود و DNA پلیمریزه می‌گردد ولی تقسیم سیتوپلاسمی صورت نمی‌گیرد و در نتیجه سلولی با دو برابر کروموزوم ایجاد می‌شود. کولشی‌سین با منومرهای سازنده ریزلوله امکان پیوستگی و اشتراک دارد. با کاربرد کولشی‌سین رادیواکتیو مشخص شده که پس از ورود کولشی‌سین به سلول، این ماده با پروتئینی در سیتوپلاسم که ضریب ثابت ته‌نشینی آن ۶S است مشترک می‌شود به همین جهت این پروتئین را به‌عنوان واحد منومری یا پروتئین زیر بنایی ساختمان ریزلوله‌ها در نظر می‌گیرند.

به دلیل قابلیت انکسار مضاعف نوری که ریزلوله‌ها دارند می‌توان با استفاده از میکروسکوپ‌های پولاریزن آنها را در سلول‌های زنده و به ویژه در حالت سازمان یافته به‌صورت رشته‌های دوکی میتوزی، مشاهده کرد.

در سلول‌های جانوری ساختمان‌های پروتئینی ویژه‌ای به اسم کینه‌توکورها که در طرفین سانترومر کروموزوم‌ها وجود دارند و نیز ناحیه پروتئینی اطراف سانتریول‌ها که آن را سانتروسفر نامند از مراکز سازماندهی ریزلوله‌ها و تشکیل رشته‌های دوکی‌میتوزی هستند. در سلول‌های گیاهی سانتریول و سانتروسفر وجود ندارد و تشکیل ریزلوله‌ها در ارتباط با کینه‌توکورها است.

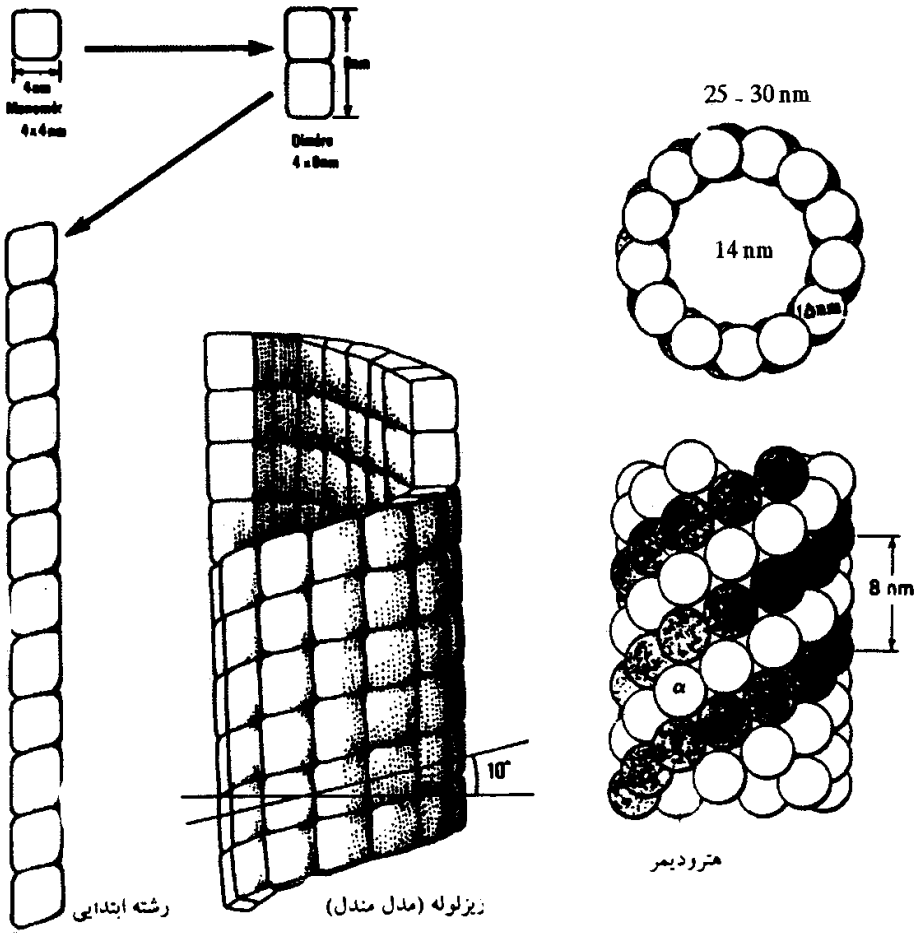
چگونگی سازمان یافتن و ویژگی‌های ساختمانی ریزلوله‌ها

گرد هم‌آمدن تجمع دیمرهای توبولینی به منظور تشکیل ریزلوله‌ها فرآیندی منظم، برنامه‌ریزی شده و غیراتفاقی است. سلول، دارای مراکز جهت دهنده و تنظیم‌کننده‌ای است که پلیمریزاسیون منومرهای توبولینی را هدایت می‌کنند. این مراکز عبارتند از: سانتریول‌ها، اجسام پایه‌ای (قاعده‌ای) مژک‌ها و تاژک‌ها و کینه‌توکورهای کروموزوم‌ها، پلیمریزاسیون واحدهای توبولینی به ریزلوله‌ها مراحلی را می‌گذارند و به شرایطی نیاز دارد که به‌طور

1- Kinetocore 2- Colcemide

کلی به این شرح است: ابتدا منومرهای توبولینی (β و α) به وسیله آنزیمی که یک کیناز وابسته به CAMP است آماده پلیمریزاسیون می‌شوند.

روش‌های مختلفی از جمله بررسی‌های انجام شده در سلول‌های پوششی کشت شده نشان داده است که CAMP، تشکیل ریزلوله‌ها را تحریک می‌کند. از پلیمریزاسیون واحدهای توبولینی، دیمرهای توبولینی تشکیل می‌شوند. این دیمرها می‌توانند به حالت همودیمر ($\alpha - \alpha$) یا ($\beta - \beta$) و یا به‌طور معمول از نوع هترودیمر ($\beta - \alpha$) باشند (مطابق شکل ۷-۵).

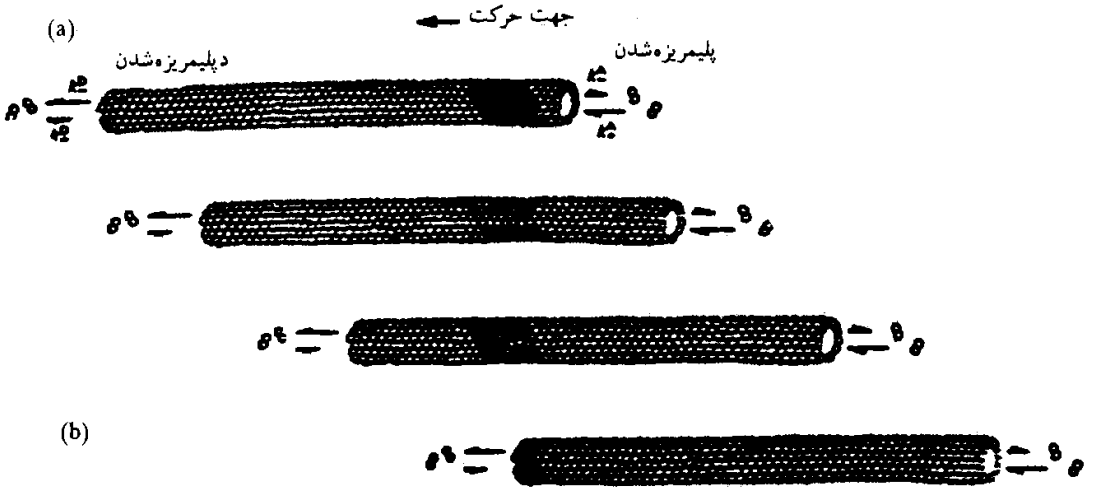


شکل ۷-۵. طرح سه بعدی یک ریزلوله و نمایش وضعیت زیر واحدهای سازندهٔ آن

منومرهای سازنده هر دیمر به‌طور الزامی در امتداد محور ساختمانی شیمیایی همدیگر قرار ندارند. هر دیمر توبولینی حدود ۸ نانومتر طول دارد و به نظر برخی پژوهشگران بخش‌های تکراری ۸ نانومتری (تناوب‌های ۸ نانومتری) که با میکروسکوپ الکترونی در دیواره ریزلوله‌ها دیده می‌شود، با همین دیمرهای توبولینی انطباق دارد (شکل ۷-۵). از پلیمریزاسیون تدریجی دیمرهای توبولینی مشروط بر آن غلظت Mg^{2+} کافی و غلظت Ca^{2+} زیاد نباشد، رشته ابتدایی تشکیل می‌شود (شکل ۷-۵).

از مجموع ۹ تا ۱۴ رشته ابتدایی توبولینی (به‌طور معمول ۱۳ رشته) یک ریزلوله ساخته می‌شود. رشته‌های ابتدایی به دو حالت مستقیم یا مارپیچی مجتمع می‌شوند (شکل ۷-۵). پلیمریزاسیون توبولین به انرژی زیادی نیاز ندارد، اما هیدرولیز نوکلئوزیدهای تری‌فسفاته ضمن این پلیمریزاسیون به مولکول‌های توبولین امکان تغییر شکل لازم برای چسبیدن و ورود به پلیمر را می‌دهد. در نهایت هر ریزلوله دارای دو سر می‌شود. در یکی از سرها که آن را سرمثبت نامند تجمع (پلیمریزاسیون) واحدهای سازنده توبولینی زیاد و تفکیک (دپلیمریزاسیون) کمتر است و

برعکس در سر دیگر یا سرمنفی، دپلیمریزاسیون شدید و پلیمریزاسیون واحدهای توبولینی کمتر است به نحوی که در مجموع سرعت تجمع و سرعت پراکنده شدن این واحدها مساوی می‌شود (شکل ۷-۶).



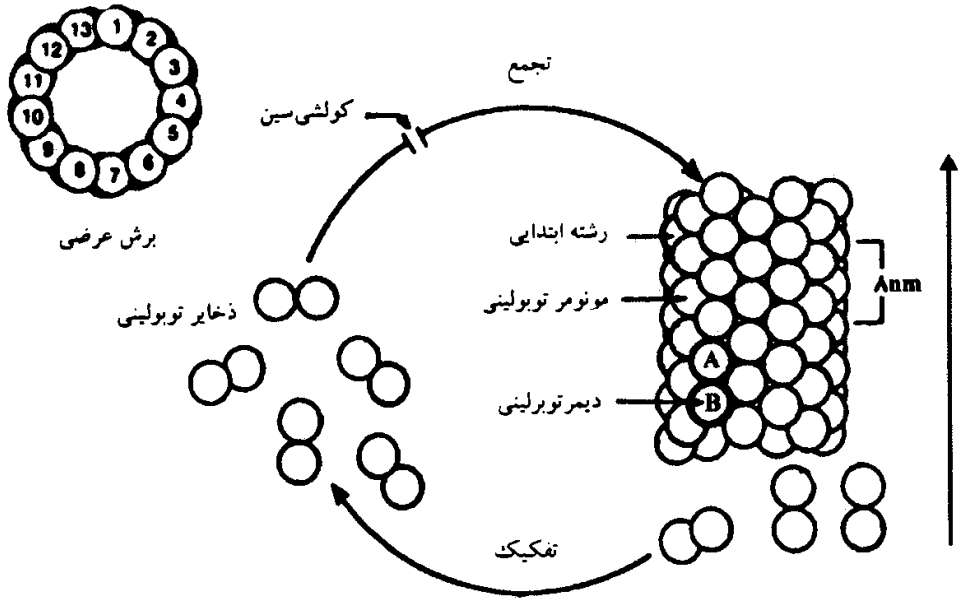
شکل ۷-۶. برخی از ویژگی‌های ریزلوله‌ها. در قسمت a) برش عرض و برش طولی ریزلوله و زیرواحدهای سازندهٔ آن یعنی توبولین مشاهده می‌شود. هر توبولین یک هترودیمر متشکل از توبولین α و توبولین βاست. ریزلوله‌ها در مقطع عرضی، دایره‌ای و در مقطع طولی استوانه‌ای دیده می‌شود. در قسمت b) مشاهده می‌شود که علیرغم این که ریزلوله ناپایدارند و به عبارت دیگر در یک پایانه پلیمریزه می‌شوند، لیکن طولشان همواره ثابت است.

پس از سازمان یافتن، هر ریزلوله به‌صورت لوله باریکی است که قطری حدود ۲۵ تا ۳۰ نانومتر و دیواره‌ای با قطر حدود ۵ نانومتر دارد. حفره مرکزی آن تراکم کمی دارد و قطرش به حدود ۱۴ نانومتر می‌رسد. قطر ریزلوله‌ها تقریباً یکسان است و طول آنها از یک تا چندین میکرون می‌رسد. ریزلوله‌ها انشعاب پیدا نمی‌کنند؛ اطرافشان از ترکیبات میتوز ولی کم تراکمی پوشیده شده که در آن اندامک‌های سیتوپلاسمی حتی ریبوزوم‌ها وجود ندارند. استفاده از روش رنگ‌آمیزی منفی (با اسیدفسفوتنگستیک)
نشان می‌دهد که دیوارهٔ هر ریزلوله از عده‌ای رشته‌های باریک موازی با محور لوله تشکیل شده است به عبارت دیگر دیوارهٔ ریزلوله از ساختمان‌های رشته‌ای مستقلی (رشته‌های ابتدایی توبولینی) ساخته شده که حالت مستقیم یا مارپیچی دارد (شکل ۷-۵ و شکل ۷-۶). قطر هر رشته ابتدایی حدود ۵ نانومتر است. این رشته‌ها به نوبهٔ خود از واحدهایی که همان دیمرهای توبولینی هستند تشکیل شده‌اند. تعداد رشته‌های ابتدایی در ریزلوله‌هایی که منشأ مشترک (واحدی) داشته باشند یکسان است اما از گونه‌ای به گونه دیگر تغییر می‌کند (این تغییرات از ۹ تا ۱۴ عدد می‌رسد). کولشی‌سین می‌تواند با دیمرهای سازنده هر رشتهٔ ابتدایی ترکیب شود و از تجمع آنها به‌صورت ریزلوله‌ها و بعد، هنگام تقسیم به‌صورت رشته‌های دوک جلوگیری کند. به همین دلیل است که کولشی‌سین تقسیم سلولی را در متافاز متوقف می‌سازد. هر دیمر توبولینی دارای جایگاه‌های اختصاصی برای اتصال با GTP و نیز با الکالوئیدهایی مثل کولشی‌سین، و ینبلاستین و پودوفیلین است که مانع پلیمریزاسیون و سازمان یافتن ریزلوله‌ها هستند. در برش‌های عرضی (عمود بر محور طولی ریزلوله‌ها) به‌طور معمول ۱۳ زیر واحد (جزء) ساختمانی که قطر هر یک حدود ۵ نانومتر است دیده می‌شود. این اجزاء برش عرضی = رشته‌های اولیه یا لوله‌های تشکیل دهنده ریزلوله را نشان می‌دهند (شکل ۱، ز). ریزلوله‌ها به هر شکل و از هر نوع که باشند (پایدار و ناپایدار) بسیار شبیه‌اند و اختلافشان مربوط به پروتئین‌های وابسته (ضمیمه) آنهاست.

اغلب ریزلوله‌های اینترفازی و میتوزی از سانتروزوم منشأ می‌گیرند. استفاده از کولشی‌سین در مرحله اینترفاز

نشان می‌دهد که همه ریزلوله‌های سیتوپلاسمی به جز ریزلوله‌های سانتریولی دپلیمریزه می‌شوند. با شستشوی کولشی‌سین، عمل پلیمریزاسیون دوباره آغاز شده و ریزلوله‌های جدید با دخالت سانتریول ساخته می‌شوند. در سلول‌های میتوزی نیز زمانی که ریزلوله‌های اینترفازی در اثر کولشی‌سین دپلیمریزه می‌گردند ریزلوله‌های جدید دوک میتوزی از سانتروزوم مشتق می‌شوند بنابراین ممکن است در یک زمان یک دسته ریزلوله در حال رشد بوده و در همان زمان دسته دیگر دپلیمریزه گردند. برای مثال در مرحله پروفاز تقسیم میتوز، ریزلوله‌های دوک میتوزی رشد می‌کنند، در حالی که ریزلوله‌های سیتوپلاسمی کوچک می‌شوند.

هر دیمرتوبولین $\alpha\beta$ به دو مولکول GTP متصل است اگر یکی از مولکول‌های GTP بعد از الحاق توبولین به ریزلوله هیدرولیز گردد و در صورتی که اغلب توبولین‌ها در انتهای رشد ریزلوله به همین صورت به آن اضافه شوند، این ریزلوله حالت ناپایداری داشته و به سرعت دپلیمریزه می‌گردد. اما اگر توبولین بعد از هیدرولیز GTP به GDP به انتهای ریزلوله متصل شود در این صورت ریزلوله نه تنها حالت پایدار می‌یابد بلکه به رشد خود نیز ادامه می‌دهد. بنابراین یکی از عوامل تعیین‌کننده پایداری ریزلوله‌ها سرعت هیدرولیز GTP به GDP است. در سرعت پایین، رشد ریزلوله ادامه می‌یابد. عامل دیگر تراکم توبولین آزاد است. در تراکم بالا رشد ریزلوله ادامه می‌یابد در حالی که تراکم پایین موجب تخریب انتهایی دارای GDP در سمت رشد شده بنابراین ریزلوله دپلیمریزه می‌گردد (شکل ۷-۷).



شکل ۷-۷. دیاگرامی از یک ریزلوله و فرآیند تجمع و پراکنش توبولین. بالا: برش عرضی از یک ریزلوله که ۱۳ رشته اولیه را نشان می‌دهد. پایین: نمای طولی که رشته‌های اولیه مارپیچی ساخته شده از دیمرهای توبولینی و قطبی‌شدن ریزلوله را نشان می‌دهد. مشاهده می‌شود که همزمان با پراکنده‌شدن دیمرها در قسمت پایین، در قسمت بالا دیمرهای توبولینی درحال مجتمع‌شدن هستند. کولشی‌سین با متوقف‌کردن جریان تجمع باعث دپلیمریزاسیون ریزلوله‌ها می‌شود.

پروتئین‌های وابسته (ضمیمه) به ریزلوله‌ها: (MAP_s)

عصاره پروتئینی استخراج شده از مغز، یکی از مواد بسیار مناسب برای بررسی بیوشیمی پلیمریزاسیون توبولین است. در ۳۷ درجه سانتیگراد واحدهای سازنده ریزلوله‌ها پلیمریزه می‌شوند و با سرد کردن مجدد محیط و رسیدن دما به ۵ درجه سانتیگراد پلیمریزه می‌گردند. در عین حالت ریزلوله‌هایی که با چندبار عمل پلیمریزاسیون، تصفیه و جداسازی شده‌اند تنها دارای توبولین نبوده‌اند بلکه حدود ۵ درصد آنها پروتئین‌های دیگری غیر از توبولین است که به‌طور کلی آنها را پروتئین‌های وابستهٔ ریزلوله‌ای نامند ($M.A.P_s$). تعدادی از این پروتئین‌های وابسته که وزن

مولکولی از ۵۵ تا ۳۰۰ هزار دالتون داشته‌اند را تاکنون جدا کرده‌اند.

گرچه نقش اختصاصی هر یک از این پروتئین‌ها هنوز شناخته نشده اما روشن است که این پروتئین‌ها در تجمع و جفت‌وجور شدن واحدهای ریزلوله‌ای دخالت دارند. در واقع وقتی توبولین بسیار خالص شده‌ای برای تشکیل ریزلوله‌ها به کار گرفته شود، ریزلوله‌ای به وجود نمی‌آید. نقش پروتئین‌های وابسته بیش از آن که کاتالیزوری (تسهیل‌کننده) در پلیمریزاسیون توبولین باشد، نقش ایجاد توازن بین وزن اتمی اجزای سازنده است.

یک نقش احتمالی دیگر پروتئین‌های وابسته، اتصال آنها به اندامک‌ها است به‌طوری که اگر این پروتئین‌ها را خراب کنیم، پیوستگی ریزلوله‌ها با اندامک‌ها قطع می‌شود و حرکات اندامک‌ها به خوبی انجام نمی‌شود. دسته دیگر از پروتئین‌های ریزلوله‌ها غیر از پروتئین‌های وابسته، پروتئین‌های تسریع‌کننده[1] هستند که اگر خراب شوند ریزلوله‌ها تشکیل می‌شوند اما با سرعتی کندتر و مقداری کمتر.

مراکز سازماندهی ریزلوله‌ها[2]

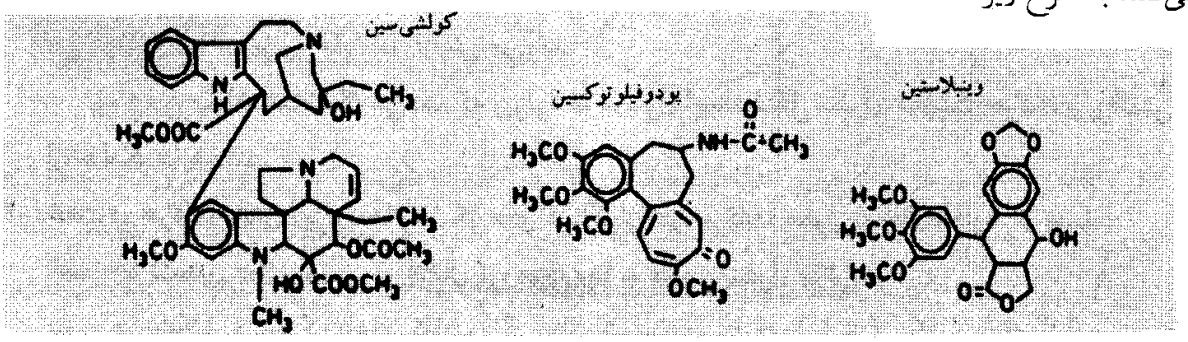
همان گونه که ضمن توضیح چگونگی سازمان‌یابی ریزلوله‌ها اشاره شد، مراکز مختلفی در سلول در سازماندهی ریزلوله‌ها سهم دارند و مکان‌هایی را برای شروع پلیمریزاسیون مونومرهای توبولینی پس از تشکیل مجموعه توبولین و GTP به وجود می‌آورند.

از مهم‌ترین این مراکز، نواحی پیرامونی سانتریولی در مجاورت هسته (ناحیه سانتروسفری) هستند که از آنها ریزلوله‌ها به‌صورت رشته‌های شعاعی (آستری)، به سمت سیتوزول رشد می‌کنند. از مراکز سازماندهی دیگر می‌توان اجسام قاعده‌ای تاژک‌ها و مژک‌ها که چگونگی تشکیل ریزلوله‌ها را کنترل می‌کنند، کینه‌توکور و کروموزوم‌ها، ماهواره‌های موجود بر لوله‌های بیرونیِ سانترویول و اجسام قاعده‌ای تاژک‌ها و مژک‌ها، هسته، کلاهک‌های قطبی سلول‌های گیاهی را نام برد. همان‌طور که شرح داده شده وجود پروتئین‌های وابسته به ریزلوله‌ها (MAP_s) و پروتئین‌های تسریع‌کننده (توپروتئین‌ها) نیز برای سازمان‌یافتن ریزلوله‌ها و سرعت طبیعی پلیمریزاسیون واحدهای سازندهٔ آنها لازم هستند.

ریزلوله‌ها را به‌طور کلی به دو گروه تقسیم می‌کنند:

الف - ریزلوله‌های پایدار[3]: این ریزلوله‌ها در برابر عمل فیکساتورها مقاوم هستند. در برابر کولشی‌سین، وینبلاستین[4]، پودوفیلین[5]، سیتوکالازین B و دمای کمتر از ۲ درجه سانتیگراد نیز مقاومت دارند. این ریزلوله‌ها در ساختمان‌های پیچیده‌ای مثل سانتریول‌ها، مژک‌ها و تاژک‌ها واردند.

فرمول شیمیایی برخی الکالوئیدهایی که از پلیمریزاسیون واحدهای توبولینی و تشکیل ریزلوله‌ها جلوگیری می‌کنند به شرح زیر است:



1- Tauprotein 2- Microtubule organizing centers 3- Constant Microtubules
4- Vinblastine 5- Podophiline

ب - ***ریزلوله‌های ناپایدار***[1]: ریزلوله‌های آزاد سیتوپلاسمی‌اند. مشاهده آنها تنها پس از استفاده از فیکساتورهای آلدئیدی و در دمایی بالاتر از ۴ درجه سانتیگراد امکان‌پذیر است. الکالوئیدها مثل کولشی‌سین، وینبلاستین، پودوفیلین و برخی مواد دارویی مثل سیتوکالازین B، با دپلیمریزه کردن آنها موجب ناپدید شدنشان می‌شوند. این ریزلوله‌ها در تمام سیتوپلاسم بدون این که جای خاصی داشته باشند پراکنده‌اند. رشته‌های ستاره‌ای (آستری) سانتریول‌ها به هنگام تقسیم هسته و رشته‌های دوک تقسیم را نیز تشکیل می‌دهند و در آکسون سلول‌های عصبی (نوروتوبول‌ها) هم موجودند.

اعمال ریزلوله‌های سیتوپلاسمی

۱- عمل مکانیکی: وضع برخی پدیده‌ها و نیز شکل برآمدگی‌های سلولی را وابسته به جهت آرایش و پراکنش ریزلوله‌ها می‌دانند. این برآمدگی‌ها به‌صورت چوب‌دستی منظور می‌شوند که به سلول شکل داده و می‌توانند محتویات خود را در سلول پراکنده سازند. تجمع ریزلوله‌ها برای ایجاد شکل خاصی در سلول‌ها و نیز برای سختی و پایداری برخی بخش‌های طویل شده سلول لازم است این وضعیت به ویژه در آکسون و دندریت‌ها مشخص است.

۲- ریخت زایی: نقش ریزلوله‌ها در ایجاد شکلی که سلول ضمن تمایز به خود می‌گیرد با عمل مکانیکی این اجزای سلولی وابسته است. برای مثال هنگام طویل شدن سلول‌ها طی تشکیل عدسی چشم، ریزلوله‌های زیادی پدیدار می‌شوند که با آرایش جهت‌دار خود موجب تغییر شکل و طویل‌شدن سلول‌های سازنده عدسی می‌شوند. تغییرات ریختی که در طی تشکیل سلول‌های جنسی نر صورت می‌گیرد مثال جالب دیگری از این نوع است. طویل شدن قابل توجه هسته اسپرماتید با آرایش جهت‌داری از ریزلوله‌ها همراه است در این هنگام ریزلوله‌ها در جهتی عمود بر محور هسته در اطراف آن می‌پیچند و حالت مارپیچ مضاعفی را به خود می‌گیرند. طویل شدن هسته ضمن تمایز اسپرماتید به اسپرماتوزوئید در رابطه با تشکّل منظّمی از ریزلوله‌ها است.

۳- قطبیت سلولی و تحرک: مشخص‌شدن قطبیت ذاتی برخی سلول‌ها نیز به عمل مکانیکی ریزلوله‌ها وابسته است. با تأثیر کلسمید (مشتقی از کولشی‌سین) به سلول‌های کشت شدهٔ مختلف، تغییری در جنبش‌های سلولی ایجاد می‌شود که اهم آن عبارتست از به‌هم خوردن وضع غشاء و ناهموار شدن آن، بی‌نظمی آندوسیتوز، به‌هم خوردن امکان اتصال سلول به سطوح، طویل شدن میکروویلی‌ها. حرکت جهشی ذرات کوچک پس از تخریب ریزلوله‌ها متوقف می‌شود ولی سُرخوردن جهت‌دار سلول‌ها با تخریب ریزلوله‌ها جای خود را به حرکت بی‌نظم یا اتفاقی می‌دهد. سلول‌های کشت شده‌ای که در آزمایشگاه تحت تأثیر دی‌بوتیریل CAMP قرار می‌گیرند، طویل می‌شوند و تعداد ریزلوله‌هایشان افزایش می‌یابد.

تمام این مشاهدات نشان می‌دهد که ریزلوله‌ها مسئول ایجاد شکل سلول، قطبیت حرکت و پراکنش عده‌ای از اندامک‌ها هستند.

۴- دخالت در حرکات سلولی: ریزلوله‌ها به شکل‌های گوناگونی در حرکات سلولی دخالت دارند از جمله:

الف - با تشکیل دوک تقسیم در انتقال کروموزوم‌ها به قطبین سلول مؤثرند.

ب - در تشکیل و تحرک پاهای کاذب (اگر به کمک سرما ریزلوله‌ها را خراب کنیم پاهای کاذب هم ناپدید می‌شوند).

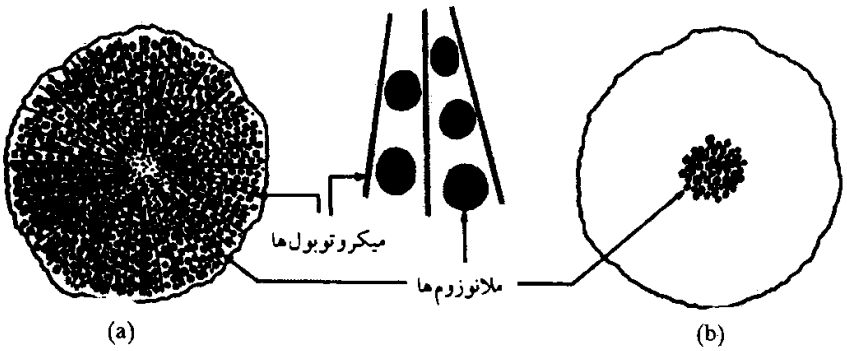
1- Nonconstant Microtubules

ج - در سیکلوز: تخریب ریزلوله‌ها با استفاده از الکالوئیدها موجب کندی و حتی توقف سیکلوز می‌شود. سیکلوز جنبش دائمی محتویات سلول زنده در جهات مختلف است که برای انجام آن به ATP نیاز می‌باشد و به همین دلیل عواملی که تنفس سلولی را کاهش‌دهنده و موجب کاهش سنتز ATP شوند، سرعت سیکلوز را کم می‌کنند. پس از مرگ سلول سیکلوز متوقف می‌شود. در گذشته که سیکلوز در سلول‌های گیاهی دارای واکوئل بزرگ مرکزی مشاهده شده بود، چنین تصور شده بود که محتویات سلول زنده، سلول را دور می‌زند و به هیمن دلیل نام سیکلوز برای این حرکت پیشنهاد شده بود. هم‌اکنون گرچه واژه سیکلوز به کار گرفته می‌شود اما می‌دانیم که سیکلوز حرکتی در جهات مختلف است و الزاماً چرخشی نیست. تراکم و جهت آرایش ریزلوله‌ها و نیز ریزرشته‌ها در جهت و سرعت سیکلوز دخالت دارد و تعیین‌کننده است.

د - ریزلوله‌ها همانند ریل‌های قطار در جابه‌جایی و حرکت اندامک‌ها (اصطکاک را کم می‌کنند) نقش دارند.

هـ- سازماندهی و حرکات تاژه‌ها و مژه‌ها

۵-گردش و انتقال مواد: ریزلوله‌ها ممکن است در انتقال ماکرومولکول‌ها در درون سلول نیز دخالت نمایند. با توجه به این عمل به احتمال مجاری باریکی را در سیتوپلاسم تشکیل می‌دهند. مثال جالبی از این مورد مربوط به تک یاختهٔ اکتینوسفریوم[1] (از هلیوزوئرها[2]) است که پاهای کاذب بلندی تشکیل می‌دهد که در آنها ذرات کوچک سیتوپلاسمی از سویی به سوی دیگر (به جلو و عقب) حرکت می‌کنند. این پاهای کاذب تا حدود ۵۰۰ ریزلوله دارند که به حالت مارپیچی قرار گرفته‌اند. وقتی این تک‌سلولی در سرما یا فشار زیاد قرار گیرد پاهای کاذب جمع می‌شوند و ریزلوله‌ها دپلیمریزه می‌گردند. مثال دیگری که ارتباط بین ریزلوله‌ها و انتقال ذرات مواد در سلول را نشان می‌دهد، در سلول‌های ملانین‌ساز یا ملانوسیت هاست. در این سلول‌ها برحسب محرک‌های مختلف، ذرات ملانین با جنبشی از نوع گریز از مرکز یا به سوی مرکز جابه‌جا می‌شوند. مشاهدات انجام شده در این نوع سلول‌ها نشان می‌دهد که ذرات ملانین از مجاری باریکی که به وسیله ریزلوله‌ها در سیتوزول ایجاد شده است انتقال می‌یابند. در اریترفورهای فلس‌های ماهی ذرات رنگیزه‌ای می‌توانند با سرعتی از ۳۰ - ۲۵ میکرومتر در ثانیه از بین ریزلوله‌ها بگذرند(شکل ۷-۸).



شکل ۷-۸. اریترفور a) مرحله پراکنش ملانوزوم‌ها؛ ریزلوله‌ها پرشمار هستند و موجب ردیف شدن شعاعی رنگدانه‌ها می‌شوند b) رنگدانه‌ها در بخش میانی سلول که هیچ ریزلوله‌ای ندارد، جمع شده‌اند.

در رابطه با دخالت در جابه‌جایی اندامک‌ها، برای مثال در جلبک ماژستیا[3] که دارای کلروپلاست نواری شکل بزرگی است ریزلوله‌ها با دخالت در چرخش آن موجب می‌شوند که سطح کلروپلاست در معرض تابش نور قرار گیرد. استفاده از بازدارنده‌های ریزلوله‌ای نظیر کولشی‌سین، چرخش کلروپلاست را ممانعت می‌نماید. ریزلوله‌ها به احتمال با دخالت در سیالیّت سیتوپلاسم در این عمل دخالت می‌کنند بدین صورت که

1- Actinospherium 2- Helizoaire 3- Mogestia

پلیمریزاسیون ریزلوله‌ها باعث افزایش غلظت یا چسبندگی[1] سیتوپلاسم شده و در نتیجه با قرار دادن کلروپلاست در معرض نور، چرخش آن را متوقف می‌کند و بالعکس، دپلیمریزاسیون ریزلوله‌ها باعث افزایش سیالیّت سیتوپلاسم و در نتیجه چرخش کلروپلاست می‌گردد.

در چرخش کلروپلاست در جلبک ماژستیا علاوه بر ریزلوله‌ها، ریزرشته‌های آکتینی نیز دخالت دارند. مکانیسم عمل این رشته‌ها بدین صورت است که تابش نور قرمز (R) باعث تغییری در فیتوکرم[2] شده و آن را از حالت Pr به Pfr تبدیل می‌کند. شکل Pfr فیتوکرم، به احتمال با تغییر در نفوذپذیری غشاء موجب ورود Ca^{2+} به درون سیتوپلاسم می‌گردد. کلسیم نیز از طریق پروتئین کالمودولین[3] به پلیمریزاسیون ریزرشته‌ها اثر گذاشته و موجب سازمان یافتن مجدد این رشته‌ها می‌گردد. سپس ریزرشته‌ها با اتصال به کلروپلاست مانع چرخش آن شده و در نتیجه کلروپلاست را در معرض تابش نور قرار می‌دهند.

فیتوکرم پیگمان پذیرنده نوری است که به دو فرم فعال یا غیرفعال وجود دارد. فرم غیرفعال با جذب نور با طول موج ۶۶۰ نانومتر به فرم فعال تبدیل می‌شود. فرم فعال نیز با دریافت نور با طول موج ۷۳۰ نانومتر به فرم غیرفعال تبدیل می‌شود.

۶- انتقال حس: دستجات منظم و مشترک ریزلوله‌ها در گیرنده‌هایِ حسی شناخته شده‌اند و چنین تصور می‌شود که این ریزلوله‌ها در انتقال انواع مختلف انرژیی که به گیرنده‌های حسی می‌رسند مؤثر باشند.

۷- دخالت در تقسیم سلولی: ریزلوله‌های سازندهٔ رشته‌های دوکیِ میتوزی، با دخالت در جابه‌جایی رشته‌های کروموزومی به قطبین سلول در تقسیم هسته دخالت دارند و نیز با تشکیل رشته‌های دوکی تقسیم سیتوپلاسم که به ویژه در سلول‌های گیاهی از اواسط آنافاز سازمان می‌یابند در تقسیم سیتوپلاسم شرکت می‌کنند. مطالعات سال‌های اخیر نشان داده است که تشکیل مجموعه‌های ریزلوله‌ای به‌عنوان حلقه‌های پیش پروفازی ریزلوله‌ای در تعیین محل و جهت دوک میتوزی و سپس دوک تقسیم سیتوپلاسم نقش اساسی دارند و از این راه نیز، ریزلوله‌ها در تقسیم سلولی دخالت می‌کنند (Mineyukietal, 1988).

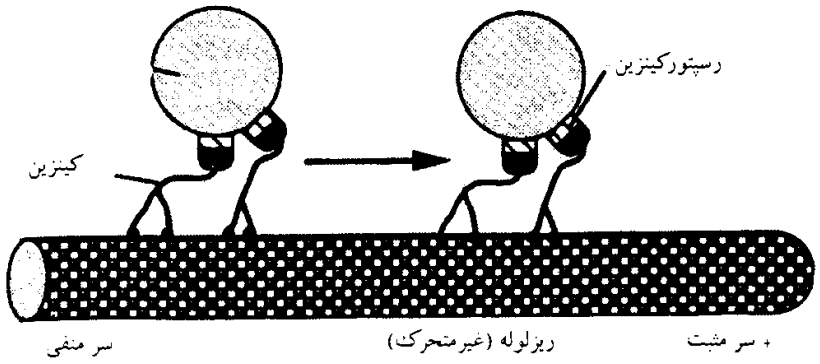
۸- دخالت در نظم و آرایش میکروفیبریل‌های سلولزی در دیواره اسکلتی سلول‌های گیاهی: تحقیقات زانسکی که با میکروسکوپ‌های الکترونی در سلول‌های گیاهی انجام شده نشان می‌دهد که ضمن تشکیل و افزایش ضخامت دیواره اسکلتی ریزلوله‌ها به‌صورت دستجات ۶-۲ تایی در بخش‌های پیرامونی سلول متراکم شده به سیتوپلاسم فشار آورده موجب ناهمواری‌ها و برآمدگی‌هایی در پلاسمالم می‌شوند و حتی برخی از آنها از پلاسمالم می‌گذرند. در هر لحظه زمانی که سلول‌ها را به کمک فیکساتورها، تثبیت کنیم و پس از تیمارهای لازم از آنها برش تهیه نماییم، با میکروسکوپ الکترونی در برش‌ها همواره ریزلوله‌ها را هم‌سو با آخرین (جدیدترین) میکروفیبریل‌های سلولزی دیواره‌ای می‌بینیم. تراکم ریزلوله‌ها در سیتوپلاسم پیرامونی، فشار آنها به پلاسمالم و هم‌سویی آنها در هر لحظه با آخرین میکروفیبریل‌های سلولزی دیوارهٔ اسکلتی دلیل دخالت ریزلوله‌ها در آرایش میکروفیبریل‌های دیواره‌ای است (به بخش دیواره فصل ۶ مراجعه شود).

۹- دخالت در جنبش‌های سلولی: دخالت ریزلوله‌ها در جنبش‌های سلولی به روش‌های مختلف و به ویژه با استفاده از الکالوئیدها و مواد مخدّری که پلیمریزاسیون و سازمان یافتن آنها را متوقف می‌سازد، بررسی و مشخص شده است. این بررسی‌ها نشان می‌دهد که نبود ریزلوله‌ها موجب توقف جنبش‌های سلولی می‌شود.

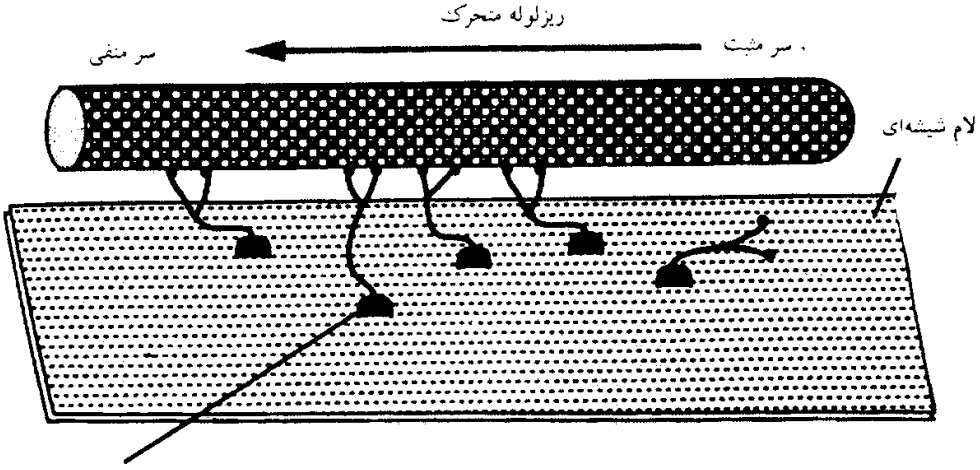
در سال‌های اخیر نقش پروتئین‌های جنبشی وابسته به ریزلوله‌ها مورد توجه زیادی قرار گرفته است.

1- Viscosity 2- Phytochrome 3- Calmodulin

از جمله کینزین[1] از سلول‌های عصبی جدا شده است. این پروتئین از ۴ پلی‌پپتید تشکیل شده است. یک سر آن به کمک گیرنده‌های اختصاصی به حفره‌های ترشحی و انتهای دیگر آن به ریزلوله‌ها متصل می‌شود. شکل ۷-۹ نشان می‌دهد که چگونه پروتئینی از نوع کینزین می‌تواند در جابه‌جایی درون سلولی حفره‌ها (برای مثال حفره‌های ترشحی) در طول (امتداد) ریزلوله‌ها و یا در جابه‌جایی خود ریزلوله‌ها دخالت کند. مکانیسم واقعی این جنبش‌ها هنوز به خوبی شناخته نشده است.



(a)



(b)

شکل ۷-۹. فرضیه نشان دهنده نقش کینزین به‌عنوان «پروتئین جنبشی» ریزلوله‌ها. a) انتقال حفره‌ها در طول یک ریزلوله از سر (-) تا سر (+). حفره به کینزین که در طول ریزلوله ثابت «سُر می‌خورد» متصل شده است. ATP برای چنین جابه‌جایی ضرورت دارد. b) جابه‌جایی یک ریزلوله با ۱۰۰۵واسطه کینزین با حضور ATP. مولکول‌های کینزین به لام شیشه‌ای ثابت شده‌ای چسبیده‌اند. این مولکول‌ها بر سطح لام شیشه‌ای به سوی سر (+) ریزلوله سُر می‌خورند.

اندامک‌های ریزلوله‌ای

اندامک‌های زیادی از اجتماع و سازمان یافتگی ریزلوله‌ها تشکیل می‌شوند. مژک‌ها، تاژک‌ها که از ضمایم حرکتی عده‌ای از تک‌سلولی‌ها (مژکداران و تاژکداران) هستند یا وسیله‌ای برای جابه‌جایی محیط و مواد اطراف سلول‌ها می‌باشند همچنین سانتریول‌ها، اجسام قاعده‌ای تاژک‌ها و مژک‌ها زیربنای ساختمانی زیرلوله‌ای دارند. رشته‌های دوک میتوزی که با هدایت کروموزوم‌ها به قطبین در تقسیم سلولی نقش اساسی دارند نیز ساختمان ریزلوله‌ای دارند. در این بحث به بررسی کلی اندامک‌های ریزلوله‌ای می‌پردازیم.

1- Kinesine

سانتریول‌ها

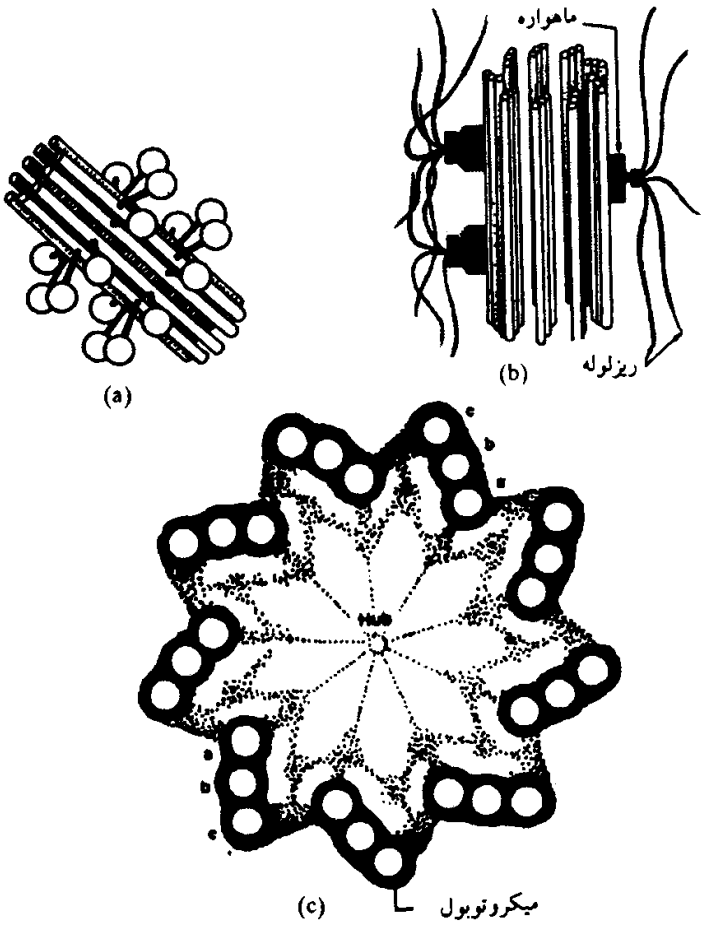
سانتریول‌ها اجزای سلولی لوله مانندی هستند که در تمام سلول‌های جانوری، در گیاهان ابتدایی و عده زیادی از جلبک‌ها به جز جلبک‌های قرمز وجود دارند. برخی از تک یاختگان بدون مژک و تاژک مثل آمیب نیز فاقد سانتریول هستند. نقش اصلی سانتریول‌ها دخالت در سازمان‌دهی ریزلوله‌ها، سازمان‌دهی تاژک‌ها و مژک‌ها، کنترل برخی حرکات سلولی و به احتمال دخالت در سازمان‌دهی رشته‌هایی از دوک میتوزی و تقسیم سلولی است. بایستی در نظر داشت که تمام سلول‌هایی که دوک میتوزی تشکیل می‌دهند الزاماً سانتریول ندارند (برای مثال سلول‌های گیاهان پیشرفته).

هر سانتریول به‌صورت استوانه‌ای به قطر حدود ۰/۲ میکرون و طول حدود ۰/۵ میکرون است. طول سانتریول گاهی تا ۲ میکرون می‌رسد. دو طرف سانتریول باز است. در اطراف آن غشایی وجود ندارد و سیتوپلاسم اطراف آن کم تراکم و در نمای میکروسکوپی کمی روشن است و اندامک‌های زیادی ندارد. برای هر سانتریول دو سر یا قطب در نظر می‌گیرند، سر یا قطب پیشین[1] که به هسته نزدیک‌تر است یا در سلول موقعیت درونی‌تری دارد و سر یا قطب پسین[2] که کمی از هسته دورتر یا خارجی‌تر است. به ترتیبی که خواهیم دید فراساختمان دو سر سانتریول یکسان نیست و در سر پیشین ساختمان پروتئینی ویژه‌ای شبیه چرخ گاری وجود دارد.

فراساختمان سانتریول

بدنه سانتریول از ۹ مجموعه سه ریزلوله‌ای (تریپلت[3]) تشکیل شده است هر تریپلت دارای سه ریزلوله a(مرکزی)، b (میانی) و c(خارجی) است. ریزلوله a کامل و دارای ۱۳ رشته ابتدایی توبولینی است، لوله b و c کامل نیستند، در برش عرضی هلالی یا شبیه حرف c هستند. هر یک از دو ریزلوله اخیر در ۳ تا ۴ رشته ابتدایی توبولینی با ریزلوله مجاور و طرف داخل خود مشترک است (شکل ۷-۱۰). مجموعه ریزلوله‌های سانتریولی در ماده زمینه‌ای[4] که عملاً بخشی از سیتوزول است قرار دارند. لوله a از هر تریپلت به وسیله بخش پروتئینی متراکمی با ریزلوله c در تریپلت مجاور خود پیوسته است این پل‌های پروتئینی در پایداری ساختمان سانتریول و حفظ تشکل ساختمانی آن مؤثرند.

در هر تریپلت، سه ریزلوله در امتداد



شکل ۷-۱۰. a و b. مواد پیش سانتریولی. a) ماهواره‌های پیش سانتریولی که به حالتی شبیه سه گویچه دیده می‌شود. b) سانتریول‌ها دارای زوائد لایه‌لایه‌ای هستند. c) نمای فراساختمانی سانتریول در برش عرضی.

1- Proximale Pole 2- Distale Pole 3- Triplet 4- Matrix

مستقیمی نسبت به‌هم قرار ندارند در نتیجه مرکز هر ریزلوله با مرکز ریزلوله مجاور خود حدود ۱۰ تا ۱۵ درجه زاویه دارد و موجب می‌شود هر تریپلت کمی خمیده و مجموعه ۹ تریپلت نیز حالتی شبیه پره‌های فرفره داشته باشند (شکل ۷-۱۰).

در فراساختمان سانتریول ریزلوله‌های مرکزی وجود ندارد و فضای درونی سانتریول از ماده زمینه‌ای پر شده است.

همان‌طور که در صفحات قبل اشاره شد فراساختمان سانتریول با جسم قاعده‌ای مژک و تاژک یکی است. در سر پیشین این ساختمان‌های سلولی ساختمان پروتئینی شبیه چرخ گاری وجود دارد در این ساختمان رشته‌های پروتئینی شعاعی از ریزلوله‌های a در هر تریپلت تا یک بخش پروتئینی مرکزی که همانند استوانه‌ای کوتاه و کوچک است کشیده شده‌اند. همه رشته‌های شعاعی در یک سطح به استوانه پروتئینی مرکزی نچسبیده‌اند (شکل ۷-۱۰).

بر روی ریزلوله c از هر تریپلت سانتریولی در سطوح مختلف برآمدگی‌های کوچک کروی شکل پروتئنی به اسم ماهواره با پایه‌ای کوتاه (پروتئینی) چسبیده‌اند. برخی پژوهشگران این ماهواره‌ها را از مراکز مهم سازمان‌دهی ریزلوله‌ها می‌دانند.

منشأ سانتریول

در مورد منشأ سانتریول نظریات مختلفی مطرح شده است. بررسی‌های سیتوشیمی وجود نواحی را که با رنگ‌آمیزی به روش فولگن رنگ می‌شوند نشان داده است و بر این بنا برخی پژوهشگران وجود DNA در ترکیب شیمیایی سانتریول را مطرح کرده و برای سانتریول قابلیت تقسیم در نظر گرفته‌اند. این نظر که سانتریول‌ها قابلیت تقسیم دارند هم‌اکنون کنار گذاشته شده است.

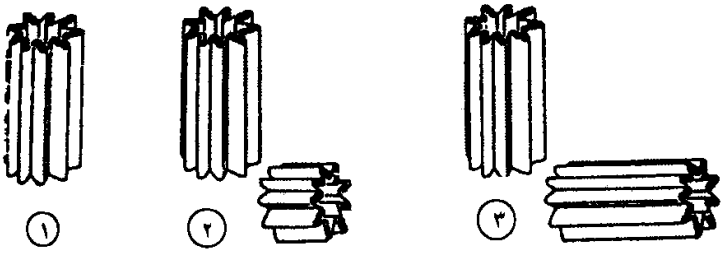
روی ریزنگاره‌های الکترونی نشان داده شده که هنگام تشکیل سانتریول جدید، ابتدا در مجاورت سر پیشین سانتریول قبلی تراکم تدریجی از ریزلوله‌ها صورت می‌گیرد. این عمل با پدیدار شدن یک ریزلوله در ماده زمینه‌ای بی‌شکلی در مجاورت سر پیشین سانتریول قبلی آغاز می‌شود و ریزلوله‌های جدید یکی پس از دیگری اضافه می‌شوند تا از مجموعه آنها پیش سانتریول[1] تشکیل می‌شود و این در حالی است که از تراکم ماده زمینه‌ای به‌تدریج کم می‌شود.

وقتی طول پیش سانتریول به حدود نصف سانتریول اولیه رسید، از سانتریول اولیه مستقل می‌شود و با تکمیل ساختمان خود یا به‌صورت سانتریول جدیدی درمی‌آید که با سانتریول قبلی به حالت دیپلوزوم (دو سانتریول عمود بر هم را که شبیه حرف L قرار دارند دیپلوزوم نامند) درمی‌آید یا به سوی بخش‌های پیرامونی سیتوزول مهاجرت کرده، به‌صورت جسم قاعده‌ای مژک و تاژک درمی‌آید (شکل ۷-۱۱) مراحلی از تشکیل سانتریول را نشان می‌دهد.

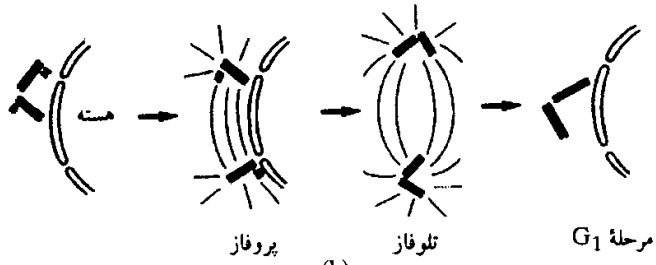
در سلول‌های مژکدار مهره‌داران که دارای چند صد مژک هستند سانتریول‌های هر سلول به شدت در تشکیل اجسام قاعده‌ای جدید درگیر هستند. برای مثال در جریان تمایز سلول‌های پوششی مژکدار مخاط لوله تخمک‌بر (اویدوکت) یا مخاط نای، جفت سانتریول از محل اصلی خود در مجاورت هسته جابه‌جا شده به سوی سطح آزاد سلول‌ها که در آنجا مژک‌ها تشکیل می‌شوند مهاجرت می‌کنند و در این ناحیه به جای آن که هر سانتریول منحصراً سانتریول جدیدی را به وجود آورد، هر سانتریول دارای تعداد زیادی «ماهواره‌های» متراکم می‌شود، این ماهواره‌ها اجسام قاعده‌ای زیادی را به وجود می‌آورند که به طرف غشاء مهاجرت کرده و منشأ تشکیل مژک‌ها می‌شوند.

نظریه دیگر در مورد منشأ سانتریول‌ها «نوپدیدی[2]» آنهاست. برای مثال گرچه به نظر می‌رسد در تخمک‌های لقاح نیافته برخی گونه‌ها، سانتریول‌های عمل‌کننده‌ای وجود ندارد و این تخمک‌ها پس از لقاح از سانتریول

1- Procentriole 2- De Novo



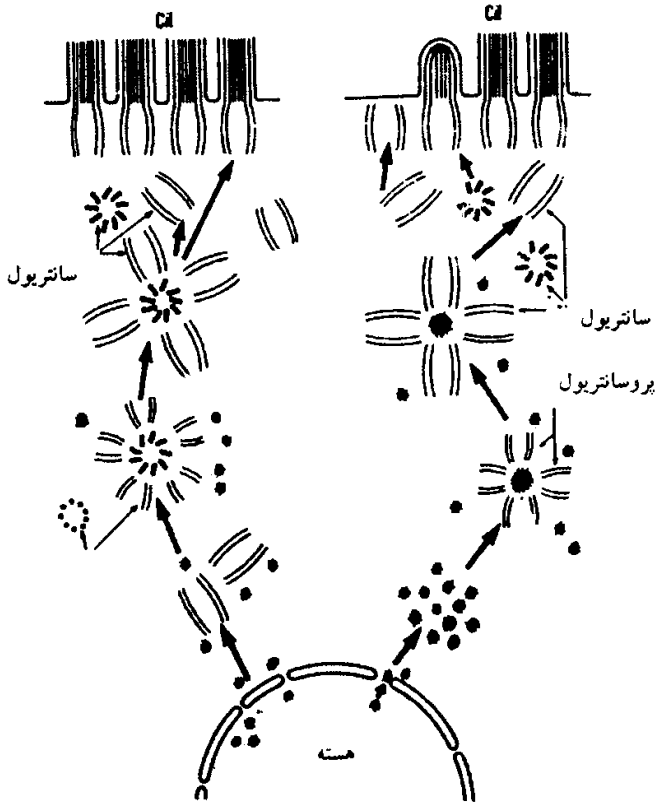
(a)



(b)

شکل ۷-۱۱. نمایش مراحلی از تشکیل سانتریول. a) سه مرحله پشت‌سرهم از تشکیل سانتریول به‌صورت طرحی ساده b) چرخه زمانی تشکیل سانتریول جدید و ایجاد دیپلوزوم

اسپرماتوزوئید برای تقسیم خود استفاده می‌کنند اما در برخی شرایط مثل عدم توازن یون‌ها در محیط اطراف تخمک یا تحریک‌های الکتریکی، تخمک لقاح نیافته می‌تواند تعداد متغیری به وجود آورد که هر کدام برای تشکیل آستر کوچکی به کار گرفته می‌شود و تقسیمات تخمک انجام می‌شود و در فرآیند بکرزایی جاندار هاپلوئیدی را به وجود می‌آورد. این بررسی‌ها موجب پیدایش این نظر شده که بایستی در سیتوپلاسم تخمک لقاح نیافته پیش‌سازی برای سانتریول وجود داشته باشد.



شکل ۷-۱۲. منشأ دوتروزومی سانتریول در رابطه با هسته

بالاخره نظر دیگری در مورد منشأ سانتریول‌ها، منشأ دوتروزومی[1] آنهاست. بر بنای این نظر که هم‌اکنون کمتر مورد توجه است ذرات پروتئینی متراکمی به نام دوتروزوم‌ها از منافذ پوشش هسته‌ای گذشته به سیتوپلاسم می‌رسند و به‌عنوان کانون‌های سازمان‌دهی سانتریول موجب تجمع و سازمان‌یابی ریزلوله‌ها و تشکیل سانتریول‌های جدید می‌شوند. (شکل ۷-۱۲).

نقش زیستی سانتریول

برای سانتریول‌ها اعمال مختلفی به شرح زیر در نظر گرفته شده است:

۱- به‌عنوان مراکزی برای سازمان‌دهی ریزلوله‌ها

1- Deuterosome

۲- سازمان‌دهی رشته‌های دوکی آستری هنگام تقسیم سلولی
۳- دخالت در جهت‌یابی و تشکیل دوک میتوزی
۴- تشکیل سانتریول‌های جدید و اجسام قاعده‌ای تاژک‌ها و مژک‌ها
۵- دخالت در تقسیم سلولی از راه تشکیل دوک و کمک به انتقال کروموزوم‌ها به قطبین سلول

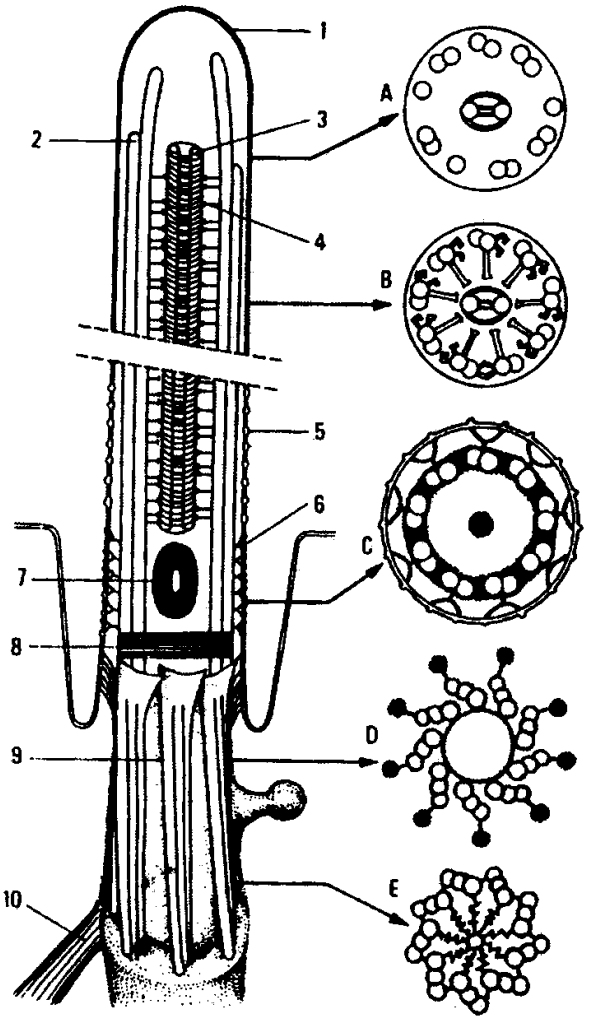
در سلول‌های گیاهان پیشرفته که سانتریول ندارند، رشته‌های آستری دیده نمی‌شود و دیگر رشته‌های دوک میتوزی همگرایی کمتری دارند. در عین حال آزمون‌های دقیق به کمک روش‌های ایمونوفلوئورسانس و نیز کاربرد مواد نشانه گذار نشان داده است که اغلب ریزلوله‌های سیتوپلاسمی به‌طور مستقیم از سانتریول‌ها تشکیل نمی‌شوند بلکه از ماده متراکمی به اسم «ماده دور سانتریولی» که به‌صورت ماده‌ای متراکم با میکروسکوپ‌های الکترونی در اطراف سانتریول‌ها قابل تشخیص است، سازمان می‌یابند. در سلول‌هایی هم که سانتریول ندارند، ریزلوله‌ها از ماده‌ای از نوع «ماده دور سانتریولی» که مرکز واقعی سازمان‌دهی ریزلوله‌های سیتوپلاسمی است تشکیل می‌شوند.

تجربیات مختلفی موجب شده که در سلول‌های جانوری سانتریول‌ها را به‌عنوان مراکزی در نظر بگیرند که موقعیت دقیق «ماده دور سانتریولی» و قطبیت پایه‌ای هر سلول را مشخص می‌سازند.

دستگاه مژکی - مژک - تاژک - اجسام قاعده‌ای و ریشه‌های مژکی

بخش‌های اصلی دستگاه مژکی عبارتند از: ۱- ساقهٔ مژکی[1] به‌صورت بخشی باریک، استوانه‌ای و پوشیده شده به غشاء سلولی است که در سطح آزاد سلول قرار دارد؛ ۲- جسم قاعده‌ای[2] که به‌صورت یک اندامک درون سلولی مشابه با سانتریول و مشتقّی از آن است؛ ۳- صفحه یا سینی مژکی[3]، ۴- در برخی سلول‌ها، رشته‌های نازکی که آنها را ریشه‌های مژکی نامند از جسم قاعده‌ای به‌صورت مخروطی که نوک باریک آن به سوی هسته است تا مجاورت هسته کشیده شده‌اند (شکل ۷-۱۳).

اجسام قاعده‌ای اغلب در بخش پیرامونی سیتوپلاسم و زیر غشاء سلولی قرار دارند و به‌طور معمول به صورتی موازی با هم و با فواصل یکسان قرار گرفته‌اند.



شکل ۷-۱۳. نمای ساختمان یک مژک ۱- غشاء سلولی؛ ۲- مجموعه دو لوله کناری (دابلت)؛ ۳- لوله‌های مرکزی که به وسیله پوشش (غلافی) احاطه شده‌اند؛ ۴- رشته‌های شعاعی؛ ۵- ذرات درون غشایی (ناحیه پیشین غشاء مژکی)؛ ۶- طوق یا گردن‌بند؛ ۷- حفره مژکی؛ ۸- صفحه یا سینی مژکی؛ ۹- جسم قاعده‌ای؛ ۱۰- ریشه مژکی.

1- Axoneme 2- Basal body 3- Cilia place

مژک‌ها و تاژک‌ها، ساختمان‌هایی بسیار ظریفند که قطر آنها اغلب در پایین‌ترین حدّ دید میکروسکوپ‌های نوری است.

پوشش‌های زیادی دارای ضمایمی شبیه مژک‌ها هستند اما ثابتند (بی‌حرکتند). این ضمایم را مژک‌نما، یا مژک‌های ثابت[1] نامند؛ برای مثال پوشش اپی دیدیم. در لکه‌ها و تاج‌های شنوایی گوش داخلی نیز علاوه بر مژک‌های متحرک[2]، تعدادی مژک‌نما وجود دارد. مژک نماها فاقد ریزلوله‌ها هستند.

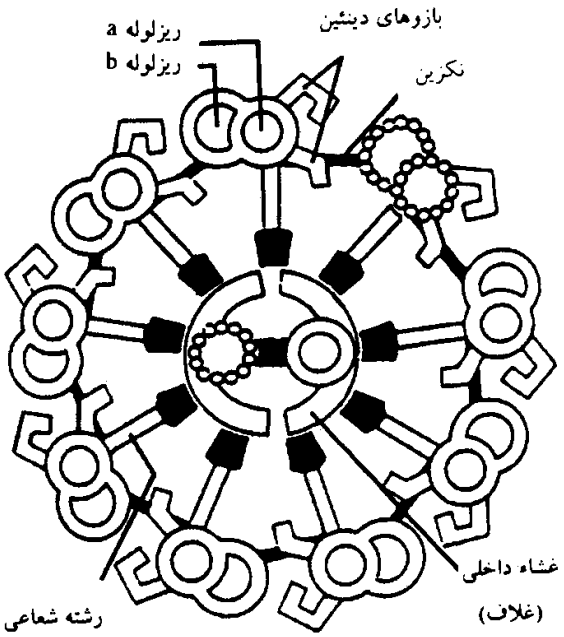
۱- ساقه مژکی

ساقه مژکی بخش متحرک اصلی هر تاژک یا مژک است که زیر بنای ساختمان ریزلوله‌ای دارد.

طول ساقه مژکی از چند میکرومتر تا ۱ یا ۲ میلیمتر و قطر خارجی آن حدود ۰/۲۱ میکرومتر است.

اطراف ساقه مژکی به وسیله غشاء خارجی مژکی که امتداد غشاء سلولی است پوشیده شده است. درون ساقه مژکی از ماده زمینه‌ای پوشیده شده و همه ساختمان‌های درونی ساقه مژکی در این ماده زمینه‌ای قرار دارند (شکل ۷-۱۴). ساقه مژکی در سراسر طول خود ساختمان یکنواختی ندارد. در عین حال در برش عرضی بخش‌های میانی آن علاوه بر غشاء و ماده زمینه‌ای، دارای ۹ جفت ساختمان ریزلوله‌ای است. ۹ مجموعه، ریزلوله‌های دوتایی کناری (دابلت‌های پیرامونی) و دو ریزلوله، مرکزی هستند. هر جفت از ریزلوله‌های کناری نیمرخ بیضی شکل دارند. در حالی که ریزلوله‌های مرکزی در برش عرضی حلقوی شکلند. قطر ریزلوله‌های کناری بین ۱۸ تا ۲۵ نانومتر است و لوله‌های مرکزی کمتر درشت‌ترند. هر مجموعه از دو ریزلوله کناری چسبیده به‌هم هستند و آنها را در خلاف جهت چرخش عقربه‌های ساعت به ترتیب ریزلوله A و B(a و b)می‌نامند (شکل ۷-۱۴).

ریزلوله A کمی باریک‌تر، مرکزی‌تر اما کامل است و از ۱۳ رشته ابتدایی توبولینی ساخته شده است. ریزلوله B قطر بیشتری دارد اما تنها تا ۱۱ رشته ابتدایی توبولینی دارد و بر سطح ریزلوله A دو زایده یا بازو دیده می‌شود که در جهت چرخش عقربه‌های ساعت به سوی دابلت مجاور کشیده شده‌اند. این بازوها که به لوله B در دابلت مجاور نمی‌رسند حالت کمی خمیده دارند و از پروتئینی به نام دینئین[3] که خاصیت ATP آزی دارد تشکیل شده‌اند (شکل ۷-۱۴). دینئین همتای میوزین ماهیچه و دابلت همتای آکتین عمل می‌کند. دینئین پروتئینی با وزن مولکولی ۳۰۰ تا ۴۰۰ کیلودالتون است. این پروتئین آنزیمی به وسیله Mg^{2+} و Ca^{2+} فعال می‌شود و پس از انحلال می‌تواند دوباره با همان آرایش اولیه روی ریزلوله A تجمع پیدا کند. به وسیله الکتروفورز دو ایزو آنزیم به نام دینئین I و II از این پروتئین آنزیمی جدا شده‌اند. دینئین I بخش عمدهٔ ATPآز ساقه مژکی را تشکیل می‌دهد و در هر دوبازوی دینئینی ریزلوله A وجود دارد. به ترتیبی که خواهیم دید برهم‌کنش توبولین و دینئین زیر بنای جنبش مژکی می‌باشد (Mohri، ۱۹۷۶ و Gibbons، ۱۹۷۷).



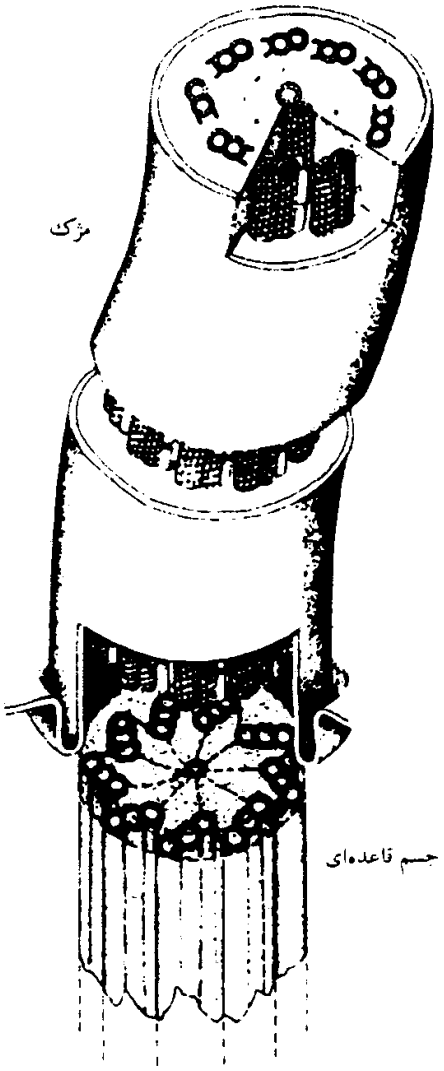
شکل ۷-۱۴. نمایی از فراساختمان برش عرضی ساقه مژکی

1- Stereocils 2- Cynocils 3- Dynein

دابلت‌های کناری ساقه مژکی به وسیله پل‌های پروتئینی به نام نکزین[1] به‌هم متصلند (شکل ۷-۱۴). این پروتئین جرم مولکولی ۱۵۰ تا ۱۶۰ کیلودالتون دارد. عمل این پل‌های نکزینی به خوبی شناخته نشده است اما به احتمال در پایداری شکل و حالت هندسی ساقه مژکی در طول جنبش مژکی دخالت دارند. نکزین‌ها، دابلت‌های کناری را به‌صورت پایدار به‌هم متصل می‌کنند و به دلیل حالت کشداری که دارند، لغزش محدودی را امکان‌پذیر می‌سازند.

دو ریزلوله مرکزی جدا از یکدیگرند و اطراف آنها به وسیله یک غلاف پروتئینی پوشیده شده است. صفحه‌ای عمود بر خط وصل‌کننده دو لوله مرکزی، ساقه مژکی را به دو نیمه قرینه راست و چپ تقسیم می‌کند. محور زنش مژک بر این محور تقارن مژکی، عمود است.

بین ریزلوله‌های کناری (ریزلوله A از هر دابلت) با غلاف پروتئینی احاطه‌کننده دو ریزلوله مرکزی به وسیله رشته‌های پروتئینی شعاعی[2] ارتباط برقرار می‌شود. این رشته‌ها در مجاورت غلاف پروتئینی به بخش متراکم و ضخیم به نام سر (یا پا) ختم می‌شوند. رشته‌های پروتئینی شعاعی می‌توانند در وضعیت‌های مختلف به غلاف پروتئینی مرکزی متصل یا از آن جدا شوند. وقتی ساقه مژکی راست باشد این رشته‌ها به‌صورت شعاع‌هایی عمود بر محور طولی ساقه مژکی به غلاف مرکزی متصلند اما در بخش‌های خمیدهٔ ساقه مژکی این رشته‌ها از غلاف مرکزی جدا می‌شوند. مشاهده این امکان اتصال و جدایی موجب این تصور شده که رشته‌های پروتئینی شعاعی در بازگشت حرکت لغزشی دابلت‌های کناری، در بخش‌های خم شده ساقه مژکی دخالت دارند.



شکل ۷-۱۵. نمای سه بعدی از فراساختمان مژک و اتصال ساقه مژکی یا جسم قاعده‌ای

۲- جسم قاعده‌ای (سینه توزوم[3] = بلفاروبلاست[4])

به دنبال پژوهش‌های Henneuy و Lenhossek در ۱۸۹۷، پذیرفته شد که اجسام قاعده‌ای مژک‌ها و تاژک‌ها همتاهای سانتریول‌هایی هستند که در طرفین دوک میتوزی قرار دارند. در تعداد زیادی از سلول‌ها نشان داده شده که یک سانتریول درگیر در میتوز می‌تواند به‌صورت همزمان دارای یک مژک باشد. بررسی‌هایی که با میکروسکوپ‌های الکترونی به عمل آمده است این همانندی را تأیید کرده است.

قاعده تاژک یا مژک به یک دانه رنگ‌پذیر به نام جسم قاعده‌ای (بلفاروبلاست = سینه‌توزوم) می‌پیوندد (شکل ۷-۱۵) که رنگ‌های بازی را به خوبی می‌پذیرد. در ساختمان جسم قاعده‌ای مثل سانتریول ۹ مجموعه ریزلوله‌ای کناری یا محیطی وجود دارد که هر مجموعه خود از سه ریزلوله (تریپلت) تشکیل شده است. در هر تریپلت ریزلوله نزدیک‌تر به مرکز را A و ریزلوله‌های بعدی را به ترتیب B و C می‌نامند. ریزلوله A و B از هر تریپلت با عبور از مجاورت سینی مژکی به ساقه مژکی رسیده و در آن امتداد می‌یابند و به صورت

1- Nexine 2- Radial.s Spoke 3- Cinetosome 4- Belfaroblast

دابلت‌های موجود در ساقه مژکی درمی‌ایند (شکل ۷-۱۵). ریزلوله خارجی از هر تریپلت (C) از سینی مژکی نمی‌گذرد، در مجاورت صفحه مژکی ختم می‌شود و در ساقه مژکی امتداد ندارد. خاطرنشان سازیم که ممکن است در بخش‌های انتهایی (نزدیک به انتهای آزاد ساقه مژکی) از دو ریزلوله هر دابلت تنها لوله مرکزی‌تر ادامه یابد و به حال تک ریزلوله درآید (شکل ۷-۱۵). جسم قاعده‌ای مثل سانتریول فاقد دو ریزلوله مرکزی است. بسیاری از سلول‌هایی که دارای تعداد زیادی مژکند، یک جسم قاعده‌ای دارند.

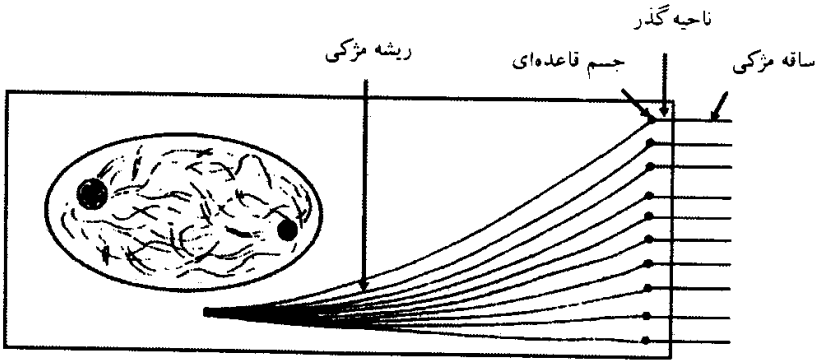
سر پیشین جسم قاعده‌ای همانند سر پیشین سانتریول دارای ساختمان پروتئینی شبیه چرخ گاری است (این ساختمان در بحث سانتریول شرح داده شد).

۳- صفحه یاسینی مژکی

در حد فاصل جسم قاعده‌ای و ساقه مژکی و در بخش میانی ساقه مژکی، صفحه پروتئینی متراکمی با حالت کم‌وبیش بشقاب مانند قرار دارد که آن را صفحه مژکی یا سینی مژکی نامند. دو لوله مرکزی ساقه مژکی تا حد سینی مژکی ادامه دارند.

۴- ریشه‌های مژکی

در عده‌ای از سلول‌ها، ریشه‌های مژکی که از جسم قاعده‌ای منشاء می‌گیرند تا مجاورت هسته سلول کشیده شده‌اند. بسیاری از ریشه‌های مژکی بندبند به نظر می‌رسند که بندهای عرضی تناوبی از ۵۵ تا ۷۰ نانومتر دارند. رشته‌های بندبند از ریز رشته‌های موازی تشکیل شده‌اند که ضخامتشان ۳ تا ۷ نانومتر است و هر یک به نوبه خود از زیر واحدهای گویچه‌ای ساخته شده‌اند. این ریزرشته‌ها می‌توانند نقش ساختمان‌های پایدارکننده سینه‌توزوم را داشته باشند و به احتمال در هماهنگی حرکات مژک‌ها نیز دخالت دارند. در همانندی با سایر ریزرشته‌ها، برای ریشه‌های مژکی نیز یک نقش انقباضی در نظر گرفته شده است. به‌علاوه برای بندهای عرضی بعضی ریشه‌های مژکی خاصیت ATPآزی مشخص شده است. (شکل ۷-۱۶).



شکل ۷-۱۶. طرح ساختمان عمومی یک مژک در مشاهده میکروسکوپی. حالت مخروطی ریشه مژکی که بخش باریک آن تا مجاور هسته کشیده شده، مشخص است.

حرکت مژه‌ای - لغزش یا سُر خوردن دو ریزلوله با دخالت دینئین

اگر تار عضلانی را در گلیسرین نگهداریم، با افزودن ATP منقبض می‌شود. همچنین اگر تاژک‌ها و مژک‌ها را جدا کنیم و در گلیسرین نگهداریم، با افزودن ATP حرکاتشان شروع می‌شود و تا مدتی ادامه می‌یابد. اختلاف در این است که افزایش ATP موجب یک‌بار انقباض عضله می‌شود ولی افزایش ATP بر تاژک‌ها و مژک‌ها موجب می‌شود که تا مدتی حرکاتشان ادامه یابد. در هر دوی این حرکات ATP مصرف می‌شود. حرکات مژکی مستقل از پیام‌های

عصبی است. با جدا کردن بخشی از پوشش ریه قورباغه و قرار دادن آن در گلیسرین یا در محلول رینگر ویژه دوزیستان، زنش‌های مژک‌ها تا مدت‌ها ادامه می‌یابد و قابل مطالعه است. اگر به حرکت دسته‌ای از مژک‌ها توجه شود، انقباض آنها در جهت انتشار حرکت، ناهمزمان[1] است، انقباض یک مژک قبل یا بعد از مژک مجاور خود می‌باشد و به این ترتیب یک موج واقعی انقباض ایجاد می‌شود.

از طرف دیگر در جهت عمود بر جهت انتشار حرکت، انقباض، همزمان[2] است یعنی در یک لحظه زمانی مشخص، همه مژک‌ها در یک حالت انقباضی هستند. زنش منظم مژک‌ها به‌صورت‌های گوناگونی تفسیر شده است. برای توضیح نظم متاکرونی زنش‌ها فرآیند دارای دو مرحله در نظر گرفته شده است. در مرحله نخست تحریک و مرحله دوم هدایت بین مژکی است. به‌طور بدیهی این فرآیند تحت کنترل سیستم عصبی نیست زیرا پس از جدا کردن پوشش مژکدار و قرار دادن آن در شرایط مناسب آزمایشگاهی حرکات مژک‌ها همچنان ادامه می‌یابد. در عین حال پیوستگی سیتوپلاسمی برای هماهنگی حرکات لازم است. ایجاد یک برش در بین دسته‌ای از مژک‌ها موجب ناهمگنی موج زنش در دو بخش جدا شده می‌شود ولی زنش‌ها ادامه می‌یابد.

جهت زنش مژکی به سیتوپلاسم مجاور به مژک‌ها وابسته است. اگر بخشی از پوشش مژکدار حلق یا ریه قورباغه را برداریم و در جهتی معکوس پیوند بزنیم، حرکات مژک‌ها ادامه می‌یابد اما در جهتی عکس بخش‌های دست نخوردهٔ مخاط. زنش‌های مژکی به‌طور معمول سریع هستند (۱۰ تا ۱۷ زنش در ثانیه در ناحیه حلقی قورباغه). بررسی این زنش‌ها با استفاده از روش‌های سینماتوگرافی امکان‌پذیر است. حرکت مژکی می‌تواند به یکی از اشکال پاندولی، قلّابی، قیفی یا موجی باشد.

تاکنون دیده‌ایم که جهت زنش مژکی بر سطح تقارن ساقه مژکی عمود است. در عین حال نشانه‌های زیادی برای وجود یک حرکت سه بعدی در زنش مژکی وجود دارد.

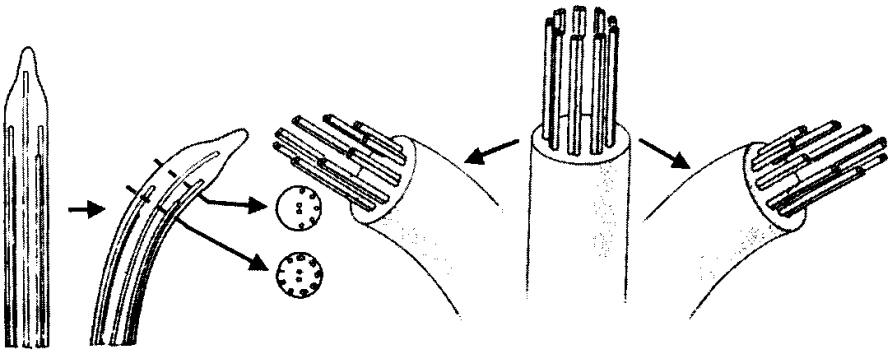
پدیده اصلی در زنش مژکی لغزش دابلت‌های ریزلوله‌ای نسبت به یکدیگر است که با برقراری و گسسته شدن پل‌های عرضی بین دابلت‌های مجاور به وسیله بازوهای دینئینی صورت می‌گیرد (شکل ۷-۱۷).

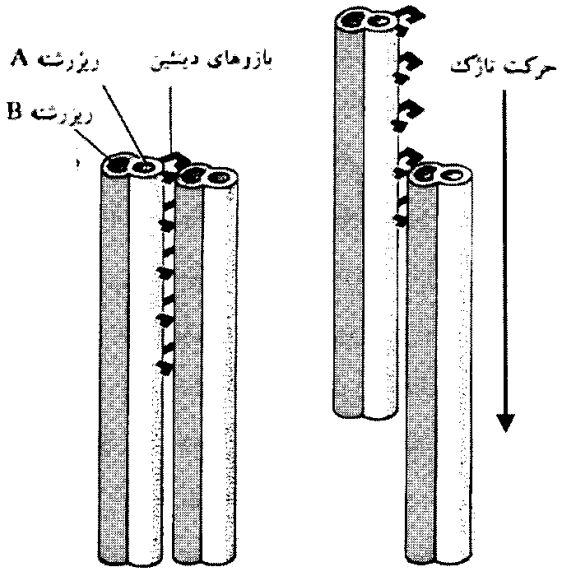
در بررسی‌هایی که به کمک میکروسکوپ‌های زمینه تاریک و نیز میکروسکوپی الکترونی انجام شده است مشخص شده که هنگام زنش مژک، جابه‌جایی در دابلت‌های ریزلوله‌ای صورت می‌گیرد، ریزلوله‌های مرکزی تا بخش انتهایی ساقه مژکی کشیده می‌شوند در حالی که ریزلوله‌های موجود در بخش‌های داخلی خمیدگی در فاصله ۱ تا ۲ میکرومتر از انتهای آزاد مژک و ریزلوله‌های موجود در بخش خارجی خمیدگی کمی دورتر از انتهای ساقه مژکی ختم می‌شوند وزنش خود را به پایان می‌برند (شکل ۷-۱۷).

اغلب کارهای تجربی در زمینه جنبش‌های مژکی نقش مهمی را برای ATP مطرح کرده‌اند. در بخش‌های قبلی دیده‌ایم که دینئین پروتئینی که حدود ۸ درصد از کل پروتئین‌های مژکی را می‌سازد دارای خاصیت ATPآزی است. در مژک‌ها، تاژک‌ها و دم‌اسپرماتوزوئیدهایی که در گلیسرین نگهداری می شدند، افزایش ATP موجب فعالیت منظمی می‌شود که می‌تواند چند دقیقه تا چند ساعت ادامه یابد.

به نظر می‌رسد که برهم‌کنش توبولین و دینئین در این نوع از جنبش‌های سلولی عامل اصلی باشد که حالتی مشابه از برهم‌کنش آکتین - میوزین در سلول‌های عضلانی است. دخالت بازوهای دینئینی در زنش‌های مژکی و تاژکی به روش‌های تجربی مختلفی تأیید شده است، در اسپرماتوزئیدهایی که به کمک شوینده‌ها فاقد غشاء شده‌اند افزودن KCL موجب استخراج بازوهای دینئینی می‌شود و همزمان با آن زنش‌های دُم کاهش می‌یابد. افزایش دینئین

1- Metachronique 2- Isochronique





شکل ۷-۱۷. حرکت لغزشی رشته‌ها در مژک در برش‌های عرضی از مژک‌های خم‌شده، ریزلوله‌ها ساختمان متقارنی ندارند. به ترتیبی که مشاهده می‌شود، ریزلوله‌های مرکزی تا بخش انتهایی ادامه دارند، ریزلوله‌ها در بخش داخلی خمیدگی تا نزدیک به انتهای ساقه مژکی و ریزلوله‌های بخش خارجی تا حد کمتری از آنها امتداد یافته‌اند. این وضع انجام نوعی حرکت لغزشی ریزلوله‌های دابلت‌ها در امتداد یکدیگر را ایجاب می‌کند. این حرکت لغزشی به کمک اتصال تدریجی بازوهای دینئینی و استفاده از انرژی حاصل از هیدرولیز ATP انجام می‌شود.

موجب برقراری مجدد زنش‌ها می‌شود. به کارگیری آنتی‌سرم دارای آنتی‌دینئین جنبش‌های دم اسپرماتوزوئیدهای فاقد غشاء شده را متوقف می‌سازد در حالی که ATP آن را به راه می‌اندازد.

مشاهده جالب دیگری نشان داده است که برعکس عضله، فعال شدن مژک و تاژک نیاز به کلسیم ندارد. در عین حال در موارد زیادی Ca^{2+} یک نقش تنظیم‌کنندگی بر شکل موج زنش‌های مژکی و تاژکی دارد.

در سال‌های اخیر در برخی جهش یافته‌های کلامیدوموناس، ساختمان‌های غیرعادی در ساقه مژکی مشاهده شده است. همچنین در نشانگان کارتاژنر[1] که از نظر پزشکی حایز اهمیت است در نتیجه جهشی که صورت می‌گیرد بازوهای دینئینی حذف می‌گردد. این افراد عقیمند (به دلیل عدم تحرک دم اسپرماتوزوئیدها و بنابراین عدم تحرک این سلول‌های جنسی) و مبتلا به برونشیت مزمن و سینوزیت هستند.

ریز رشته‌ها

ریزرشته‌ها، رشته‌های بسیار نازک و پروتئینی هستند که در دهه ۱۹۷۰ کشف شده‌اند و اساساً از پروتئین آکتین ساخته شده‌اند. ریزرشته‌ها به همدیگر می‌پیوندند و کابل‌هایی را در سلول می‌سازند. ریزرشته‌ها که در تمام سلول‌های یوکاریوتی وجود دارند، ابتدا در سلول‌های ماهیچه‌ای که در آنها آکتین یک مولکول اصلی است و سپس در سلول‌های غیر ماهیچه‌ای شناخته شدند.

همان گونه که در مورد سایر اجزای اسکلت سلولی دیده‌ایم، استفاده از روش‌های ایمونوسیتوشیمی و به ویژه ایمونوفلوئورسانس، روشی مناسب برای شناسایی ریزرشته‌ها بوده است.

1- Kartagners Syndrome

پادتن‌های ضدآکتین در یک گونه جانوری تهیه می‌شود و به انواع مختلف سلول‌ها اثر داده می‌شود. سپس جایگاه اثر این پادتن‌ها به وسیله پادتن‌های ثانوی که با یک نشانه گذار فلوئورسانس و قابل مشاهده با میکروسکوپ فرابنفش همراه شده است، مورد بررسی قرار می‌گیرد. مشاهدات انجام شده وجود کابل‌های طویل فلوئورسانسی را نشان داده است که از دستجات ضخیم ریزرشته‌ای تشکیل شده‌اند. این کابل‌ها در تمام بخش‌های سلول و به ویژه در زیر غشاء سلولی و به موزات آن پراکنده‌اند.

ریزرشته‌ها بخش مهمی از اسکلت سلولی و حتی با بررسی‌های جدید بخش فعال‌تر آن را تشکیل می‌دهند. این اجزای سلولی تنوع ساختمانی زیادی دارند. ریزرشته‌های آکتینی، میوزینی و ریزرشته‌های بینابینی برخی سلول‌ها (مثل ویمنتین[1]، دسمین[2] G، F، A سیتوکراتین، نوروفیلامان‌ها) نمونه‌هایی از ریزرشته‌ها هستند. از آنجا که ریزرشته‌های آکتینی بخش قابل توجهی از اسکلت سلولی را می‌سازند و در همهٔ سلول‌های یوکاریوتی وجود دارند، به بررسی اجمالی آنها می‌پردازیم.

فراساختمان ریزرشته‌های آکتین

آکتین پروتئینی سیتوپلاسمی است که به دو شکل در سلول‌ها وجود دارد: شکل گویچه‌ای یا G.A[3] و شکل رشته‌ای یا F.A[4] هر مونومر G آکتین پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۴۲ KD است که دارای ۳۷۶ اسیدامینه می‌باشد. ویژگی آن داشتن اسیدامینه نادری به اسم ۳متیل هیستیدین است.

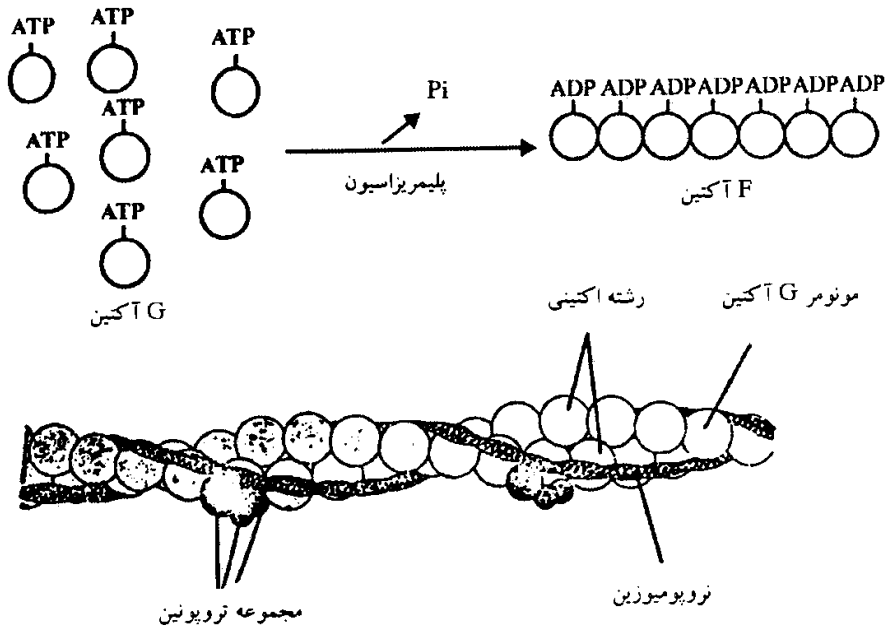
گرچه به‌طور معمول و برای سهولت در طرح‌های نمایشی مونومرهای آکتین گویچه‌ای را به حالت کروی نشان می‌دهند. اما در واقع این مونومرهای بی‌شکلند، طول هرکدام حدود ۶/۵ و عرضشان در وسیع‌ترین بخش مولکول به ۴ نانومتر می‌رسد. هر مولکول آکتین گویچه‌ای با یون‌های Ca^{2+} که شکل مولکولی آن را پایدار می‌کنند و نیز با یک مولکول ATP به‌صورت غیرکووالانسی متصل شده است. آکتین گویچه‌ای می‌تواند به سرعت پلیمریزه شده و به آکتین رشته‌ای (F آکتین) تبدیل شود. به نظر می‌رسد این تبدیل اساس تغییر حالت متداول سُل به ژل سیتوزول سلول‌ها باشد. آکتین گویچه‌ای در حکم مونومر سازنده آکتین رشته‌ای است. به‌طور معمول پلیمریزاسیون با خرج انرژی ATP انجام می‌شود. واکنش پلیمریزاسیون به‌صورت زیر است:

$$\text{G آکتین (آکتین گویچه‌ای)} \xrightarrow{\text{۰/۱M KCL}} \text{F آکتین (آکتین رشته‌ای)} - ADP + nP$$

برای این واکنش ATP الزامی نیست، اما سرعت واکنش را زیاد می‌کند. وقتی که تراکم Mg^{2+} و ATP افزایش یابد نیز آکتین گویچه‌ای به‌صورت آکتین رشته‌ای پلیمریزه می‌شود. از مجموعه دو رشته آکتینی که به حالت مارپیچ راست گرد به‌هم می‌پیچند، یک زنجیر دو رشته‌ای مارپیچی یا ریزرشته آکتینی به وجود می‌آید که ضخامت حدود ۷ نانومتر و طول متغیری حتی تا بیش از یک میلیمتر دارد (شکل ۷-۱۸) و در ساختمانش حدود ۳۵۰ مولکول G آکتین وجود دارد در هر دور (پا) از مارپیچ رشته آکتینی که ۳۶ نانومتر طول دارد، ۱۳/۵ مولکول G آکتین دیده می‌شود.

پلیمریزاسیون مولکول‌های GA به FA به این ترتیب انجام می‌شود که در محیط مناسب، یک مولکول ATP بر جایگاه خود در آکتین G می‌چسبد و با بازشدن پیوند پرانرژی‌اش، مولکول GA فعال شده به یک مولکول ADP

1- Vimentine 2- Desmine 3- Glubular Actin 4- Fibrose Actine



شکل ۷-۱۸. آکتین گویچه‌ای و رشته‌ای. پلیمریزاسیون آکتین گویچه‌ای؛ یک ریزرشته و پروتئین‌های وابسته به آن در یک رشته نازک (میوفیبریل) در سلول ماهیچه‌ای.

چسبیده می‌ماند. ADP با تأثیر بر شکل محلّ اتصال مولکول‌های GA، نقش تنظیم‌کننده شکل فضایی را بازی می‌کند و به این ترتیب مونومرهای GA به FA پلیمریزه می‌شوند (شکل ۷-۱۸). برخی پروتئین‌های سیتوپلاسمی مثل پروفیلین به آکتین گویچه‌ای می‌چسبند و مجموعه‌ای به اسم پروفیلاکتین را به وجود می‌آورند. با این پیوستگی امکان پلیمریزاسیون آکتین گویچه‌ای به آکتین رشته‌ای از بین می‌رود. این اتصال به وسیله Mg^{2+} و ATP گسسته می‌شود (شکل ۷-۱۸).

آکتین رشته‌ای در تمام سلول‌های غیرعضلانی به ویژه در شبکه زیر غشایی سلول در محور میکروویلی‌ها وجود دارد. آکتین رشته‌ای به‌طور معمول با مولکول‌های دیگر مثل سپکترین و α آکتین، وینکولین وابسته است. آکتین رشته‌ای در سازمان یافتن میوفیبریل‌های سلول‌های ماهیچه‌ای مخطّط و سلول‌های ماهیچه‌ای قلب نیز شرکت دارد.

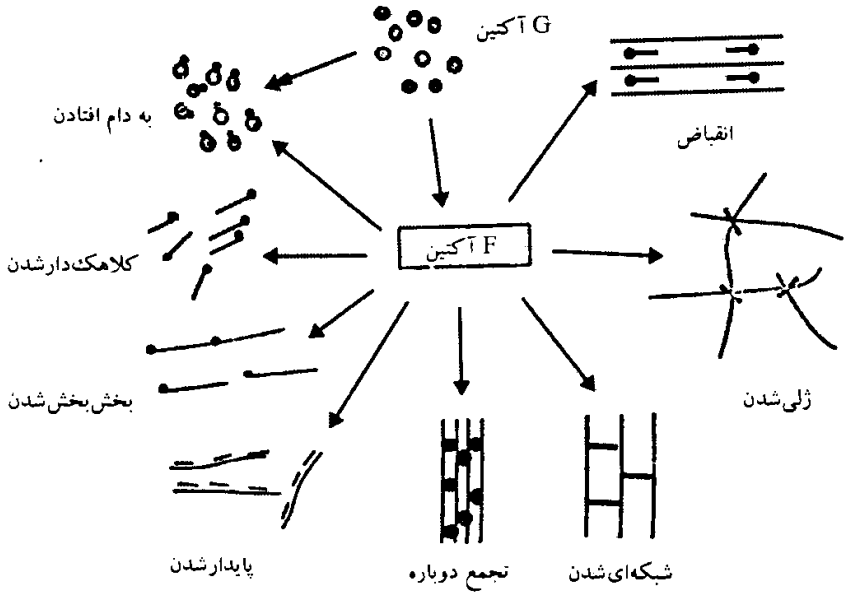
زنجیر آکتینی، قطبی است و از یک سر (سر +) طویل می‌شود و از سر دیگر (سر -) دپلیمریزه می‌گردد. سرعت رشد آکتین خالص در سر (+)، به‌طور معمول ۵ تا ۱۰ برابر بیشتر از سر (-) است. در شرایط مناسب سلولی (غلظت ۰/۱۵ مولکول گرم در لیتر KCL)، رشته‌های آکتینی پایدارند.

آکتین با پروتئین‌های مختلف وابستگی دارد

پروتئین‌های زیادی در سیتوزول وجود دارند که بر ساختمان، تجمع و رفتار آکتین اثر می‌گذارند (شکل ۷-۱۹). این پروتئین‌ها عبارتند از:

- **پروتئین‌های ژل ساز:** که پیوندهای سستی را با رشته‌های آکتینی برقرار می‌کنند. این پروتئین‌ها نقشی را در تبدیل سُل به ژل بازی می‌کنند و ویژگی‌های (حالت) سیتوزول را مشخص می‌سازند؛
- **پروتئین‌های گردهم آورنده:** که سازمان یافتن دستجات متراکم آکتین را هدایت می‌کنند (از جمله فیمبرین[1] و ویلّین[2] که هر دو در میکروویلی‌ها وجود دارند)؛
- **پروتئین‌های شبکه‌ساز:** که پل‌هایی را بین رشته‌های آکتینی به نسبت دور (۲۰۰ نانومتر فاصله) برقرار می‌سازند؛

1- Fimbrine 2- villine



شکـــــل ۷-۱۹. اثرات چند پروتئین بر ریزرشته‌های آکتینی.

- **پروتئین‌های خُردکننده:** مثل ژل‌سولین[1] که به حد واسط زیر واحدهای رشته‌های منفک آکتینی فشار وارد آورده و آنها را قطع می‌کند.
- **پروتئین‌های پایدارکننده:** که بر طول رشته‌های آکتینی می‌چسبند و آنها را پشتیبانی می‌کنند؛
- **پروتئین‌های دام‌انداز:** مثل پروفیلین[2] که مانع پلیمریزاسیون آکتین گویچه‌ای می‌شوند. این پروتئین‌ها با مونومرهای آکتینی مجموعه‌ای را می‌سازند و موجب ذخیره شدن آکتین گویچه‌ای در سلول می‌گردند؛
- **پروتئین‌های کلاهک‌ساز:** که یک سررشته‌ها را می‌بندند؛
- **پروتئین‌های جنبشی:** شناخته‌ترین آنها میوزین است که به آکتین می‌چسبد و با برهم‌کنش خود با آکتین موجب انقباض ماهیچه‌ای می‌شود.

نقش همهٔ این پروتئین‌ها که بسیار متوازن و کنترل شده است هنوز به‌طور کامل شناخته نشده است، به‌طور کلی این پروتئین‌ها سازمان‌یابی و فعالیت آکتین را کنترل می‌کنند.

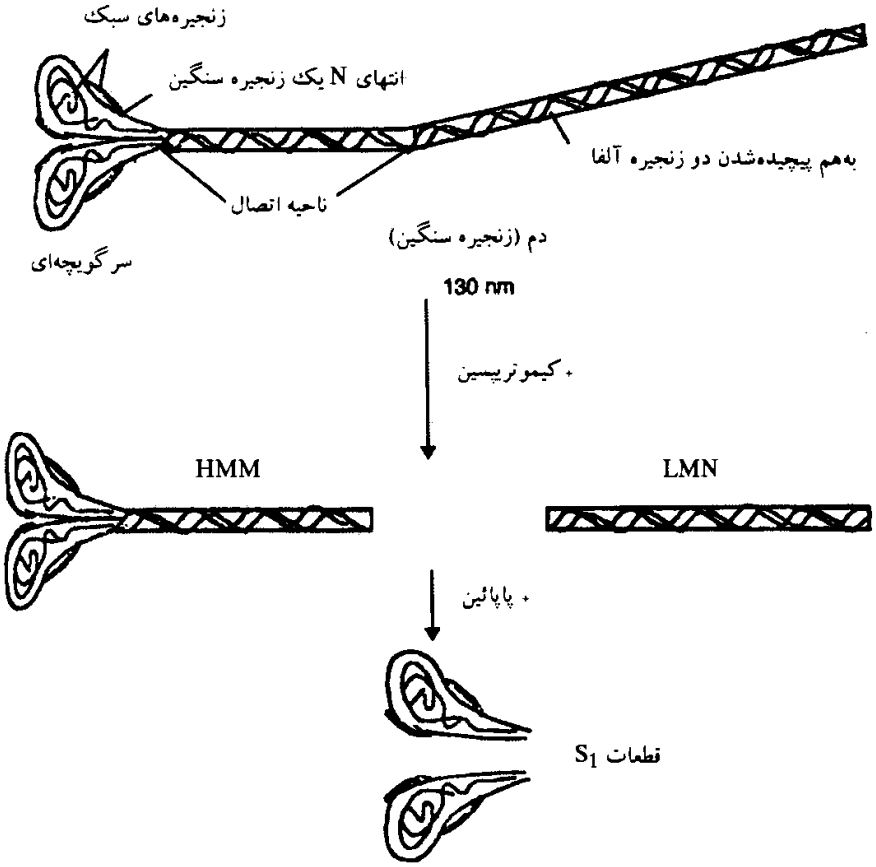
برهم‌کنش آکتین - میوزین در سلول‌های ماهیچه‌ای

الف - ساختمان میوزین

میوزین را می‌توان به سهولت از رشته‌های ضخیم تارهای ماهیچه‌ای مخطط استخراج کرد. میوزین پروتئینی بسیار درشت مولکول است که وزن مولکولی حدود ۵۰۰۰۰۰ دارد.

هر مولکول میوزین دارای یک بخش طویل یا دُم و دو سر است (شکل ۷-۲۰). این پروتئین دارای یک ساختمان ۴ بخشی زیربنایی است. میوزین دارای ۶ پلی‌پپتید است: ۲ زنجیره سنگین که هر یک دارای ۱۸۰۰ اسیدامینه است و مارپیچ‌های α را تشکیل می‌دهند. این زنجیره‌ها به‌هم تابیده شده و ناحیه دُم مولکول را می‌سازند، دو پلی‌پپتید دیگر بخش‌های N - پایانی هستند که سر گویچه‌ای مولکول را می‌سازند و بالاخره دو زنجیر سبک چسبیده به سر گویچه‌ای. ساختمان مولکول میوزین به خوبی شناخته شده است. با استفاده از پروتئازها می‌توان مولکول میوزین را به بخش‌های مختلفی تفکیک کرد. برای مثال کیموتریپسین مولکول میوزین را از یکی از محل‌های اتصال به دو بخش تقسیم می‌کند. مرومیوزین سنگین یا HMM[3] و مرومیوزین سبک یا LMM[4].

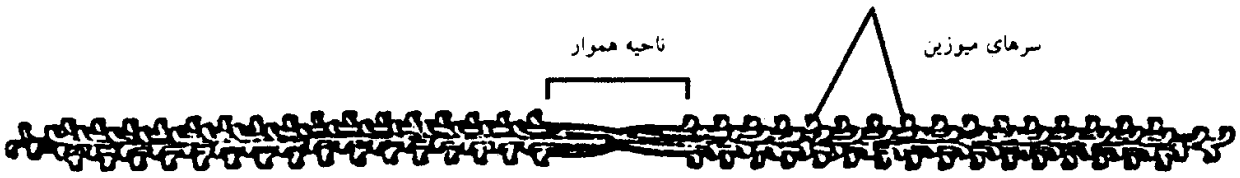
1- gelsoline 2- Profiline 3- Heavy Meromyosin 4- Light Meromyosin



شکل ۷-۲۰. مجموعه مولکول میوزین از دو زنجیره سنگین و ۴ زنجیره سبک که در بخش گویچه‌ای قرار دارند، تشکیل شده است. هیدرولیز مناسبی به‌وسیله کیموتریپسین، مولکول میوزین را به مرومیوزین سنگین (HMM) و یک مرومیوزین سبک (LMM) می‌بُرد. با اثر پاپائین، بخش (قطعه) S_1 جدا می‌شود که شامل انتهای COOH زنجیره‌های سنگین + زنجیره‌های سبک است.

با استفاده از پاپائین می‌توان زنجیره سنگین HMM را خُرد کرد و از آن بخش S_1 را که دارای سرگویچه‌ای و زنجیره‌های سبک است، جدا کرد (شکل ۷-۲۰).

در شرایط فیزیولوژیکی، مولکول‌های میوزین تمایل به تجمع و تشکیل رشته‌ها را دارند. این مولکول‌ها از راه دُم‌های خود مشترک می‌شوند و این در حالی است که سر مولکول‌ها به‌طور منظمی به اطراف (دور تا دور) کشیده می‌شود. رشته‌های ضخیم ماهیچه‌ای مخطط چند صد مولکول میوزین به نحوی مجتمعند که سرهای آنها در دو سوی رشته‌ها قرار دارند (شکل ۷-۲۱).



شکل ۷-۲۱. رشته ضخیم میوزین (سلول عضلانی). ناحیه میانی صاف با دُم‌های مشترک شده مولکول‌های میوزین و بقیه رشته سرهای مولکول‌های میوزینی است.

ویژگی‌های ساختمانی ریزرشته‌های آکتینی در سلول‌های ماهیچه‌ای (میوفیلامان‌های نازک)

در سلول‌های ماهیچه‌ای ریزرشته‌های آکتینی از دو زنجیر مارپیچی ۳۶ تا ۳۷ نانومتر تشکیل شده است. هر دو تناوب دارای بین ۱۳ تا ۱۴ مونومر گویچه‌ای آکتین G به قطر تقریبی ۵ نانومتر است. وجود تروپومیوزین[1] و

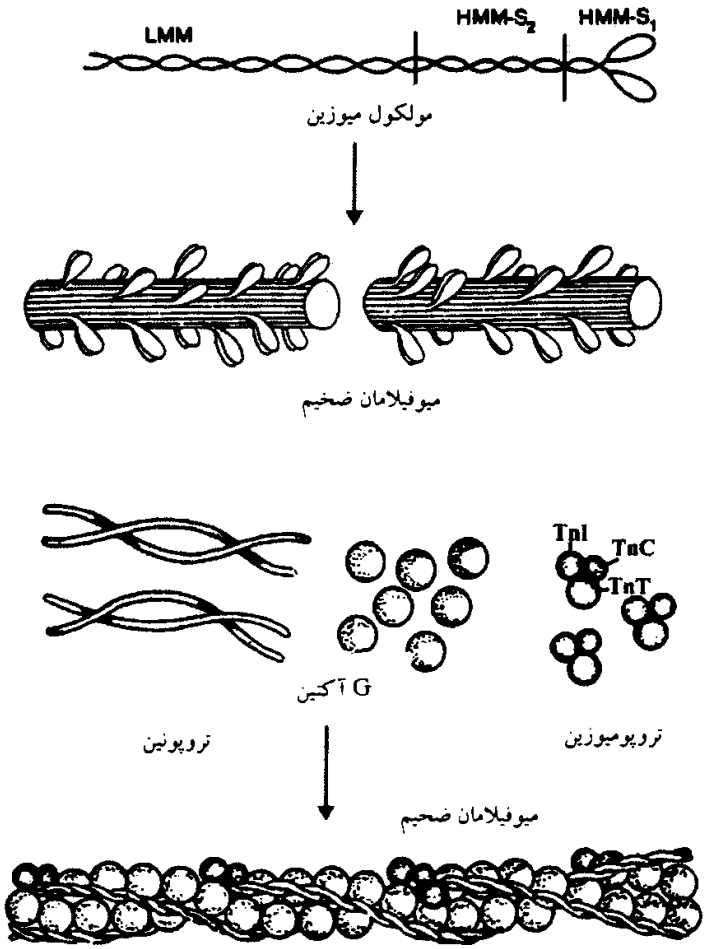
1- Tropomyosine

تروپونین[1] موجب افزایش پیچیدگی ساختمان ریزرشته‌های آکتینی در سلول‌های عضلانی است.

تروپومیوزین: این پروتئین حدود ۵ تا ۱۰٪ از کل پروتئین‌های استخراج شده از سلول‌های ماهیچه‌ای تحت تأثیر KCL ۱ مولکول گرم در لیتر یا اسیدهای ضعیف را شامل می‌شود. وزن مولکولی حدود ۶۴۰۰۰ دالتون دارد و طول مولکول آن به ۴۰ نانومتر می‌رسد و از دو زنجیر پلی‌پپتیدی تشکیل شده است که به‌صورت مارپیچ α آرایش یافته‌اند. همان‌طور که در شکل ۷-۲۲ دیده می‌شود تروپومیوزین بر روی طولی معادل طول هفت مونومر آکتینی کشیده می‌شود و دو مارپیچ را می‌سازد که در شیار ساختمان دو زنجیره‌ای ریزرشته آکتینی قرار می‌گیرند.

تروپونین پروتئینی دارای سه زیر واحد است که سه بخش آن یک مجموعه پروتئینی ۸۰۰۰۰ دالتونی را می‌سازند. هر مجموعه تروپونین به محل تناوب‌های ۴۰ نانومتری یا در فواصل هفت مونومر آکتینی می‌چسبد (شکل ۷-۲۲).

سه بخش تروپونین که به نسبت مولکولی برابر در هر مجموعه وجود دارند عبارتند از: تروپونین C که به‌طور اختصاصی به Ca^{2+} می‌چسبد، تروپونین T که تمایل شدیدی به تروپومیوزین دارد و تروپونین I که عمل ATPآزی میوزین را مهار می‌کند.



شکل ۷-۲۲. طرح نشان‌دهندهٔ ساختمان مولکولی میوفیلامان‌های ضخیم (بالا) و میوفیلامان‌های نازک (پایین) در میوفیبریل (ریزرشته سلول ماهیچه‌ای). میوزین از دو زنجیر پلی‌پپتیدی دارای ۱۴۰ نانومتر دراز ساخته شده و دارای سر S_1 در یکی از دو انتهای خود (L.M.M: مرومیوزینِ سبک؛ $HMM - S_2$: مرومیوزینِ S_2 سنگین؛ $HMM-S_1$: مرومیوزینِ S_1 سنگین) است. خاطرنشان سازیم که رشته ضخیم از تجمع مولکول‌های میوزین تشکیل شده است. رشته نازک از اشتراک مونومرهای G آکتین، تروپومیوزین و تروپونین تشکیل شده است. (TnT: تروپونین T؛ TnC: تروپونین C؛ TnI: تروپونین I). هر مولکول تروپومیوزین به اندازه هفت مولکول آکتین طول دارد.

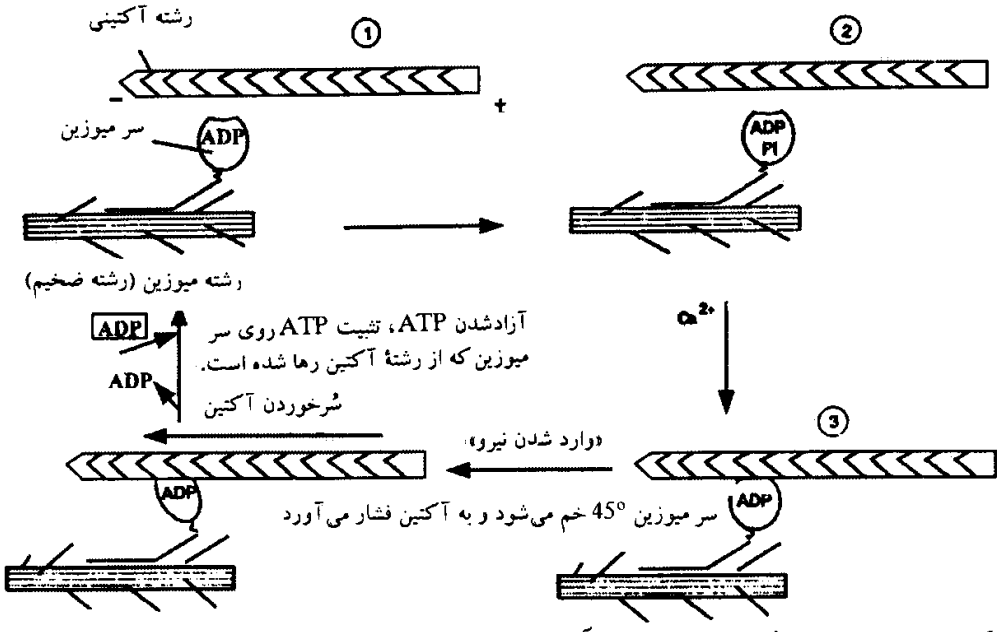
مکانیسم انقباض ریزرشته‌های ماهیچه‌ای

یادآور می‌شویم که در سلول‌های ماهیچه‌ای ریزرشته‌های نازک، به ضخامت ۵ نانومتر متشکل از آکتین و پروتئین‌های وابسته (تروپومیوزین و تروپونین) و نیز ریزرشته‌های ضخیم به ضخامت حدود ۱۰ نانومتر متشکل از میوزین وجود دارند.

هنگام انقباض ماهیچه‌ای، برهم‌کنش بین آکتین و میوزین با تبدیل انرژی شیمیایی به یک کار مکانیکی موجب ایجاد یک نیروی انقباضی می‌شود. انرژی از هیدرولیز ATP به وسیلهٔ میوزین که نقش ATPآزی را بازی می‌کند ایجاد می‌شود.

چگونگی انقباض ریزرشته‌های ماهیچه‌ای پیچیده است، دخالت Ca^{2+} و پروتئین‌های مختلف را نیاز دارد اما به کمک طرحی (شکل ۷-۲۳) می‌توان آن را خلاصه کرد. این طرح نشان می‌دهد که جابه‌جایی سرهای میوزین در

1- Troponine



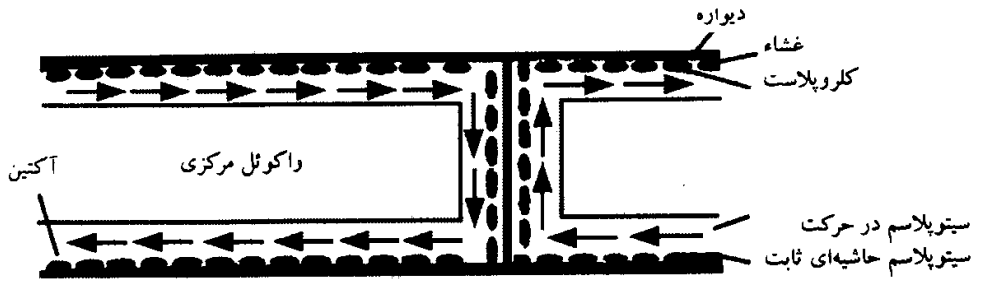
شکل ۷-۲۳. برهم‌کنش آکتین - میوزین در انقباض ماهیچه. طرح فرضی با تکیه بر نقش ATPآزی سرهای میوزینی که عاملی برای فشردن رشته آکتینی و جنبش است.

طول یک رشته آکتینی چگونه تغییر شکل و سُر خوردن رشته آکتینی نسبت به سر میوزین را تحریک می‌کند. در هر دو رشته آکتینی حدود ۷ نانومتر جابه‌جا می‌شود. این دور (چرخه) با دخالت پروتئین‌های وابسته که برخی از آنها تنظیم انقباض به وسیله کلسیم را موجب می‌شوند، سهولت می‌یابد.

هر رشته ضخیم دارای حدود ۵۰۰ سر میوزینی است، هر سر میوزین در یک انقباض سریع، ۵ دور در ثانیه عمل می‌کند که با خرج انرژی همراه است.

نقش آکتین در سلول‌های غیرعضلانی

۱- دخالت در جنبش سیتوپلاسمی (سیکلوز): با روش‌های تجربی مختلف نشان داده شده که آرایش ریزرشته‌ها در جهت و سرعت سیکلوز به ویژه در سلول‌های گیاهی یا سلول‌های جلبک‌هایی مثل نیتلّا[1] یا کارا[2] تأثیر زیادی دارد. با تأثیر سیتوکالازین B بر این سلول‌ها سرعت سیکلوز کاهش می‌یابد و حتی متوقف می‌شود. در سلول‌های گیاهی یا جلبک‌های نامبرده تجمع آکتین در بخش‌های قاعده‌ای سیتوپلاسم حاشیه‌ای که دارای کلروپلاست‌ها است دیده می‌شود. این دستجات آکتینی ثابت هستند و جریان سیتوپلاسمی نتیجه جابه‌جایی مولکول‌هایی از نوع میوزین است که بر روی دستجات آکتینی سُر می‌خورند.



شکل ۷-۲۴. سیکلوز در گیاهان و جلبک‌ها (سلول جلبک نیتلّا). جریان سیتوپلاسم به وسیله پیکان‌ها مشخص شده است. لایه قشری سیتوپلاسم که در مجاورت غشاء سلولی قرار دارد و دارای کلروپلاست زیاد است، ثابت است. بخش قاعده‌ای این سیتوپلاسم دارای دستجات آکتینی است که مسئول جنبش ناحیه سیتوپلاسمی مجاور با اندامک‌های زیاد است.

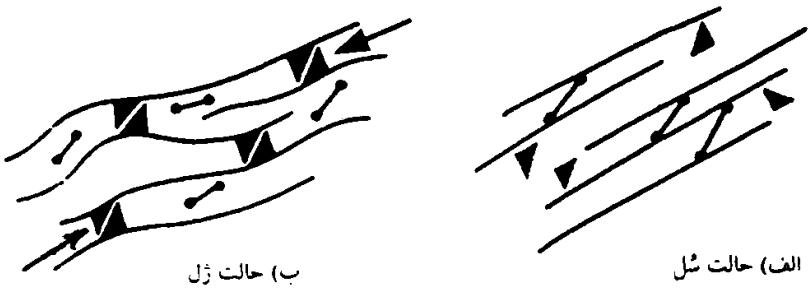
1- Nitela 2- Chara

در سلول‌های جانوری کشت شده که می‌توانند بر روی محیط کشت جابه‌جا شوند، اهمیت آکتین در جنبش‌های سلولی مشخص شده است. با استفاده از داروهای نشانه‌گذار اختصاصی آکتین مثل سیتوکالازین که از پلیمریزاسیون G آکتین جلوگیری می‌کند یا استفاده از فالّوئیدین[1] که مانع دپلیمریزاسیون است نشان داده شده که ریزرشته‌های آکتینی می‌توانند نیروی جنبش‌ها را ایجاد کنند. این وضع به ویژه در سلول‌هایی مثل آمیب‌ها، لوکوسیت‌های فیبروبلاستی و همه سلول‌های دارای جنبش‌های آمیبی اهمیت دارد.

۲- دخالت در تقسیم سلولی: در سلول‌های جانوری تقسیم سلولی با تشکیل ساختمانی حلقوی، در بخش میانی سلول و در حدّ شیار تقسیم سلولی همراه است. این حلقه از دسته‌ای از رشته‌های آکتینی موازی با هم ساخته شده که با میوزین وابسته شده‌اند.

نیروی مکانیکی انقباض، فشردگی بخش میانی سلول و تفکیک سلول‌های دختر را در تلوفاز موجب می‌شود و این پدیده نیز با سیتوکالازین مهار می‌شود.

۳- دخالت در تغییر حالت سُل - ژل سیتوزول: عوامل ژل‌ساز ABP[2] و فیلامین بر روی رشته‌های آکتینی می‌چسبند و پل‌هایی را بین آنها برقرار می‌کند. با به‌هم چسبیدن ریزرشته‌های آکتینی با واسطه این عوامل پروتئینی، شبکه سخت ریزرشته‌ای به وجود می‌آید و سیتوزول حالت ژلی پیدا می‌کند. برعکس با اثر پروتئین‌های ژل - سولین[3] و ویلّین[4] پل‌های بین ریزرشته‌ها باز می‌شوند و سیتوزول به حالت سُل برمی‌گردد (شکل ۷-۲۵).



شکل ۷-۲۵. نقش میوفیلامان‌ها در تشکیل ژل یا سُل سیتوپلاسمی. a) پروتئین‌هایی مثل فیلامین (پیکان‌ها) با برقراری پل‌هایی بین ریزرشته‌ها موجب حالت ژل می‌شوند. b) پروتئین‌هایی مثل ژل‌سولین و ویلّین با گسستن پل‌ها موجب رهاشدن ریزرشته‌ها و حالت سُل می‌گردند.

۴- دخالت در تمایز سلولی: ریزرشته‌های آکتینی در تمایز شکل سلول‌ها و پایداری شکل آنها دخالت اساسی دارند و تخریب آنها با تغییرات و درهم ریختن شکل سلول‌ها همراه است.

اثر سیتوکالازین B بر ریزرشته‌ها

سیتوکالازین B که از ترکیبات دارویی است پلیمریزاسیون GA به FA را مهار می‌کند و به این ترتیب از سازمان یافتن ریزرشته‌ها جلوگیری می‌نماید. با تأثیر سیتوکالازین B بر ریزرشته‌ها می‌توان به‌طور غیرمستقیم اعمال ریزرشته‌های آکتینی را مشخص کرد. تجربیات انجام شده نشان داده است که با تأثیر سیتوکالازین B بر سلول‌های عضلانی صاف، این سلول‌ها قدرت انقباض خود را از دست می‌دهند و سلول‌های عضلانی قلب از زنش می‌ایستند، سیکلوز در سلول‌ها متوقف می‌شود، شکل سلول‌ها درهم می‌ریزد و اعمال آندوسیتوز و اگزوسیتوز و تشکیل پاهای کاذب مختل می‌شود. در جلبک نیتلّا، سیتوکالازین B موجب توقف سیکلوز می‌شود. با حذف این ماده سیکلوز دوباره شروع می‌شود. تبدیل سلولی (درهم ریختن شکل و ویژگی‌های سلول) که با دخالت ویروس‌های سرطان‌زا یا

1- Phalloidine 2- Actine Binding Protein 3- Gelsoline 4- Villine

با اثر مواد شیمیایی صورت می‌گیرد، با درهم ریختن اسکلت سلولی و به ویژه ریزرشته‌ها همراه است. با کاربرد پادتن‌های مناسب آنتی‌آکتین و استفاده از روش ایمونوفلوئورسانس می‌توان محل و وضعیت ریزرشته‌ها را مشخص کرد. در سلول‌های تبدیل شده این فلوئورسانس حالت پخش شده (پراکنده) دارد.

ریزرشته‌های بینابینی

ریزرشته‌های بینابینی، پروتئین‌های رشته‌ای سخت و پایداری هستند که بین سال‌های ۱۹۷۰ تا ۱۹۸۰ در سلول‌ها شناخته شده‌اند. اغلب آنها تنها در سلول‌های مهره‌داران وجود دارند. این ریزرشته‌ها از تمام بخش‌های دیگر اسکلت سلولی که محلول‌تر هستند. با میکروسکوپ‌های الکترونی منظره طناب مانندی دارند و در سلول نوعی سبد را در اطراف هسته تشکیل می‌دهند. همانند سایر بخش‌های اسکلت سلولی می‌توان آنها را روش‌های ایمونوفلوئورسانس مشاهده کرد.

ترکیب شیمیایی ریزرشته‌های بینابینی به حسب نوع بافت‌ها متفاوت است و این ریزرشته‌ها کم‌وبیش شاخص برخی بافت‌ها هستند. مهم‌ترین انواع آنها عبارتند از:

تونوفیلامان‌ها: تونوفیلامان‌ها رشته‌های کراتینی هستند که به ویژه در سلول‌های پوششی فراوانند این ریز رشته‌ها قطری حدود ۸ نانومتر دارند. واحدهای زیربنایی سازنده آنها سه زنجیره پلی‌پپتیدی مارپیچی است که به یکدیگر تابیده شده‌اند. تونوفیلامان‌ها در محل دسموزوم‌ها فراوانند و موجب برقراری اتصال‌های محکمی بین سلول‌ها می‌شوند.

تونوفیلامان‌ها در سلول‌های پوششی مهره‌داران پیشرفته نیز فراوانند و در این سلول‌ها جمع می‌شوند. وقتی سلول‌ها می‌میرند، اسکلت باقیمانده آنها یک لایه خارجی را تشکیل می‌دهند. در ساختمان مو و ناخن نیز وجود دارد.

نوروفیلامان‌ها: رشته‌های بینابینی موجود در سلول‌های عصبی هستند که از سه نوع پروتئین با وزن مولکولی ۷۰۰۰۰، ۱۵۰۰۰۰ و ۲۱۰۰۰۰ تشکیل شده‌اند. این سه پروتئین یک بخش مشترک در ترتیب اولیه خود دارند که وجود آن موجب این تصور است که ژن‌نیاکی (اجدادی) مشترکی دارند.

ویمنتین[1]: پروتئینی ۵۷۰۰۰ دالتونی ویژه سلول‌های مزانشیمی است که می‌تواند یا به‌صورت منفرد باشد. مثل حالت وجودی در فیبروبلاست‌ها یا به‌صورت ترکیب با سایر پروتئین‌ها مثل حالت وجودی در سلول‌های گلیال یعنی در بافت پیوندی مغز. در این سلول‌ها به‌طور معمول ویمنتین وابسته به ریزلوله‌ها است.

دسمین: پروتئینی است که در سلول‌های عضلانی مخطط، صاف و عضله قلب وجود دارد.

لامین هسته‌ای: این پروتئین در ساختمان اسکلت هسته‌ای وجود دارد و ویژگی‌ها و اهمیت آن در فصل هسته مورد بحث قرار خواهد گرفت.

مولکول‌های ریزرشته‌های بینابینی همگی دارای یک بخش مرکزی شبیه چوب‌دستی به طول ۴۰ نانومتر هستند که در آن پلی‌پپتیدها از یک گونه تا گونه دیگر مشابهند. فراهم‌آیی ریزرشته‌های بینابینی بر عکس سایر اجزای اسکلت سلولی، نیازی به ATP یا GTP ندارد.

اعمال ریزرشته‌های بینابینی هنوز به خوبی شناخته نشده است. یکی از اعمال آنها نگهداشتن هسته در جایگاهی خاص در سلول است. ریزرشته‌های بینابینی به احتمال نقشی را در پراکنش و موقعیت اندامک‌ها در سلول دارند.

یکی از نکات جالب توجه این است که ریزرشته‌های بینابینی می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای تمایز مورد استفاده

1- Vimentine

قرار گیرند. از این ویژگی به‌طور وسیعی در موارد تشریحی بیماری شناختی و به ویژه در جستجوی منشاء تومورهای سرطانی و مخصوصاً در حالت‌های متاستازی دور شده از بافت اصلی استفاده می‌شود.

وقتی سلول‌ها سرطانی می‌شوند تمایززدایی می‌کنند اما تنها ریزرشته‌های بینابینی برای مدت طولانی به حالت سازمان یافته باقی می‌مانند و به این ترتیب امکان شناسایی تیپ سلولی‌ای که سرطان از آن بوده است را به‌دست می‌دهند.

بررسی وضعیت ریزرشته‌های بینابینی همچنین می‌تواند موجب مشخص شدن برخی ناهنجاری‌های مادرزادی یا حالت‌های بیماری باشد. برای مثال تجمع ریزرشته‌های بینابینی در سلول‌های عصبی نشانه‌ای از عوارض پیری است و تجمع سیتوکراتین در سلول‌های کبدی عاملی برای تشخیص سیروز کبدی است.

۸ شبکه آندوپلاسمی و ارگاستوپلاسم[1]

مقدمه و تاریخچه

قبل از آن که فنون مربوط به تهیه برش‌های بسیار نازک پیشرفت کافی پیدا کنند، پورتر[2]، در ایالات متحده و اوبرلینگ[3] و برنارد[4]، در فرانسه، در اطراف یاخته‌هایی که به حد کافی گسترش یافته و نسبت به الکترون‌ها کاملاً کدر نبودند مجموعه‌ای از مجاری کوچک یا کیسه‌هایی را مشاهده کردند که حالت شبکهٔ درهم رفته‌ای را داشتند. کمی بعد (۱۹۵۲)، پورتر و پالاد[5] این مجموعه را در برش‌های بسیار نازک یاخته‌های گوناگون جانوری پیدا کردند و آن را شبکه آندوپلاسمی نامیدند. در همین زمان (۱۹۵۳) اوبرلینگ و برنارد تصور کردند که این مجموعه باید ارگاستوپلاسم (ارگاستوپلاسم از کلمه یونانی ergon به معنی کار، ارگاستوپلاسم «سیتوپلاسمی است که کار می‌کند») باشد که در حدود سال ۱۹۰۰ به وسیله گارینه در برخی از یاخته‌هایی که از نظر ترشح فعال‌اند کشف شده است. این ارگاستوپلاسم به‌صورت گروه‌هایی از رشته‌های باریک خمیده و بازدوست توصیف شده بود، اما به دلیل مشکلاتی که برای تشخیص ساختار دقیق آن وجود داشت مطالعه آن به فراموشی سپرده شده بود. اوبرلینگ و برنارد، با از سرگرفتن مطالعهٔ یاخته‌های لوزالمعده یا غدد بزاقی که سرشار از ارگاستوپلاسم‌اند ثابت کردند که این یاخته‌ها دارای شبکهٔ آندوپلاسمی ویژه گسترده‌ای هستند و نشان دادند که در این یاخته‌ها این شبکه همان ارگاستوپلاسم است.

به دنبال این مشاهدات اولیه، وجود شبکهٔ آندوپلاسمی بارها در یاخته‌های جانوری، هم در مهره‌داران و هم در بی‌مهرگان و نیز در تک یاخته‌ای‌ها گزارش شد.

بووا و پورتر، همزمان با یکدیگر، در سال ۱۹۵۷، این شبکه را در گیاهان عالی کشف کردند. این شبکه در مخمرها، میکسومیست‌ها، جلبک‌های مختلف و غیره نیز یافت شد. برعکس، شبکهٔ آندوپلاسمی در پروکاریوت‌ها (که فاقد پوشش هسته‌ای نیز هستند) وجود ندارد.

شکل‌شناسی عمومی شبکه آندوپلاسمی

شبکه آندوپلاسمی را می‌توان به‌عنوان شبکه وسیعی در نظر گرفت که سیتوپلاسم را به دو بخش اصلی تقسیم می‌کند: یک قسمت در داخل غشاها قرار می‌گیرد و قسمت دیگر خارج از آنها که به ماده زمینه‌ای سیتوپلاسم یا سیتوزول معروف است. برای اولین بار در سال ۱۹۴۵ با کمک میکروسکوپ الکترونی به وجود شبکه آندوپلاسمی پی برده شد. سپس در سال‌های اخیر توانستند با استفاده از میکروسکوپ الکترونی با ولتاژ زیاد، ساختمان سه بعدی آن را بیشتر مورد شناسایی قرار دهند. با این حال هنوز اطلاع کامل و طرح جامعی از آرایش دقیق شبکه آندوپلاسمی به‌دست نیامده است.

این شبکه به حالت‌های مختلف در یاخته‌ها دیده می‌شود، در برش‌ها، شبکه آندوپلاسمی به‌صورت رشته‌های باریک و طویلی که، با برش‌های عرضیِ حفره‌های پهن و مسطحی مطابقت دارند و یا به‌صورت رشته‌های خیلی

1- Ergastoplasme 2- Porter 3- Oberling 4- Bernard 5- Palade

کوتاه بیضوی یا دایره‌ای که ظاهراً با مجاری یا لوله‌های باریکی تطبیق می‌کنند، دیده می‌شوند. به هر حال تمام این بخش‌های لوله‌ای[1] کیسه‌ای[2] و مجاری کوچک[3] و یا بخش‌های حفره‌های شکل[4] که با یکدیگر در ارتباط هستند، به سیتوپلاسم حالت اسفنجی می‌دهند.

مشاهدات انجام شده به وسیلهٔ میکروسکوپ الکترونی نشان داد که در برش‌ها، هر رشته شبکه درون سیتوپلاسمی به وسیلهٔ دو غشاء که هر یک ضخامتی حدود ۶۰ A° دارند احاطه می‌شود. در ۱۹۶۴ فری‌ویسلینگ فضای محدود شده در بین این دو غشاء را آنشیلم[5] نامید. این فضا که معمولاً همگن است از ماده زمینه‌ای سیتوپلاسم، تراکم کمتری دارد و می‌تواند وسیع شده و حفراتی را به وجود آورد.

آنشیلم می‌تواند با جذب آب، آبکی (رقیق) شود و با این عمل وسیع و حفره‌ای شده، حالت واکوئل پیدا کند و به این ترتیب خاستگاه عده‌ای از واکوئل‌ها شود.

ماهیت غشاء شبکه، لیپوپروتئینی است و شباهت زیادی با ساختمان غشاء سیتوپلاسمی دارد. کاربرد روش‌های مختلف به‌خصوص کریودکاپاژ[6] نشان می‌دهد که غشاء شبکه ضخامت کمتری از غشاء سیتوپلاسمی دارد، دو بخش آن ساختمان قرینه‌ای دارند و مقدار پروتئین آن بیش از مقدار لیپید است.

استخراج لیپیدها از غشاء سیتوپلاسمی موجب از هم گسیختگی آن می‌شود در حالی که استخراج لیپید از غشاء شبکه موجب خرابی شدید آن نمی‌شود زیرا ساختمان آن بیشتر از پروتئین‌هاست. محتویات شبکه آندوپلاسمی با فضای موجود بین دو لایه غشاء هسته در ارتباط است و بعضی از مجاری شبکه آندوپلاسمی در این فضا باز می‌شوند.

غشاء هسته و به‌خصوص لایه خارجی آن با غشاء شبکه درون سیتوپلاسمی ساختمان مشابهی دارد و اغلب مانند این غشاءها تعدادی ریبوزوم به خود می‌گیرد، حتی برخی پژوهشگران و به‌خصوص پورتر معتقدند که غشاء هسته چیزی جز یک بخش (شاید اساسی‌ترین و ثابت‌ترین بخش) از شبکه آندوپلاسمی نیست. در پروکاریوت‌ها و یا گویچه‌های سرخ پستانداران که غشاء هسته وجود ندارد، شبکه آندوپلاسمی نیز در سیتوپلاسم دیده نمی‌شود.

در سطح خارجی قسمت‌هایی از شبکه آندوپلاسمی ذراتی به نام ریبوزوم‌ها به فراوانی وجود دارند و در حقیقت تنها این بخش از شبکه آندوپلاسمی است که با ارگاستوپلاسم تطبیق می‌کند، بنابراین اصطلاح ارگاستوپلاسم تنها شامل بخشی از شبکه آندوپلاسمی است نه تمام آن، سطح غشاء قسمت‌های دیگر شبکه آندوپلاسمی صاف و فاقد ریبوزوم است.

وقتی بر سطح غشاء مجاری شبکه آندوپلاسمی ریبوزوم‌های فراوان چسبیده باشند به آن منظره دانه‌دانه می‌دهند و به همین دلیل آن را شبکه آندوپلاسمی دانه‌دار یا خشن (R.E.R)[7]، یا شبکه آندوپلاسمی دانه‌دار (GER)[8] گویند. اگر شبکه آندوپلاسمی فاقد ریبوزوم باشد آن را شبکه آندوپلاسمی صاف یا نرم (S.E.R)[9] می‌گویند.

ارتباط و امتداد بین این دو بخش شبکه در یاخته‌های مختلف به کرات مشخص شده است. در مقایسه با یاخته‌های ترشحی جانوری که شبکه آندوپلاسمی دانه‌دار آنها توسعه زیادی دارد در یاخته‌های گیاهی این نوع از شبکه کمتر است و ریبوزوم‌ها در سطح غشاء شبکه در یاخته‌های گیاهی نظم کمتری دارند.

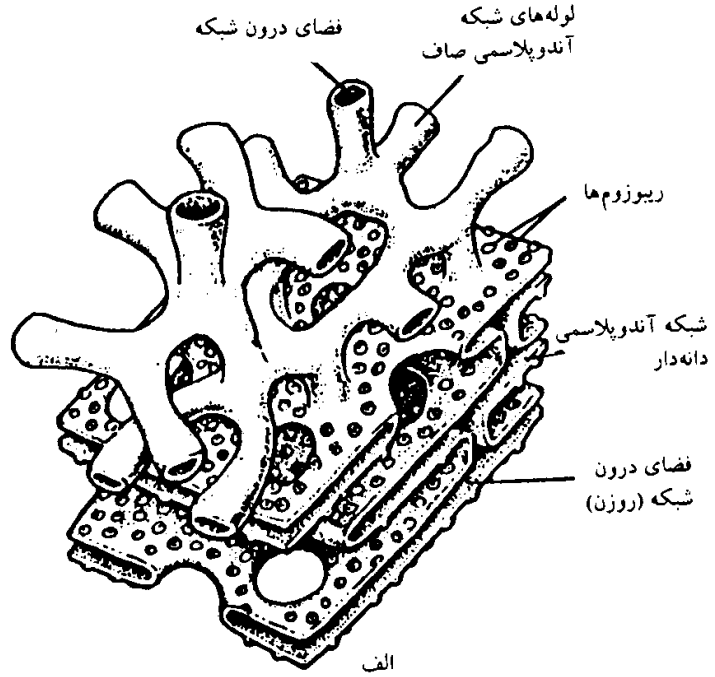
به نظر بووا به‌طور کلی در نواحی میانی سیتوپلاسم شبکه آندوپلاسمی بیشتر از نوع صاف و حفره‌ای است در حالی که در مجاورت هسته و نیز در بخش‌های خارجی سیتوپلاسم، بیشتر از نوع دانه‌دار است. در یاخته‌های پیرو

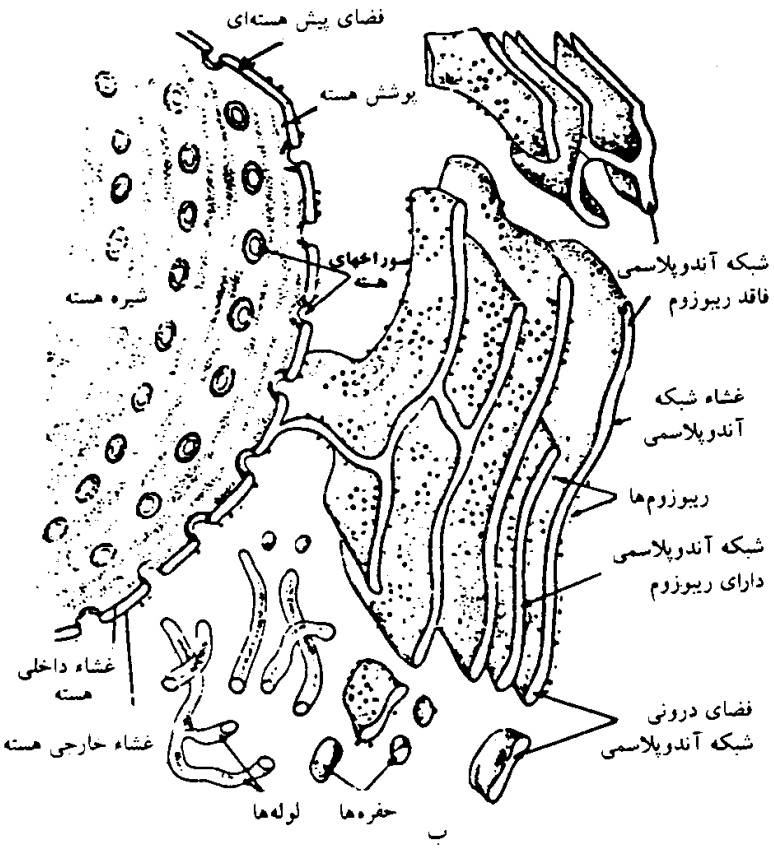
1- tubules 2- sacules 3- canalicule 4- Cisternes 5- Enchyleme
6- Cryodecapage 7- Rough Endoplasmic Reticulum 8- Granular Endoplasmic Reticulum
9- Smooth Endoplasmic Reticulum

فرسوده مثل آوندهای چوبی و یا آوندهای آبکشی مسن گاهی شبکه آندوپلاسمی حفره‌های وسیعی را در یاخته تشکیل می‌دهد. در این حالت به‌صورت یک سیستم ممتد نخواهد بود. به همان ترتیب که در داخل یاخته، بعضی از مجاری شبکه با غشاء هسته در ارتباطند، برخی دیگر از این مجاری در تماس با غشاء یاخته‌ای هستند به‌طوری که محتویاتشان می‌تواند به خارج از یاخته راه یابد، چنین حالتی به ندرت دیده شده است.

از آنجا که برخی مطالعات انجام شده بر روی نمونه‌های زنده به کمک میکروسکوپ فاز متضاد بوده است وجود شبکه آندوپلاسمی در یاخته تأیید شده است و به روش میکرو - سینماتوگرافی، تحرک و قابلیت ارتجاع آن نیز مشخص شده است. شکل ۸-۱ الف نمایی از بخشی از شبکه آندوپلاسمی و شکل ۸-۱ ب ساختمان شبکه آندوپلاسمی و ارتباط آن با هسته‌را نشان می‌دهد.

گاهی در بعضی ازیاخته‌ها و در برخی نواحی یاخته، محتویات بخشی از شبکه آندوپلاسمی صاف با جذب آب رقیق شده و به این ترتیب مجاری این بخش از شبکه آندوپلاسمی وسیع و حفره مانند می‌شوند و واکوئل‌های بزرگی را در یاخته مسن به وجود می‌آورند، در یاخته‌های گیاهان عالی، رشته‌های شبکه آندوپلاسمی می‌توانند با عبور از محل پلاسمودسم‌ها از یاخته‌ای تا یاخته دیگر امتداد یابند.





شکل ۸-۱. تجسم‌هایی از شبکه آندوپلاسمی. الف - نمای سه بُعدی بخشی از شبکه آندوپلاسمی با دو حالت: شبکه آندوپلاسمی دانه‌دار با ریبوزوم‌های فراوان و شبکه آندوپلاسمی صاف، ب - ساختمان شبکه آندوپلاسمی و ارتباط آن با هسته.

عوامل مؤثر در اتصال ریبوزوم‌ها به شبکه آندوپلاسمی

به‌طور کلی می‌توان گفت که سه عامل در چسبیدن ریبوزوم‌ها بر روی شبکه آندوپلاسمی دانه‌دار (RER)

دخالت دارند:

۱- وجود گلیکوپروتئین‌های خاصی به نام (ریبوفورین I و II) که وزن مولکولی آنها تا حدود ۱۳۰۰۰۰ می‌رسد. در ساختمان غشاء RER این گلیکوپروتئین‌ها به حالت دوپار (دیمر) در بین ساختمان‌های لیپیدی قرار دارند. وزن مولکولی ریبوفورین I حدود ۶۵۰۰۰ و ریبوفورین II حدود ۶۳۰۰۰ دالتون است. دو تک‌پار (مونومر) بسیار شبیه و تنها در برخی اسیدهای آمینه تفاوت دارند. دزوکسی کولات سدیم (یک نوع شوینده)، ریبوفورین‌ها را تخریب و از غشاء RER جدا می‌کند و موجب تفکیک ریبوزوم‌ها از غشاء RER می‌شود.

۲- وجود پیوندهای الکترواستاتیک بین زیر واحد بزرگ ریبوزوم با غشاء RER. بارهای مثبت این پیوندها از بخش‌هایی از پروتئین‌های موجود در غشاء شبکه آندوپلاسمی و بارهای منفی آنها از گروه‌های فسفات موجود در RNAهای جزء بزرگ ریبوزوم‌ها است. قابل ذکر است که همواره ریبوزوم‌ها از محل جزء بزرگ خود به غشاء RER متصل می‌شوند و حالت پلی‌زومی دارند. از محلول‌های غلیظ نمکی می‌توان برای خنثی کردن این نیروها و جدا کردن ریبوزوم‌ها از غشاء RER استفاده کرد.

۳- زنجیره‌های پپتیدی در حال تشکیل به وسیله ریبوزوم‌ها. این عامل مهم‌ترین است و به ترتیبی که خواهیم دید زنجیره پلی‌پپتیدی در حال تشکیل به وسیله ریبوزوم‌ها با واسطه پپتید نشانه خود و از جایگاه‌های ویژه به فضای درونی شبکه آندوپلاسمی نفوذ می‌کند و موجب برقراری اتصال ریبوزوم‌ها با غشاء شبکه آندوپلاسمی می‌شود. اگر پوروماپسین که مهارکنندهٔ سنتز پروتئین است را به یاخته‌ها اثر دهیم، ریبوزوم‌ها از غشاء شبکه جدا می‌شوند.

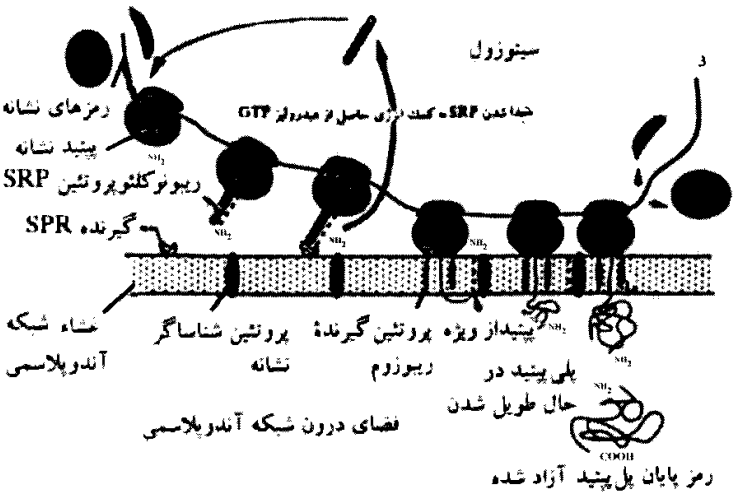
شبکه آندوپلاسمی و سنتز پروتئین‌های صادراتی (ترشحی) و تعدادی از پروتئین‌های غشایی

در فصول بعدی درباره نقش ریبوزوم‌ها در سنتز پروتئین‌ها بحث خواهیم کرد. در اینجا به‌طور خلاصه نتایج اشتراک اختصاصی بین ریبوزوم‌ها و غشاءهای شبکه آندوپلاسمی را بررسی می‌کنیم. یادآور می‌شویم که این اشتراک از راه زیرواحد بزرگ (۶۰ S) ریبوزوم صورت می‌گیرد و برای اتصال ریبوزوم‌ها جایگاه اختصاصی اتصال در سطح خارجی شبکه دانه‌دار وجود دارد. این نقاط دارای پروتئین‌های تداخل یافته و ویژه‌ای به نام ریبوفورین‌ها هستند.

هم‌اکنون به خوبی روشن شده که وقتی فرآیند سنتز پروتئین در سیتوزول با عمل متقابل پلی‌زوم‌ها، RNAپیک و RNAهای ناقل که حمل اسیدامینه‌های مختلف را به عهده دارند آغاز می‌شود، زنجیر پلی‌پپتیدی در حال طویل شدن در داخل یک تونل (مجرا) که در زیرواحد بزرگ ریبوزوم جای دارد قرار می‌گیرد. هنگام سنتز پروتئین‌های صادراتی (ترشحی) و تعدادی از پروتئین‌های غشاءها، این مجرا مستقیماً با مجرایی که در غشاء شبکهٔ آندوپلاسمی قرار دارد مربوط می‌شود (شکل ۸-۲). چگونگی این پدیده که به دخالت پپتید نشانه و گیرنده آن نیاز دارد، در ادامه مطلب آمده است.

زنجیره پلی‌پپتیدی در مرحله‌ای از طویل شدن خود پدیدار می‌شود و در نهایت در فضای درونی شبکه جای می‌گیرد. این آگاهی، به ویژه از بررسی نقش آنزیم‌های تجزیه‌کننده پروتئین‌ها بر روی پلی‌زوم‌ها حاصل شده است. این بررسی حضور یک زنجیره پلی‌پپتیدی را نشان داده است که از سر COOH انتهایی خود به وسیله حدود ۴۰ اسیدامینه حفاظت می‌شود. به‌علاوه در ریبوزوم‌های چسبیده به شبکه، باقیماندهٔ زنجیر که دارای NH_2 انتهایی است در فضای داخلی شبکه حفاظت می‌شود. در نهایت پروتئین ساخته شده در این فضا رها می‌شود (شکل ۸-۲).

رمزهای آغازی ویژه برای پپتیدهای نشانه، در RNA پلی‌زوم‌های چسبیده به شبکه آندوپلاسمی



شکل ۸-۲. تولید زیستی یک پروتئین صادراتی (ترشحی). مراحل مختلف و عوامل اصلی از چپ به راست مشخص شده‌اند.

این موضوع مطرح است که چگونه RNA پیک که به‌طور انتخابی به پروتئین یا برخی پروتئین‌های صادراتی از غشاء ترجمه می‌شود قادر است از ریبوزوم‌های چسبیده به شبکه آندوپلاسمی استفاده کند و نه از ریبوزوم‌های آزاد. به عبارت دیگر اختلاف بین RNAهای پیک که در ریبوزوم‌های آزاد ترجمه می‌شوند یا آنهایی که از ریبوزوم‌های چسبیده به شبکه استفاده می‌کنند چیست؟

فرضیه معروف به پپتید نشانه بر این بناست که RNA پیک پروتئین‌های صادراتی یا عده‌ای از پروتئین‌های غشایی، دارای یک مجموعه از رمزهای ویژه (نشانه) است که بلافاصله پس از رمز آغازی AUG قرار گرفته‌اند؛ تعداد این رمزها را هم‌اکنون ۱۵ تا حدود ۵۰ رمز می‌دانند. آغاز سنتز با ریبوزوم‌های آزاد شروع می‌شود و تنها پس از خروج پپتید نشانه است که زیرواحد بزرگ ریبوزوم به غشاء شبکه می‌چسبد و بنابراین پپتید نشانه پروتئین‌های گیرنده ویژه‌ای را که بر روی غشاء چسبیده‌اند می‌شناسد و نسبت به آنها عکس العمل نشان می‌دهد. این پروتئین‌ها مجرای محل عبور زنجیر پلی‌پپتیدی را تشکیل می‌دهند.

همان گونه که شکل ۸-۲ نشان می‌دهد پس از شروع سنتز پروتئین صادراتی یا برخی پروتئین‌های غشایی به وسیله ریبوزوم‌های آزاد در سیتوزول و ترجمه ترتیب‌های (رمزهای) نشانه که بعد از رمز آغازی قرار گرفته‌اند، پپتید نشانه تشکیل شده، از مجرای ریبوزوم خارج می‌گردد و در سیتوزول پدیدار می‌شود. در این هنگام ریبونوکلئوپروتئینی متشکل از RNAVS و شش جزء پلی‌پپتیدی که آن را به‌طور خلاصه SRP می‌نامند، پپتید نشانه را شناسایی می‌کند و به آن می‌چسبد (شکل ۲-۸)، سپس این مجموعه به وسیلهٔ گیرندهٔ SRP که در غشاء شبکه آندوپلاسمی وجود دارد، گرفته می‌شود. این گیرنده، پپتید نشانه و ریبوزوم متصل به آن را به سوی پروتئین شناساگر نشانه که بخشی پروتئینی در غشاء شبکه آندوپلاسمی است هدایت می‌کند (شکل ۸-۲). در این هنگام با استفاده از انرژی که هیدرولیز GTP به GDP و Pi آزاد می‌شود، SRP از گیرنده‌اش جدا می‌شود و یک چرخه هدف‌یابی مجدد آغاز می‌گردد (شکل ۸-۲). این در حالی است که پپتید نشانه به وسیله پروتئین شناساگر گرفته شده است و ریبوزوم از جزء بزرگ خود به کانال پروتئینی آب‌دوستی که در غشاء شبکه آندوپلاسمی وجود دارد (محل ریبوفورین‌ها؟) چسبیده است (شکل ۸-۲).

پپتید نشانه به وسیله یک پپتیداز نشانه (ویژه) برداشته می‌شود

فرضیه نشانه پیشنهاد می‌کند که پپتید نشانه به وسیله یک پپتیداز (مثلاً پپتیداز نشانه) که در سطح درونی غشاء شبکه آندوپلاسمی وجود دارد برداشته (جدا) می‌شود. پلی‌پپتید در حال ساخته شدن به رشد خود ادامه می‌دهد تا آنجا که در فضای درونی شبکه آندوپلاسمی رها شود (شکل ۸-۲). تصور این است که پس از پایان سنتز پروتئین، با

دخالت یک «عامل جداکننده» ریبوزوم از غشاء شبکه جدا می‌شود.

براساس فرضیه پپتید نشانه بین ترجمه پلی‌پپتید، اتصال ریبوزوم به غشاء و برداشته شدن پپتید نشانه هماهنگی وجود دارد. از سوی دیگر وقتی ترجمه پایان پذیرد، ریبوزوم و کانال پروتئینی آب‌دوست برداشته می‌شوند و شرایط اولیه برقرار می‌گردد.

دلایل زیادی فرضیه نشانه را تأیید می‌کنند که در اینجا تنها به ذکر یک مورد اکتفا می‌شود (بلابل[1] ۱۹۷۷). RNAهای پیک عده زیادی از پروتئین‌های صادراتی بر روی ریبوزوم‌های آزاد (در غیاب غشاءهای میکروزومی) ترجمه شده‌اند و در این تجربیات نشان داده شده که زنجیره‌های پلی‌پپتیدی بسیار طویل‌تری تشکیل می‌شوند. این زنجیره‌ها را پری‌پروتئین‌ها[2] نامند. این نامگذاری به منظور مشخص کردن این پروتئین‌ها از پروتئین‌هاست[3] که پیش‌سازهایی بزرگ‌تر از پروتئین‌های صادراتی‌اند.

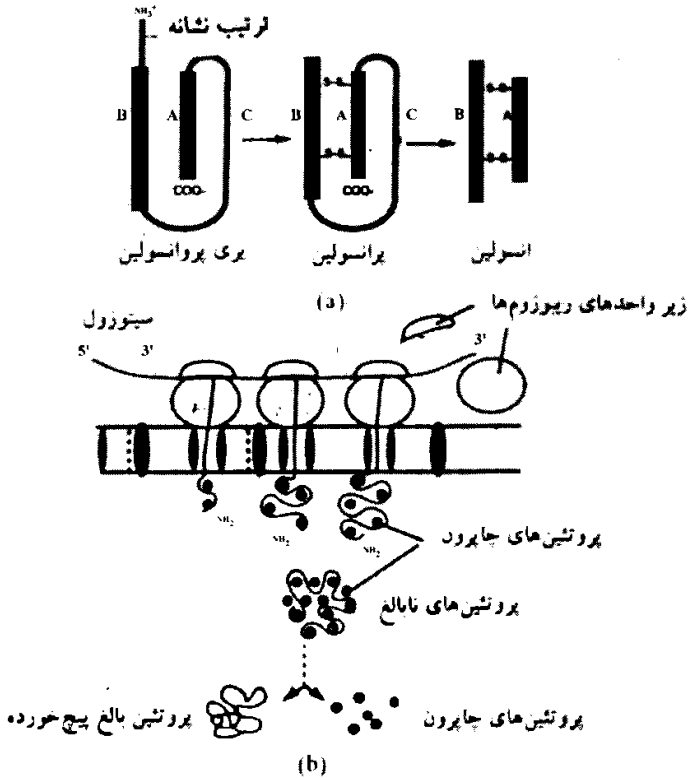
به‌عنوان مثال از پروپروتئین‌ها پروانسولین، پروآلبومین، هورمون پروپاراتیروئیدی و غیره که در شبکه آندوپلاسمی و گلژی وجود دارند را می‌توان نام برد.

RNA پیک آلبومین ابتدا پری‌پروآلبومین را می‌سازد که بعد از حذف پپتید نشانه به پروآلبومین تبدیل می‌شود. پس از مدتی پروآلبومین در مرحله‌ای از ترشح یک مرحله پردازش (بُرش[4]) دیگر را می‌گذارند و به آلبومین نهایی تبدیل می‌شود. پری‌پروآلبومین در سر NH_2 – خود دارای پپتید نشانه است که ترتیبی از ۱۵ تا ۳۰ اسیدامینه‌ای است که اکثر آنها آب‌گریز هستند. این ترتیب به وسیله پپتیداز نشانه برداشته می‌شود (بلابل، ۱۹۷۷).

این پپتید نشانه آب‌گریز با تأثیر خود بر غشاء شبکه موجب اتصال اولیه ریبوزوم به غشاء می‌شود. این اتصال به‌طور فشرده‌ای با جایگاه‌های گیرنده‌های موجود در غشاء شبکه که به احتمال همان ریبوفورین‌ها هستند (I و II) ارتباط دارد. مثال دیگر مورد انسولین است که ابتدا به‌صورت پری‌پروانسولین تولید می‌شود و تا رسیدن به انسولین نهایی مراحل پردازش زیر را می‌گذارند:

مطلب قابل توجه دیگر، بلوغ (رسیدگی) پروتئین‌های ترشحی و از جمله چگونگی ایجاد پیچیدگی‌های ساختمان‌های دوم و سوم آنها است. تصورات قبلی بر این بود که نوع و ترتیب آرایش اسیدهای امینه در ساختمان نخستین پروتئین‌ها، عامل ایجاد پیچیدگی‌های ساختمان‌های دوم و سوم آنها است. مطالعات اخیر نشان داده است که پروتئین‌های ویژه‌ای که آنها را «پروتئین‌های پوشاننده[5]» می‌نامند نیز در ایجاد صحیح پیچیدگی‌ها و شکل ساختمان دوم و سوم مؤثرند. این پروتئین‌ها که انواع مختلفی دارند (Hsp_{70}، Hsp_{40}، GroEL و ...) و به حالت تعاون با یکدیگر عمل می‌کنند، ضمن سنتز پروتئین‌های ترشحی و به‌تدریج که زنجیره پپتیدی به فضای درونی شبکه آندوپلاسمی می‌رسد، روی اسیدهای امینه آب‌گریز آن را می‌پوشانند و از برهم‌کنش این بخش‌های آب‌گریز و بنابراین از به‌هم تابیدگی‌های زودرس و نادرست جلوگیری می‌کنند. همچنین این پروتئین‌ها از اتصال و توده‌ای شدن زنجیره‌های پلی‌پپتیدی مجاور، ممانعت می‌نمایند (این اعمال برای پروتئین‌های سنتز شده به وسیله ریبوزوم‌های آزاد سیتوپلاسمی نیز صادق است). «پروتئین‌های پوشاننده» در دوباره طبیعی‌شدن پروتئین‌هایی که ساختمان سوم

1- Blabel 2- Preproteins 3- Proproteins 4- Processing 5- Proteins Chaperons



شکل ۸-۳. a) پردازش پس از ترجمه، برای تبدیل پری‌پروانسولین به انسولین نهایی b) دخالت «پروتئین‌های پوشاننده» در بلوغ و ایجاد ساختمان سوم پروتئین‌ها

آنها غیرطبیعی شده است نیز نقش دارند. شکل ۸-۳ ب، تجسمی ساده از مراحل بلوغ پروتئین‌ها با دخالت «پروتئین‌های پوشاننده» را نشان می‌دهد.

تجربیاتی که با استفاده از ریبونوکلئاز انجام شده‌اند نشان می‌دهند که، در انتهای ۳ بر روی RNAهای پیک مربوط به پروتئین‌های صادراتی جایگاهی مقاوم در برابر حمله‌های آنزیمی وجود دارد. این کشف موجب تأیید این فرضیه است که قطعه (بخش) پُلی A موجود در RNA پیک می‌تواند به غشاء شبکه آندوپلاسمی بچسبد.

پروتئین‌های غشایی در ساختمان‌های مختلفی ساخته و مجتمع می‌شوند

مشکل عمده‌ای در ارتباط با سنتز پروتئین‌های غشایی شبکه آندوپلاسمی و پروتئین‌های دیگر سیستم غشایی درونی یعنی پوشش هسته‌ای، دستگاه گلژی و غشاهای دیگر اندامک‌های سیتوپلاسمی مطرح شده است.

تمام این غشاها دارای یک سطح سیتوپلاسمی و یک سطح روزنی (درونی) هستند و مانند غشاء پلاسمایی دارای پروتئین‌های حاشیه‌ای و درونی‌اند که می‌توانند روی هر یک از دو سطح غشاء جای گیرند. به‌علاوه این غشاء دارای پروتئین‌های درونی دیگری هستند که به‌طور کامل در دو لایه لیپیدی غشاءها پنهان شده‌اند یا از دو لایه لیپیدی گذشته و در هر دو سطح غشاء قرار گرفته‌اند. نحوه سنتز این انواع مختلف پروتئین‌ها چگونه است؟

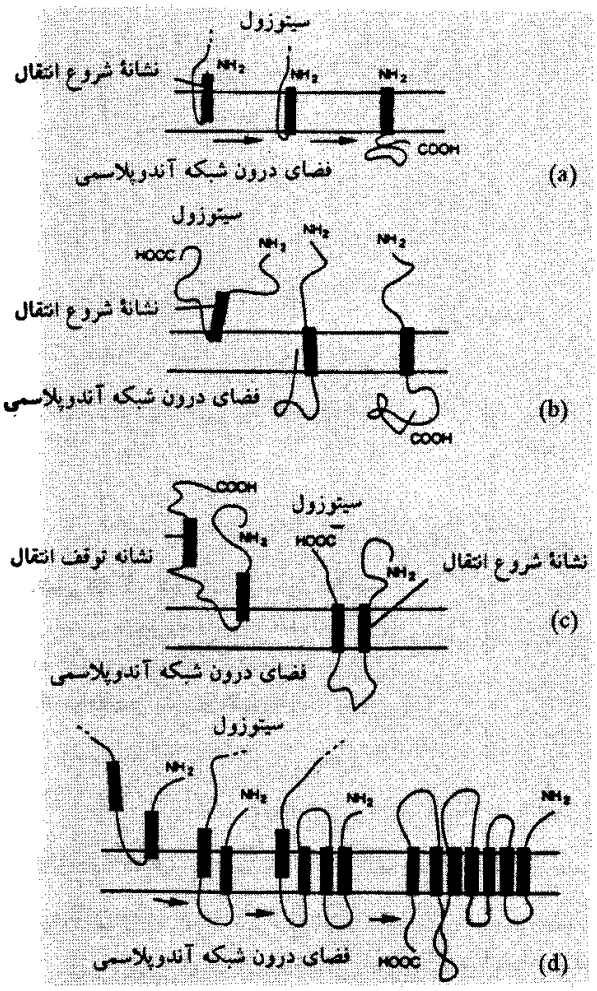
پروتئین‌های حاشیه‌ای و درونی سطح سیتوپلاسمی می‌توانند به وسیله ریبوزوم‌های آزاد یا ریبوزوم‌های چسبیده به شبکه که در همین بخش یاخته‌ای جای دارند سنتز شوند. در اریتروسیت‌ها که شبکه آندوپلاسمی ندارند، تمام پروتئین‌های سیتوپلاسمی به وسیلهٔ ریبوزوم‌های آزاد ساخته می‌شوند. از طرفی سنتز پروتئین به وسیله ریبوزومی که به غشاء شبکه چسبیده است می‌تواند موجب شود که این پروتئین به‌طور مستقیم در شبکه آندوپلاسمی قرار گیرد.

این حالت در مورد سیتوکروم b_5 یکی از پروتئین‌های درون غشایی و آمفی‌پاتیک که در سمت سیتوپلاسمی غشاء شبکه قرار دارد صادق است.

تصور می‌شود که پروتئین‌های حاشیه‌ای و درونی که در سطح روزنی (درونی) شبکه قرار دارند به وسیله ریبوزوم‌های چسبیده به غشاء شبکه سنتز شده و در ساختمان شبکه وارد می‌شوند.

جایگاه و نحوه سنتز پروتئین‌هایی که از غشاء گذشته و در هر دو سطح غشاء قرار گرفته‌اند حالتی بسیار اختصاصی است. تداخل وقتی می‌تواند صورت پذیرد که تخلیه شعاعی زنجیره پلی‌پپتیدی که دارای یک بخش بسیار آب‌گریز است، کامل نباشد و بخش آب‌گریز در غشاء پنهان بماند (شکل ۸-۴).

یادآور می‌شویم که پروتئین‌های بین غشایی آرایش ویژه دارند. انتهای NH_2 – آن به سوی سطح روزنی (درونی) است و انتهای COOH – آنها در سطح سیتوپلاسمی است. این طرز قرار گرفتن، گلیکوفورین را به خاطر می‌آورد که یکی از پروتئین‌های بین غشایی اریتروسیتی است که البته سرهای آن در جهتی عکس حالت فوق‌الذکر است (شکل ۴-۸). این معکوس شدن قطبیت می‌تواند از راه ادغام یک حفره دارای پروتئین با غشاء خارجی به راحتی توضیح داده شود.



شکل ۸-۴. ترتیب‌های موقعیت‌زا و پروتئین‌های عرض غشایی. نمای فرضیه‌ای a) نشانه شروع انتقال در ابتدای پلی‌پپتید، پروتئین در سر NH_2 دارای تنها ناحیه چرخیده به درون RER است. b) نشانه شروع انتقال در وسط پلی‌پپتید. پروتئین دارای دو ناحیه است: یکی سیتوپلاسمی و دیگری روزنی (به طرف درون شبکه). c و d) تناوب نشانه شروع و توقف انتقال که موجب می‌شود پروتئین‌های عرض غشایی چند بار از غشاء بگذرند (به حالت مارپیچ آلفا). اقتباس از کار B.ALBERTS و همکاران ۱۹۸۹.

اگر سیالیت غشاء و نیز این واقعیت که بخش‌های مختلف سیستم غشایی درونی با غشاء پلاسمایی پیوستگی زمانی و مکانی دارند نادیده گرفته شود فرآیند سنتز زیستی غشاء به روشنی درک نخواهد شد.

به‌طوری که در فصل‌های آینده خواهیم دید، این ارتباط از راه ادغام غشاها، ترشح، دفع یاخته‌ای (اگزوسیتوز) و جذب یاخته‌ای (آندوسیتوز) حاصل می‌شود.

به‌طور خلاصه، سنتز پروتئین‌های غشایی و تجمع آنها فرآیندی بسیار پیچیده است؛ پروتئین‌های سطح سیتوپلاسمی می‌توانند به وسیله ریبوزوم‌های آزاد یا مستقیماً از ریبوزوم‌های چسبیده به غشاء سنتز شده باشند. پروتئین‌هایی که حفره درونی شبکه را فرش می‌کنند (می‌پوشانند) یا از غشاء می‌گذرند به وسیله ریبوزوم‌های چسبیده به شبکه آندوپلاسمی سنتز می‌شوند.

خلاصه: (سنتز پروتئین‌های صادراتی - فرضیه نشانه)

مکانیسم‌های مولکولی مربوط به سنتز پروتئین‌ها در فصول مربوط به زیست‌شناسی مولکولی بررسی خواهد شد. این فرآیند در سیتوزول صورت می‌گیرد و زنجیره پلی‌پپتیدی پروتئین‌های صادراتی در یک «شیار» یا «تونل»

موجود در زیر واحد S ۶۰ ریبوزومی طویل شده از یک کانال (مجرا) در فضای شبکه آندوپلاسمی نفوذ می‌کند.

فرضیه نشانه برای توضیح مکانیسمی است که به RNA پیک امکان می‌دهد تا ریبوزوم‌های آزاد را از ریبوزوم‌های چسبیده به شبکه بازشناسد. تصور می‌شود که RNA پیک پروتئین‌های صادراتی دارای یک مجموعه از رمزهای ویژه (نشانه) است که بعد از رمز آغاز AUG قرار گرفته‌اند. به ازای ترجمه این رمزها (حدود ۱۵ تا ۵۰ رمز)، بخش پپتید نشانه تشکیل می‌شود که به وسیله SRP شناسایی و سپس به کمک گیرندهٔ SRP در غشاء شبکه آندوپلاسمی، جذب و به پروتئین شناساگر پپتید نشانه که آن نیز در غشاء شبکه آندوپلاسمی قرار دارد، تحویل می‌گردد. همچنین تصور می‌شود که در سطح روزنی، یک پپتیداز نشانه، پپتید نشانه را جدا می‌کند. به این ترتیب RNA پیک یک پری‌پروتئینی را می‌سازد که وزن مولکولی آن خیلی بیش از پروتئین نهایی است. پپتید نشانه دارای ۱۵ تا ۵۰ اسیدامینه است که اغلب آب‌گریز هستند. این پپتید نشانه احتمالاً اتصال اولیه بین ریبوزوم و شبکه را برقرار می‌سازد.

چگونگی سنتز پروتئین‌های مختلف موجود در غشاء مسئله قابل توجه دیگری را ایجاد می‌کند. یک حالت خاص این مورد مربوط به پروتئین‌هایی می‌شود که از تمام عرض غشاء می‌گذرند (پروتئین‌هایی بین غشایی یا غشاءگذر)، این پروتئین‌ها به وسیله ریبوزوم‌های چسبیده به غشاء شبکه آندوپلاسمی سنتز می‌شوند و بخشی از آنها که در غشاء پنهان می‌ماند بسیار آب‌گریز است.

میکروزوم‌ها[1]

هنگام جداسازی اندامک‌های مختلف یاخته‌ای مثل هسته یا میتوکندری‌ها که با استفاده از اولتراسانتریفوگاسیون صورت می‌گیرد قطعاتی از سیستم غشاء درون یاخته‌ای خرد و جدا شده و به صورت حفره‌های غشایی کوچکی درمی‌آیند که آنها را میکروزوم نامند. با شیب غلظت مناسب می‌توان (بخش میکروزومی) را جدا کرد.

بررسی‌هایی که با استفاده از میکروسکوپ الکترونی بر روی (بخش میکروزومی) انجام شده نشان می‌دهد که میکروزوم‌ها از قطعاتی از سیستم واکوئلی و نیز قطعات شبکه آندوپلاسمی صاف و زبر و دستگاه گلژی ساخته شده‌اند. میکروزوم‌ها در یاخته‌های زنده و سالم دیده نمی‌شوند بلکه نتیجه تکه‌تکه شدن قسمت‌هایی از سیستم غشایی درون یاخته‌ای هستند. ضمن خرد کردن یاخته‌ها لوله‌ها و کیسه‌های شبکه آندوپلاسمی شکسته می‌شوند و قطعات غشایی شبکه به سرعت حفره‌های میکروزومی را به وجود می‌آورند که تعدادی از آنها دارای ریبوزوم و برخی فاقد ریبوزوم‌اند.

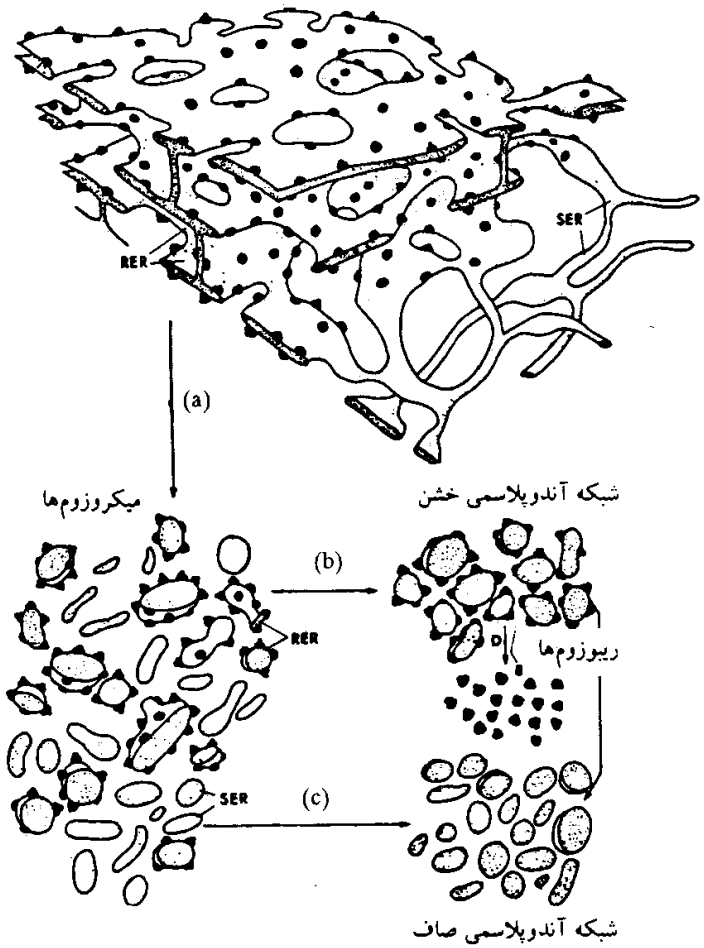
جداکردن ریبوزوم‌ها از غشاء شبکه زبر، RER، شبکه آندوپلاسمی صاف

با استفاده از اختلاف وزن مخصوص، می‌توان این دو نوع میکروزوم را جدا کرد. همچنین می‌توان ریبوزوم‌ها را از بخش غشایی میکروزوم‌ها جدا کرد. با استفاده از محلول‌های غلیظ نمکی و یا به کمک پوروماپسین که رشد زنجیره پلی‌پپتیدی را متوقف می‌سازد غشاهای میکروزومی از ریبوزوم‌ها جدا می‌شود.

با استفاده از دزوکسی کولات که غشاء میکروزومی را حل می‌کند می‌توان ریبوزوم‌ها را جدا کرد (شکل ۸-۵) و

1- Microsomes

بالاخره با استفاده از روش سونیکاسیون[1] و یا با استفاده از محلول‌های رقیقی از پاک‌کننده‌ها که سوراخ‌هایی را در غشاء ایجاد می‌کنند می‌توان محتویات درونی شبکه را که بیشتر از پروتئین‌های ترشحی هستند (آلبومین و دیگر پروتئین‌های سرینی در یاخته‌های کبدی) جدا کرد.



شکل ۸-۵. نمایش سه بعدی سیستم غشایی درونی a) جداکردن میکروزوم‌ها با استفاده از همگن‌سازی و فرامرکزگریزی افتراقی (مرحله‌ای) b) و c) جداکردن حفره‌های میکروزومی زبر و صاف.

غشاهای میکروزومی ترکیبات لیپیدی و پروتئین‌های پیچیده

میکروزوم‌ها حدود ۱۵ تا ۲۰ درصد حجم کلی یاخته‌های کبدی را می‌سازند. این بخش دارای ۵۰ تا ۶۰ درصد تمامی RNA این یاخته‌ها است (به دلیل وجود ریبوزوم‌ها).

غشاهای میکروزومی دارای مقدار زیادی لیپید هستند و در آنها فسفولیپیدها، لیپیدهای خنثی، فسفاتیدیل اینوزیتول، پلاسمالوژن‌ها و چند نوع گانگلیوزید وجود دارد. در شبکه صاف نسبت $\frac{L}{P}$ (چربی‌به پروتئین) بیش از دستگاه گلژی و شبکه دانه‌دار است. همچنین غشاء گلژی دارای مقدار کمتری اسفنگومیلین و کلسترول می‌باشد.

غشاءهای میکروزومی دارای چند نوع پروتئین اختصاصی به ویژه از نوع آنزیمی‌اند که به‌عنوان نشانه‌گذار برای شناسایی این بخش و تمایز آن از غشاهای گلژی، ذرات ترشحی و یا غشاء پلاسمایی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

پروتئین‌های غشایی شبکه آندوپلاسمی به وسیله الکتروفورز روی ژل پلی‌آکریل‌آمید با DSD (دو دسیل سولفات سدیم[2]) جدا شده‌اند. این روش امکان جداسازی پروتئین‌ها را برحسب وزن مولکولیشان فراهم می‌سازد. در شبکه آندوپلاسمی دانه‌دار پانکراس، حداقل ۳۰ باند پلی‌پپتیدی شناخته شده که وزن مولکولی آنها از ۱۵۰۰۰ تا ۱۵۰۰۰۰ دالتون است. این پروتئین‌ها با آنچه در غشاهای گلژی یافت می‌شوند (به تعداد کمتر) و نیز از باندهایی که با پروتئین‌های ذرات زیموژن[3] (پیش آنزیم) مطابقت می‌کنند، متفاوت هستند.

تاکنون به وجود دو باند پروتئینی یعنی ریبوفورین‌های I و II که در شبکه دانه‌دار وجود دارند ولی در شبکه صاف موجود نیستند و نقش آنها در اتصال ریبوزوم‌ها به غشاء شبکه است اشاره کرده‌ایم.

دو سیستم انتقال الکترون در غشاء میکروزوم‌ها وجود دارد:

شبکه آندوپلاسمی دارای آنزیم‌هایی است که برای سنتز تری‌گلیسریدها، فسفولیپیدها و کلسترول به کار گرفته

1- Sonication 2- Dodecyl sulfat sodium 3- Zymogen

می‌شوند. این لیپیدها نه تنها در غشاء شبکه موجودند بلکه به اندامک‌های دیگر نیز انتقال می‌یابند (به کمک ناقل‌های پروتئینی اختصاصی که می‌توانند از سیتوزول بگذرند). تعدادی از فعالیت‌های آنزیمی که به وسیله میکروزوم‌ها انجام می‌شود به شرح زیر است:

سنتز گلیسریدها: تری‌گلیسریدها، فسفاتیدها، گلیکولیپیدها و پلاسمالوژن‌ها، سنتز اسیدهای چرب؛

بیوسنتز استروئیدها: بیوسنتزکلسترول، هیدروژن‌دار کردن پیوندهای غیراشباع موجود در استروئیدها، تغییراتی در استروئیدها که به حضور $NADPH_2$ و اکسیژن نیاز دارد مثل ایجاد ترکیبات معطره (آروماتیک)، هیدروکسیلاسیون؛

خنثی‌کردن اثر مواد دارویی و مخدری که نیاز به حضور $NADPH_2$ و اکسیژن دارد

مثل هیدروکسیلاسیون ترکیبات حلقوی، اکسایش زنجیرهای جانبی در این مواد سمی، دآمیناسیون، اکسایش تیو - اترها، دسولفوراسیون؛

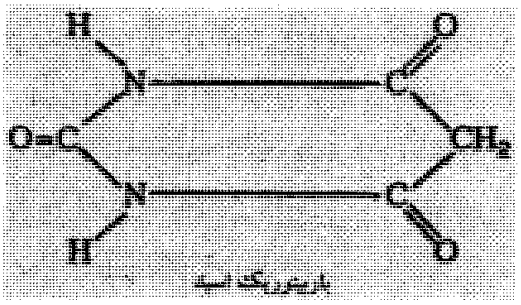
سنتز اسیدهای ال - آسکوربیک، متابولیسم اسید اوریدین دی فسفواورونیک[1]

دفسفوریلاسیون اوریدین دی فسفو - گلوکز، آریل و استروئید سولفاتازها.

در غشاء میکروزوم‌ها دو سیستم انتقال الکترون وجود دارد که شامل دو نوع فلاوپروتئین به اسامی «NADH سیتوکروم C ردوکتاز» و «NADH سیتوکروم b_5 رودکتاز» و دو هِموپروتئین «سیتوکروم b_5» و «سیتوکروم P_{450}» است.

سیتوکروم P_{450}- دارای وزن مولکولی ۵۰۰۰۰ و ماکزیمم جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر است. این هموپروتئین در یاخته‌های کبدی بیش از سایر یاخته‌ها وجود دارد و مقدار آن ضمن تیمار جانوران با «عوامل القایی» مختلف مثل باربی‌تورات‌ها[2]، هیدروکربورهای چند حلقه‌ای و نظایر آنها تغییر می‌کند.

این پروتئین «سیتوکروم P_{450}» به‌صورت یک اکسیداز انتهایی عمل می‌کند. در کبد موجب عمل ضد سمی است و عوامل زیانبار (سموم) و تعداد زیادی از مواد دارویی را از طریق اکسیداسیون و نیز هورمون‌های استروئیدی را با هیدروکسیلاسیون غیرفعال می‌سازد. بالعکس همین سیستم می‌تواند عوامل سرطان‌زا را فعال کند (می‌تواند یک ماده دارویی یا مواد دیگری را با اکسیداسیون به مواد سرطان‌زا تبدیل کند). برای مثال می‌تواند ۱ و ۲ (یا ۲ و ۳) دی‌بنزوپیرن موجود در گوشت برشته شده یا دود حاصل از دخانیات را به ۵ و ۶ اپوکسی که به شدت سرطان‌زا است، تبدیل کند.



تزریق باربی‌تورات به موش موجب افزایش سریع شبکه آندوپلاسمی صاف و نیز افزایش بسیار زیاد سیتوکروم P - 450 می‌شود در حالی که ناقل‌های دیگر الکترون تغییر نمی‌کنند.

محاسبه کرده‌اند که در چنین وضعیتی Cyto P - 450 می‌تواند ۱۰٪ مقدار کل پروتئین‌های میکروزومی را شامل باشد. هر مولکول NADH - سیتوکروم C ردوکتاز می‌تواند با ۲۰ تا ۳۰ مولکول سیتوکروم Cyto 450 - P وارد عمل شود (عمل کند).

سیتوکروم P_{450} در واقع یک آریل هیدروکسیلاز است و با هیدروکسیلاسیون هسته‌های آریل (ترکیبات حلقوی که یک هیدروژن از حلقه آنها برداشته شده) موجب تغییر شیمیایی و تغییر خواص آنها می‌شود.

ناقل‌های الکترون به منظور تشکیل کمپلکس‌های مشخصی در غشاء مجتمع می‌شوند. در این مُدل،

1- UDP Uronique 2- Barbiturates

فلاوپروتئین در وسط کمپلکس قرار دارد و به وسیله مولکول‌های Cyto b_5 و Cyto 450 − P احاطه می‌شود.

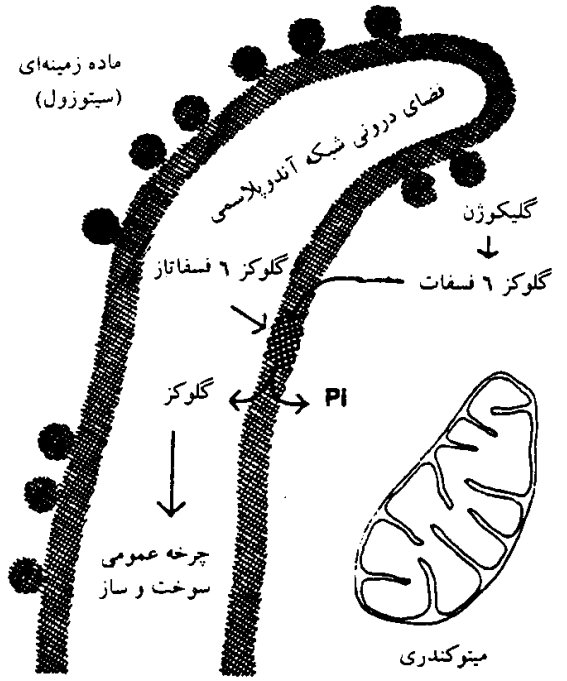
دومین زنجیر انتقال الکترون در میکروزوم‌ها از «NADH − سیتوکروم b_5 ردوکتاز» و سیتوکروم b_5 و اسید چرب اسیل - کوآنزیم A دساتوراز (غیراشباع‌کننده) ساخته شده است. این سیستم، از الکترون‌های NADH برای غیراشباع کردن اسیدهای چرب استفاده می‌کند.

آنزیم‌های میکروزومی - گلیکوزیداسیون و هیدروکسیلاسیون اسیدهای امینه :

در سطح روزنی (درونی) شبکه آندوپلاسمی آنزیم‌هایی وجود دارند که می‌توانند ترکیبات آزاد شده در فضای درون شبکه را تغییر دهند برای مثال، پپتیدازها می‌توانند قطعاتی از پیش‌سازهای پروتئینی را قطع کنند و آنزیم‌های دیگری می‌توانند پلی‌پپتیدهای تشکیل شده را با عمل گلیکوزیداسیون یا با هیدروکسیلاسیون اسیدهای امینه تغییر دهند.

Mg^{2+} − ase − ATP و گلوکز ۶ فسفاتاز آنزیم‌های قابل توجه دیگر شبکه‌اند. گلوکز ۶ فسفاتاز در یاخته‌های کبد موجب جدا شدن فسفات از گلوکز ۶ فسفات می‌شود و با این عمل جالب خود موجبات رهایی گلوکز را فراهم می‌سازد.

همان‌طور که شکل ۸-۶ نشان می‌دهد گلوکز ۶ فسفات از تجزیه گلیکوژن در زمینه سیتوپلاسم ایجاد می‌شود و آنزیم که در غشاء شبکه وجود دارد احتمالاً در جهت شعاعی عمل کرده و موجب عبور گلوکز و ورود آن به فضای درون شبکه می‌گردد.



شکل ۸-۶. نمای دخالت شبکه آندوپلاسمی صاف در عمل تجزیه گلیکوژن (گلیکوژنولیز) و آزاد شدن گلوکزی که از آن حاصل می‌شود. گلوکز ۶ فسفاتاز در غشاء جای دارد و طرز قرار گرفتن شعاعیش به آن امکان می‌دهد تا گلوکز ۶ فسفات رسیده از سطح سیتوپلاسمی را در یافت کند؛ گلوکز حاصل از اثر آنزیم گلوکز ۶ فسفاتاز در فضای شبکه آندوپلاسمی نفوذ می‌کند.

بررسی‌هایی که به تازگی بر روی جانوران انجام شده است نشان می‌دهد که، به هنگام تمایز یاخته‌ها در کبد، گلوکز فسفاتاز و NADH − سیتوکروم C ردوکتاز ابتدا در بخش دانه‌دار و بعد در بخش صاف شبکه آندوپلاسمی پدیدار می‌شوند.

شبکه سارکوپلاسمی عضله تمایز شیمیایی ویژه‌ای را نشان می‌دهد. عمل اصلی آن به وسیله آت‌پ‌آزِ فعال شده با Ca^{2+} انجام می‌شود که کلسیم را به داخل فضای شبکه پمپ می‌کند و به این ترتیب تراکم آن را در سیتوزول کاهش می‌دهد؛ این عمل موجب آرامش عضلانی می‌شود. تحریک لازم برای انقباض عضله موجب عمل عکس شده و یون‌های کلسیم شبکه سارکوپلاسمی را آزاد می‌کند.

آنزیم‌های میکروزومی - عدم تقارن در غشاء

همچون سایر غشاءها، آنزیم‌های اصلی شبکه آندوپلاسمی نیز به صورتی نامتقارن در خلال غشاء پراکنده

شده‌اند. وقتی شبکه به‌صورت قطعات میکروزوم خرد شده باشد، سطح میکروزومی خارجی با سطح سیتوپلاسمی شبکه آندوپلاسمی مطابقت می‌کند و تمام پروتئین‌هایی که در این سطح وجود دارند به‌صورت هدفی برای تهاجم پروتئازها و همه عوامل مهاجم دیگر درمی‌آیند. از بین آنزیم‌های سطح سیتوپلاسمی سیتوکروم b_5، NADH – سیتوکروم b_5 ردوکتاز، NADH – سیتوکروم C ردوکتاز، سیتوکروم P – 450 و ´۵ نوکلئوتیداز را نام می‌بریم. در سطح روزنی (درونی)، گلوکز ۶ فسفاتاز، نوکلئوزیددی‌فسفاتاز و βگلوکورونیداز وجود دارند.

بسیاری از این آنزیم‌ها، به ویژه سیتوکروم b_5 به وسیلهٔ سر آب‌گریز خود که در بین دو لایه لیپیدی نفوذ می‌کند، به غشاء متصلند.

خلاصه - میکروزوم‌ها

سانتریفوگاسیون افتراقی (مرحله‌ای) امکان می‌دهد که بخش عمده‌ای از ساختمان‌های تشکیل دهندهٔ سیستم غشایی درونی را به‌صورت بخش میکروزومی جدا سازیم. سانتریفوگاسیون با استفاده از شیب غلظت شبکه آندوپلاسمی صاف و دانه‌دار را از گلژی جدا می‌کند، همچنین می‌توان غشاءها، ریبوزوم‌ها و محتویات درونی شبکه آندوپلاسمی را جدا کرد.

شبکه آندوپلاسمی دارای آنزیم‌های لازم برای سنتز تری‌گلیسریدها، فسفولیپیدها و کلسترول است. در شبکه دو سیستم انتقال الکترون وجود دارد که دارای دو فلاوپروتئین NADH– سیتوکروم C ردوکتاز و NADH – سیتوکروم b_5 ردوکتاز و دو هموپروتئین «Cyto b_5 و Cyto P – 450» است.

یاخته‌های کبدی بیشترین تراکم سیتوکروم P_{450} (که طیف ۴۵۰ نانومتر را جذب می‌کند) را دارند و این تراکم به وسیلهٔ «عوامل القایی» (باربی‌تورات‌ها، هیدروکربورهای چند حلقه‌ای و مانند آن) افزایش می‌یابد.

این هِموپروتئین در عمل ضد سمی به کار گرفته می‌شود و از راه اکسیداسیون موجب غیرفعال شدن برخی داروها می‌گردد. هورمون‌های استروئیدی را از راه هیدروکسیلاسیون غیرفعال می‌کنند. علاوه بر این، این ماده می‌تواند یک دارو یا برخی مواد دیگر را به مواد سرطان‌زا تبدیل کند. به منظور توضیح نحوهٔ ارتباط یک مولکول – NADH سیتوکروم C ردوکتاز یا ۲۰ تا ۳۰ مولکول از Cyto P – 450، تصور می‌شود که ناقل‌های الکترون به‌صورت گروهی در غشاء قرار گرفته‌اند. دومین زنجیر انتقال الکترون شامل NADH – سیتوکروم b_5 ردوکتاز و Cyto b_5 و اسید چرب اسیل‌کوآنزیم A – دساتوراز است. آنزیم‌های دیگری که در شبکه وجود دارند عبارتند از: پپتیدازها، گلیکوزیل ترانسفرازها و هیدروکسیلازها که موجب تغییرات پلی‌پپتیدهای در حال تشکیل می‌شوند. گلوکز ۶ فسفاتاز تجزیهٔ گلیکوژن در شبکه صاف را رهبری (کاتالیز) می‌کند. این آنزیم‌های متنوع نسبت به سطح سیتوپلاسمی و سطح روزنی غشاء شبکه دارای جایگزینی نامتقارن و متفاوتی هستند.

اعمال زیستی شبکه آندوپلاسمی

تنوع اشکال مختلف شبکه آندوپلاسمی در انواع یاخته‌ها، و تغییراتی که در آن در اثر تمایز و یا فعالیت یاخته‌ای پدید می‌آیند، تجزیه و تحلیل کارهای مختلف برای این شبکه را مشکل ساخته است. شبکه آندوپلاسمی بدون شک اعمال فیزیولوژیکی متفاوتی دارد که هنوز به‌خصوص در یاخته‌های گیاهی به خوبی شناخته نشده‌اند، بیشتر اطلاعاتی که در مورد اعمال فیزیولوژیکی شبکه آندوپلاسمی و به وسیلهٔ پژوهشگران زیست شیمی به‌دست آمده است در مورد یاخته‌های جانوری است و به‌طور کلی شامل اعمال زیر است:

۱- بیوژنز غشاء در وضعیت‌های مختلف

با این که بخش بزرگی از غشاء شبکه آندوپلاسمی که دارای ریبوزوم است در ساخت پروتئین به‌طور فعال شرکت می‌کند ولی در این غشاها آنزیم‌های زیادی وجود دارد که در کارهای متفاوتی مانند بیوژنز برخی قسمت‌های تشکیل دهندهٔ غشاها دخالت می‌کنند. بیوژنز غشاء پدیده‌ای چند مرحله‌ای است. گرچه منشأ اصلی غشاء شبکه آندوپلاسمی هنوز به دقت مشخص نیست امّا، بررسی‌های انجام شده به وسیلهٔ میکروسکوپ الکترونی که مربوط به دنبال‌کردن مراحل تمایز یاخته‌ای است پیشنهاد می‌کند که منشأ آن از جوانه‌زدن پوشش هسته‌ای می‌باشد. در مرحلهٔ تلوفاز، پوشش هسته‌ای دوباره از حفره‌های شبکه آندوپلاسمی تشکیل می‌شود.

وابستگی‌ای را بین قسمت صاف و زبر شبکه آندوپلاسمی در یاخته‌های در حال تمایز می‌توان یافت. برای مثال در یاخته‌های جنینی جگر موش صحرایی افزایش قابل ملاحظه‌ای در قسمت زبر دیده می‌شود در صورتی که بعد از تولد، افزایش قسمت صافِ شبکه، چشمگیرتر است.

بررسی‌های انجام شدهٔ به‌وسیلهٔ لوسین C^{14} و گلیسرول C^{14} برای نشان‌دار ساختن پروتئین و چربی‌نشان می‌دهند که در مرحله افزایش حجم شبکه آندوپلاسمی سنتز مواد پروتئینی و چربی در قسمت زبر بیشتر از قسمت صاف می‌باشد. بنابراین می‌توان گفت که قسمت زبر ممکن است قبل از قسمت صاف ساخته شود. چون هنگام تقسیم یاخته‌ای قسمت‌های غشایی یاختهٔ اولیه به یاخته‌های جدید پخش می‌شوند، عقیده بر این است که غشای جدیدی ساخته نمی‌شود بلکه غشای به‌دست آمده نتیجه امتداد شبکه قبلی می‌باشد.

امروزه عقیده بر این است که بیوژنز غشاء در اثر پدیده‌ای چند مرحله‌ای صورت می‌گیرد، بدین شکل که اول یک غشاء لیپیدی همراه با پروتئین ساخته می‌شود و سپس ترکیباتی مانند آنزیم‌ها، قندهای مخصوص و یا لیپیدها به‌طور پشت‌سرهم به آن اضافه می‌شوند. این مراحل را می‌توان به‌عنوان تکامل غشایی در نظر گرفت. وجود انواع مختلف آنزیم‌های بیوسنتزی در غشاء این نظر را تقویت می‌کند که غشاءهای درون یاخته‌ای در مرحله اول در قسمت زبر شبکه ساخته می‌شوند و در اثر تغییرات متوالی به غشاءهای قسمت صاف شبکه و دستگاه گلژی می‌روند.

۲- نقش متابولیکی (دخالت در سوخت‌وساز یاخته‌ای)

در شبکه آندوپلاسمی آنزیم‌های بسیار متنوعی شناخته شده که در اعمال متفاوت متابولیکی و متناسب با نیازهای یاخته‌ای وارد عمل می‌شوند. برخی از این فعالیت‌ها به شرح زیر است:

دخالت در متابولیسم قندها

الف - شبکه آندوپلاسمی با داشتن گلوکز ۶ فسفاتاز در تجزیه تدریجی یا مرحله‌ای و غیرمستقیم گلیکوژن دخالت می‌کند. همان گونه که قبلاً شرح داده شد گلوکز ۶ فسفاتاز که در بخش روزنی غشاء شبکه قرار دارد (شکل ۸-۶) با جداکردن گروه فسفات از گلوکز ۶ فسفات، گلوکز را به فضای درونی شبکه و گروه فسفات رابه سوی سیتوزول هدایت می‌کند. این عمل که اساساً به وسیله شبکه صاف انجام می‌شود، شرایط را برای مراحل متابولیکی بعدی گلوکز و استفاده از آن فراهم می‌سازد. همچنین با کاهش مقدار گلوکز ۶ فسفات در سیتوزول زمینه را برای تجزیه گلیکوژن، تشکیل گلوکز، ترکیب آن با گروه‌های فسفات و ایجاد دوبارهٔ گلوکز ۶ فسفات آماده می‌سازد. فراوانی لوله‌های شبکه در بخش‌های غنی از گلیکوژنِ سیتوزول دلیلی بر این فرآیندها است.

ب - حضور گلیکوزیل ترانسفرازها در شبکه آندوپلاسمی موجب می‌شود که حداقل بخشی از پدیده‌های

گلیکوزیلاسیون برخی پلی‌پپتیدها و لیپیدهایی که در بخش‌های مختلف شبکه ساخته می‌شوند، با دخالت این آنزیم‌ها صورت گیرد؛ با این عمل که بخش عمده‌اش در شبکه صاف انجام می‌شود، گلیکوپروتئین‌ها و گلیکولیپیدها که به ویژه در برقراری اتصال‌های یاخته‌ای اهمیت دارند یا به‌عنوان گیرنده‌های سطح یاخته مورد استفاده قرار می‌گیرند، تولید می‌شوند. بایستی درنظر داشت که مراحل نهایی گلیکوزیلاسیون عده‌ای از این ترکیبات در حدّ دیکتیوزوم‌ها در دستگاه گلژی انجام می‌شود که در بحث‌های آینده به بررسی آن خواهیم پرداخت (مراجعه به فصل ۹).

دخالت در متابولیسم لیپیدها

گرچه شبکه آندوپلاسمی دانه‌دار در یاخته‌هایی که ساخت پروتئین‌ها و به ویژه پروتئین‌های ترشحی زیادی دارند، فراوان و فعّال است اما در یاخته‌هایی که ساخت لیپیدها زیاد است، شبکه صاف بیشتر است. هنگام ساخت تری‌گلیسریدها و نیز هنگام تشکیل مواد لیپوپروتئینی، واکنش‌هایی بین مواد سازندهٔ غشاءهای دستگاه واکوئلی دیده شده است. به نظر می‌رسد که این ارتباط‌های درونی به ویژه وابسته به شبکه آندوپلاسمی صاف و دستگاه گلژی باشد. تاکنون اشاره کرده‌ایم که شبکه صاف به‌خصوص در یاخته‌های دیگر در سوخت‌وساز لیپیدها و نیز در یاخته‌های تولیدکننده هورمون‌های استروئیدی فراوان است. همه این شواهد و همچنین شناخت و جداسازی بسیاری از آنزیم‌های مسئول در بیوژنز و اکسایش ترکیبات لیپیدی دلایلی بر دخالت شبکه صاف در متابولیسم لیپیدها می‌باشد. به‌طور کلی نقش شبکه آندوپلاسمی در متابولیسم لیپیدها را می‌توان به‌صورت زیر خلاصه کرد:

الف - ساخت گلیسریدها، فسفاتیدها، گلیکولیپیدها، پلاسمالوژن‌ها، اسیدهای چرب، متابولیسم پلاسمالوژن‌ها

ب - بیوژنز استروئیدها، کلسترول، هیدروژن‌دار کردن پیوندهای اشباع نشده موجود در استروئیدها، تغییراتی در استروئیدها که به حضور $NADH_2$ و اکسیژن نیاز دارند مثل ایجاد ترکیبات معطره (آروماتیک)

ج - اکسیداسیون برخی اسیدهای چرب.

د - تجزیه (هیدورلیز) برخی لیپیدها به کمک کولین‌استراز و استرازهای مختلف.

دخالت در متابولیسم پروتئین‌ها

الف - بیوژنز پروتئین‌های ترشحی و برخی پروتئین‌های سیستم غشایی (در صفحات قبل شرح داده شد).

ب - دخالت در اکسایش برخی اسیدهای امینه با داشتن آنزیم‌های مؤثر در اکسایش آنها.

۳- نقش انتقالی - ارتباطی

شبکه آندوپلاسمی با گسترش وسیعی که در یاخته‌ها از حد پلاسمالم تا پوشش هسته‌ای دارد و نیز با داشتن پرمه‌آزها در ساختمان غشاء خود به شکل‌های گوناگون از جمله موارد زیر در انتقال و پراکنش مواد و نیز برقراری ارتباط در یاخته‌ها دخالت دارد.

الف - انتقال و توزیع مواد از فضای درونی: مواد مختلفی مثل پروتئین‌ها و لیپیدها که به ترتیب در حد شبکه دانه‌دار و صاف ساخته می‌شوند و همچنین ترکیبات قندی مثل گلوکز پس از ورود به شبکه آندوپلاسمی می‌توانند از درون شبکه از جایی‌به‌جای دیگر یاخته منتقل شوند. این انتقال بیشتر در مورد پروتئین‌ها، لیپیدها و مشتقات قنددار شدهٔ آنها است. با استفاده از لوسین تریسیوم‌دار و فن خود پرتونگاری، نشان‌دار شدن مرحله‌ای شبکه آندوپلاسمی خشن، شبکه صاف و سپس دیکتیوزوم‌ها مشخص و عکسبرداری شده که دلیلی بر انتقال پروتئین‌ها در این مسیر است.

ب - ***انتقال شعاعی (عرضی یا بُرداری)***: انتقال مواد از غشاء شبکه آندوپلاسمی با دخالت برخی آنزیم‌ها، ناقل‌ها و حتی به‌صورت انتقال فعال در موارد مختلفی به اثبات رسیده است: همان‌گونه که دیده‌ایم با دخالت گلوکز ۶ فسفاتاز، گلوکز از گروه فسفات جدا می‌شود و به درون شبکه آندوپلاسمی نفوذ می‌کند (شکل ۸-۶)؛

انتقال زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی ساخته شده به وسیله ریبوزوم‌ها، با واسطه پپتید نشانه به درون شبکه که شرح آن در صفحات قبل آمد، نمونه دیگری از انتقال مواد از غشاء شبکه آندوپلاسمی است (شکل ۸-۲)؛

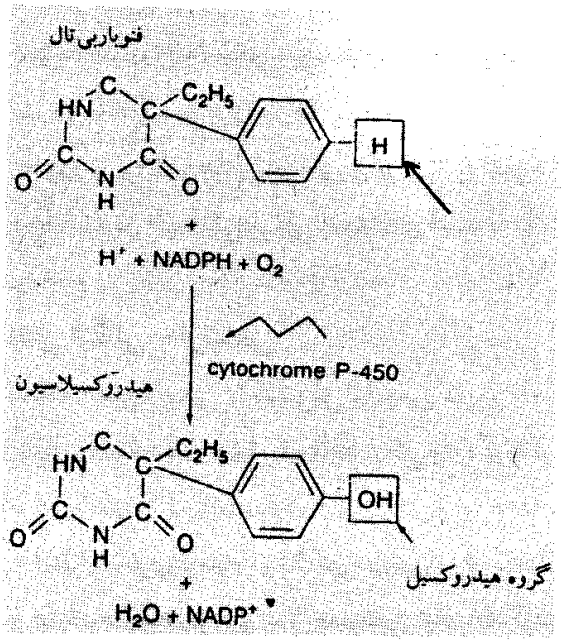
در یاخته‌های ماهیچه‌ای مخطط شبکه آندوپلاسمی گسترش زیادی دارد و آن را شبکه سارکوپلاسمی می‌نامند. در این یاخته‌ها یون‌های کلسیم پس از ورود به یاخته با دخالت پروتئین‌های اختصاصی منتقل می‌شود، به غشاء شبکه سارکوپلاسمی می‌رسد و با خرج ATP به درون شبکه پمپ می‌شود. این وضع مخصوصِ حالت آرامش یا انبساط ماهیچه‌ای است؛ هنگام انقباض که جریان عصبی به ناحیه صفحه محرّک می‌رسد، موجب تحریک غشاءهای شبکه سارکوپلاسمی می‌شود، در این هنگام شبکه، یون‌های کلسیم را به سیتوزول می‌فرستد و در بین تارچه‌های ماهیچه‌ای آزاد می‌کند. این یون‌ها در جایگاه اختصاصی خود بر روی تروپونین می‌چسبند و شرایط را برای جابه‌جایی اکتین و میوزین تارچه‌ها و انقباض ماهیچه‌ای فراهم می‌سازند (مراجعه به فصل ۷، اسکلت سلولی). بدون این عملِ شبکه سارکوپلاسمی، انقباض ماهیچه‌های مخطط امکان‌پذیر نیست.

نوع دیگری از انتقال و ارتباط که با دخالت شبکه آندوپلاسمی انجام می‌شود بر بنای مشاهدات پورتر بر روی رشته‌های ماهیچه‌ای و عمومیت دادن این مشاهدات است که، می‌توان همچون پورتر، فکر کرد که شبکه آندوپلاسمی امواج دپلاریزاسیون را انتقال می‌دهد. این امواج می‌توانند نقش علائم درون یاخته‌ای را ایفا کنند.

۴- نقش سازماندهی، پشتیبانی و پایدارکنندگی

شبکه آندوپلاسمی به شکل‌های متفاوتی در سازماندهی اجزای سلولی، پشتیبانی و پایداری آنها دخالت دارد از جمله:

- ساخت بخش قابل ملاحظه‌ای از پروتئین‌ها و لیپیدهای غشایی که در سازماندهی غشاء یاخته‌ای و غشاءهای اندامکی سهم دارند؛
- جوانه‌زدن، تشکیل حفره‌های غشایی، ادغام این حفره‌ها و سازمان‌دهی بخش‌هایی از پوشش هسته‌ای (یاخته‌های پروکاریوتی که شبکه آندوپلاسمی ندارند، فاقد پوشش هسته‌ای نیز هستند)، این نظر با عکسبرداری‌های دقیق انجام شده به کمک میکروسکوپ‌های الکترونی گذاره تأیید شده است؛
- غشاء شبکه آندوپلاسمی صاف برجستگی‌ها یا جوانه‌هایی را ایجاد می‌کند که به‌صورت



شکل ۸-۷. خنثی‌شدن اثر سمی فنوباربی‌تال به‌وسیله هیدروکسیلاسیون به کمک سیتوکروم P-۴۵۰

حفره‌های کوچک و بزرگی از شبکه جدا می‌شوند، این حفره‌های غشایی که حفره‌های گذر[1] نامیده می‌شوند، یا جذب کناره کیسه‌های (ساکول‌های) تشکیل دهندهٔ دیکتیوزوم‌ها می‌شوند و پایداری و امکان جوانه‌زدن آنها را فراهم می‌سازند، یا به یکدیگر پیوسته و به کیسه (ساکول) دیکتیوزمی جدیدی تبدیل می‌شوند (با احتمال بیشتر در یاخته‌های گیاهی) و یا بخشی از سیتوپلاسم را احاطه کرده با تحولات خود به واکوئل‌های خودخواری[2] (اتوفاژی) تبدیل می‌شوند. شروع چگونگی این پدیده‌ها در فصل دوم هنگام بررسی دیکتیوزوم‌ها و نیز در فصل مربوط به لیزوزوم‌ها آمده است.

۵- نقش ضدّ سمی و تغییر در ساختمان و خواص مواد

در بدن جانوران و انسان مجموعه‌ای از مواد نامحلول در آب ایجاد می‌شوند یا جمع می‌شوند که از راه کلیه‌ها قابل دفع نیستند و ممکن است در یاخته‌ها انباشته شوند. بنابراین وسیله‌ای برای سم‌زدایی این مواد لازم است و گرنه تجمع آنها در یاخته‌ها می‌تواند خطرناک باشد. نمونه این مواد، حشره‌کش‌ها، رنگ‌کننده‌ها، نگهدارنده‌ها و بسیاری از داروها هستند. برخی اندام‌ها مثل کبد، پوست و کلیه‌ها برای این سم‌زدایی تخصص یافته‌تر هستند و در این اندام‌ها نقش ضدّسمی به‌عهده شبکه آندوپلاسمی است.

برای مثال یکی از باربی‌تورات‌ها، «فنوباربی‌تال[3]» مولکولی نامحلول است که در نتیجه هیدوروکسیلاسیون به وسیله سیتوکروم P-۴۵۰ که در سطح سیتوزولی غشاء شبکه آندوپلاسمی وجود دارد (به‌خصوص در یاخته‌های کبدی) به‌صورت مولکولی قابل حلّ در آب درمی‌آید و به سهولت دفع می‌شود (شکل ۸-۷).

در یاخته‌هایی که چنین اعمال ضدسمی دارند، شبکه آندوپلاسمی صاف گسترش بسیار زیادی دارد. یکی از نتایج تحریک سم‌زدایی می‌تواند اختلال و توقف سوخت‌وساز هورمون‌های جنسی باشد. شاهدی از این وضع، افزایش نازایی پرندگان در دوره‌هایی است که حشره‌کش‌ها بدون کنترل و به مقدار وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرند.

شبکه آندوپلاسمی با داشتن سیتوکروم P-۴۵۰ و از راه اکسیداسیون یا هیدروکسیلاسیون سم‌ها و برخی ترکیبات دارویی در تغییر ساختمان و تغییر خواص آنها از جمله خنثی کردن اثر سمی و زیان‌بار این مواد دخالت می‌کند. تزریق برخی داروها مثل فنوباربی‌تال موجب فعال شدن آنزیم‌های خنثی‌کننده این مواد و گسترش قابل توجه شبکه صاف می‌شود. فنوباربی‌تال نه تنها آنزیم‌ها را فعال می‌کند بلکه تولید آنها را افزایش می‌دهد، برای مثال وقتی فنوباربی‌تال برای مدت طولانی مصرف شود، مقدار P-۴۵۰ ممکن است ۵۰ تا ۱۰۰ درصد افزایش یابد. P-۴۵۰ در حکم اکسیداز نهایی عمل می‌کند و به ویژه در یاخته‌های کبدی با این عمل خود در خنثی کردن سم‌ها نقش اساسی دارد.

در یاخته‌های کبدی، شبکه آندوپلاسمی در واکنش‌های دِمتیلاسیون اکسایشی و واکنش‌های دِآمیناسیون که موجب سم‌زدایی مواد و ترکیبات دارویی می‌شوند، فعالیت دارد.

در یاخته‌های تولیدکننده هورمون‌های استروئیدی، شبکه بیشتر برای غیراشباع کردن اکسایشی میانجی‌های استروئیدی به کار گرفته می‌شود.

بخشی از تغییرپذیری در اعمال سیتوکروم P-۴۵۰ به دلیل وجود تعداد زیادی پروتئین‌های ایزومر این سیتوکروم است که همه دارای ویژگی‌های کاتالیتیکی متفاوتی هستند. بسیاری از واکنش‌هایی که به وسیله سیتوکروم P-۴۵۰ و ایزومرهای آن انجام می‌شوند برای یاخته‌ها مفیدند و موجب سم‌زدایی در آنها می‌شوند. اما در برخی موارد ممکن

1- Transition Vesicles 2- Autophagy 3- Phenobarbital

است این واکنش‌ها منجر به تولید مواد سرطان‌زا شوند؛ مثل تبدیل ۲ و ۳ دی‌بنزوپیرن به ۵ و ۶ دی‌اپوکسی (نقش شبکه در تولید مواد سرطان‌زا).

۶- تجزیه هموگلوبین

به نظر برخی پژوهشگران، شبکه آندوپلاسمی مخصوصاً در یاخته‌های کبدی موجب جداسازی هِم از گلوبین و تجزیه هموگلوبین می‌شود.

۷- ذخیره مواد

گاهی قسمت‌هایی از شبکه آندوپلاسمی، بخشی از مواد درونی را در خود ذخیره می‌کند و حجیم می‌گردد. این عمل ممکن است با جذب آب، رقیق و آبکی شدن محتویات بخش‌هایی از شبکه همراه باشد و حتی منجر به جدا شدن بخش‌هایی از شبکه و تشکیل برخی واکوئل‌ها گردد.

۸- نقش‌های اختصاصی شبکه آندوپلاسمی در یاخته‌های گیاهی

الف - دخالت در تشکیل پلاسمودسم‌ها. در مراحل پایانی تقسیم یاخته‌ای و هنگام تشکیل دیواره اسکلتی بین دو یاخته جدید، گاهی بخش‌هایی از شبکه آندوپلاسمی بین تعدادی از فراگموزوم‌ها قرار می‌گیرند و از اتصال و ادغام آنها جلوگیری می‌کنند، این محلّ‌ها، جایگاه‌های تشکیل پلاسمودسم‌ها هستند (مراجعه به فصل ۶، دیوارهٔ اسکلتی).

ب - دخالت در ساخت و ترشح کالّوز. هنگام تشکیل منافذ آبکشی در یاخته‌های آبکشی قطعاتی از شبکه آندوپلاسمی به مجاورت دیواره حدواسط یاخته‌ها مهاجرت می‌کنند و در نزدیکی محل پلاسمودسم‌ها قرار می‌گیرند، سپس با ساخت و ترشح کالّوز در ایجاد منافذ آبکشی دخالت می‌کنند. همچنین در سلول‌های مادر گرده، هنگام میوز و تشکیل «دیواره ویژه» که بخش عمده آن کالوزی است گاهی قطعاتی از شبکه آندوپلاسمی به نواحی حاشیه‌ای یاخته مهاجرت می‌کنند و موازی با سطح یاخته و پلاسمالم قرار می‌گیرند، در مجاورت این بخش‌ها وجود ترکیبات کالوزی به اثبات رسیده است. بالاخره موازی‌بودن قطعات شبکه آندوپلاسمی در مراحلی از تشکیل دیواره اسکلتی، با این دیواره را نشانه‌ای از نقش شبکه در تشکیل یا انتقال برخی مواد سازنده این دیواره می‌دانند.

ج - فراوانی شبکه آندوپلاسمی در یاخته‌های ترشحی گیاهان را نشانه‌ای از نقش شبکه در ساخت و ترشح مواد ترشحی می‌دانند، برای مثال در یاخته‌های ترشحیِ مجاری ترشحی کاج، فراوانی شبکه آندوپلاسمی را نشانه‌ای از دخالت آن در ساخت و ترشح ترپن‌ها[1] می‌دانند.

به‌طور کلی مهم‌ترین اعمال شبکه آندوپلاسمی را می‌توان به شرح زیر خلاصه کرد (جدول ۸-۱).

خاستگاه (منشأ) شبکه آندوپلاسمی

در مورد منشأ شبکه آندوپلاسمی نظریه‌های متفاوتی به شرح زیر وجود دارد:

۱- هر یاخته در مرحله G_2 که قبل از تقسیم یاخته‌ای است با بیوسنتز پروتئین‌ها و لیپیدهای غشایی، اندامک‌های

1- Terpenes

جدول ۸-۱. اعمال مهم شبکه آندوپلاسمی

سنتز مواد	ترشحی یا صادراتی پروتئین‌ها غشایی تری‌گلیسریدها لیپیدها و ترکیبات وابسته: فسفاتیدها و فسفولیپیدهای متفاوت کولسترول استروئیدها اسیدهای چرب
افزایش مواد	افزودن اولیگوساکاریدها به پروتئین‌ها (تشکیل گلیکوپروتئین‌ها) مراحلی از گلیکوزیلاسیون افزودن اولیگوساکاریدها به لیپیدها (تشکیل گلیکولیپیدها) سولفاتاسیون (افزودن گروه‌های فسفات به پروتئین‌ها و به احتمال به لیپیدها) افزودن اسیدگلوکورونیک به متابولیت‌های سمّی
واکنش‌های اکسایشی و کاهشی و تغییر خواص مواد	اکسیداسیون سم‌ها و ترکیبات دارویی اعمال ضدسمی: آریل هیدروکسیلاسیون تبدیل مولکول‌های آب‌گریز به مولکول‌های آب‌دوست تغییر در استروئیدها تبدیل برخی مواد به ترکیبات سرطان‌زا
سازمان‌دهی	غشاء یاخته غشاءهای درونی پوشش هسته‌ای عده‌ای از واکوئل‌ها و از جمله برخی واکوئل‌های خودخواری یاخته عده‌ای ازپلاسمودسم‌ها کمک به پایداری و امکان جوانه‌زنی کیسه‌های دیکتیوزومی با تشکیل حفره‌های گذر کمک به تشکیل لیزوزوم‌ها
انتقال مواد	پراکنش مواد در یاخته از درون شبکه انتقال عرضی (شعاعی یا برداری): عبور دادن زنجیر پلی‌پپتیدی در حال تشکیل به درون شبکه پمپ کلسیم به درون شبکه سارکوپلاسمی و برعکس عبور دادن گلوکز به درون شبکه به کمک گلوکز ۶ فسفاتاز

خود را زیاد می‌کند و از جمله شبکه آندوپلاسمی گسترش می‌یابد به نحوی که پس از تقسیم هر یاخته جدید، بخش مهمی از سیستم غشایی درونی خود و از جمله شبکه آندوپلاسمی را از سلول مادری به ارث می‌برد.

۲- جوانه‌زدن به طرف خارج پوشش هسته‌ای. به نظر برخی پژوهشگران، هنگامی که در یاخته به گسترش شبکه آندوپلاسمی نیاز باشد، پوشش هسته‌ای به طرف سیتوزول جوانه می‌زند، جوانه‌ها به‌صورت حفره‌های غشایی جدا می‌شوند و از به‌هم پیوستن و ادغام این حفره‌های غشایی قطعاتی از شبکه آندوپلاسمی ایجاد می‌شود. ارتباط، پیوستگی، تغییر و تبدیل پوشش هسته‌ای به شبکه آندوپلاسمی و عکس آن در بررسی‌ها و مشاهدات زیادی مورد تأیید قرار گرفته است و به‌صورت یک نظریه عمومی پذیرفته شده است.

۳- جوانه‌زدن به طرف داخل پلاسمالم، به نظر برخی دانشمندان از جمله نوگارد، غشاء یاخته‌ای می‌تواند به طرف

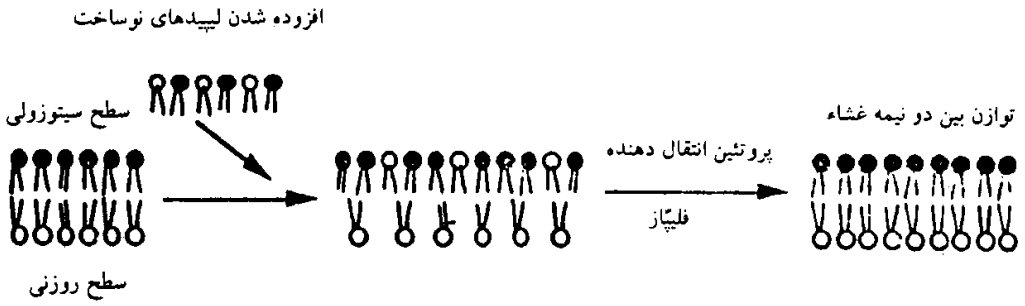
سیتوزول جوانه‌زنی کند، این جوانه‌ها به‌صورت حفره‌های غشایی از پلاسمالم جدا شده و در سیتوزول رها می‌شوند؛ از اتصال و ادغام این حفره‌ها، قطعاتی از شبکه آندوپلاسمی ایجاد می‌شود، این نظر کمتر مورد تأیید عمومی بوده است.

۴- تشکیل نو[1]: به‌طور کلی پیدایش اندامک‌ها و اجزای یاخته‌ای از بخش‌های ساده‌تر را با مکانیسمی نه چندان مشخص «تشکیل‌نو» نامند. در مورد شبکه آندوپلاسمی نظر این است که پروتئین‌ها و لیپیدهای غشاء شبکه به ترتیب در حدّ شبکه دانه‌دار و صاف ساخته می‌شوند و از سازمان‌یابی آنها ابتدا غشایی دو لایه لیپیدی با بخش‌های پروتئینی همانند غشاء یاخته‌ای به وجود می‌آید، سپس در مراحل بعدی ترکیبات قند، لیپیدها یا پروتئین‌های اختصاصی به آن افزوده می‌شوند.

یکی از سؤال‌هایی که در مورد چگونگی توازن لیپیدها بین دو نیمه غشاء شبکه آندوپلاسمی مطرح شده است این است که، به نظر می‌رسد در حد این غشاء پدیده بالا و پائین رفتن لیپیدها (flip – flop) وجود ندارد، پس چگونه مولکول‌های لیپیدی که بر روی یک سطح غشاء یعنی سطح سیتوزولی ساخته می‌شوند، به نیمه دیگر غشاء می‌رسند؟ مشخص شده که پروتئین‌های اختصاصی که آنها را فلیپّاز[2] می‌نامند، می‌توانند به‌طور انتخابی لیپیدها را از سطحی به سطح دیگر غشاء انتقال دهند (شکل ۸-۸).

فسفولیپیدهای جدید ساخته شده به وسیلهٔ فلیپّازها به غشاء وارد شده و بازسازی آن را تأمین می‌کنند. قطعات غشایی نو، گاهی می‌توانند بزرگ باشند و امکان گسترش بخش‌های غشایی را فراهم آورند.

پیوند شدن قندها، مثل گالاکتوز و اسیدزیالیک، بر روی گلیکولیپیدها، در دستگاه گلژی انجام می‌شود.



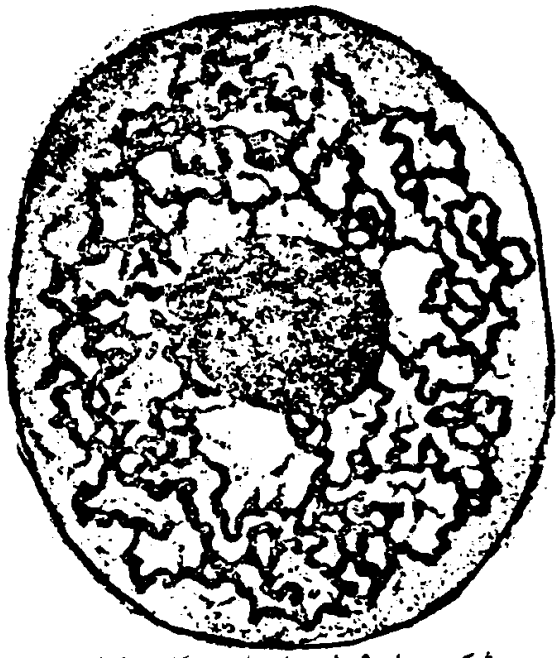
شکل ۸-۸. نمای نشان دهنده نقش یک پروتئین (فلیپّاز) درگذر فسفولیپیدها از سطح سیتوزولی غشاء به سوی سطح روزنی در شبکه آندوپلاسمی

1- De NoNo 2- flippase

۹ دستگاه گلژی[1]

مقدمه و تاریخچه

در سال ۱۸۹۸ کامیلّوگلژی یاخته‌شناس ایتالیایی با اشباع کردن یاخته‌های عصبی جغد از نمک‌های نقره و بررسی میکروسکوپی این یاخته‌ها، ذراتی تیره، هلالی شکل و به‌صورت شبکه درهم رفته‌ای را در مجاورت هستهٔ هر یاخته مشاهده کرد که، آن را «دستگاه شبکه‌ای درونی[2]» نامید (شکل ۹-۱). این مجموعه بعدها به افتخار گلژی که در سال ۱۹۰۶ برای کارهای زیادش در زمینه‌های یاخته‌شناسی، شیمی‌یاخته و شیمی‌بافتی برنده جایزه نوبل شد، دستگاه گلژی نامیده شد. هم‌اکنون برای مشاهده دستگاه یا مجموعه گلژی با میکروسکوپ‌های نوری، از فن اشباع‌سازی یاخته‌ها از نمک‌های نقره و یا نمک‌های بیسموت استفاده می‌شود و در بررسی‌های فراساختاری یاخته‌ها با میکروسکوپ‌های الکترونی، از تثبیت یاخته‌ها با آلدئیدها و تثبیت تکمیلی آنها با اسمیوم و نیز اشباع‌سازی یاخته‌ها از اسمیوم بهره‌گیری می‌شود. کاربرد این فنون منجر به شناسایی و گزارش دستگاه گلژی در بسیاری از یاخته‌های جانوری گردید. این دستگاه می‌تواند به‌صورت شبکه‌ای در مجاورت هسته، یا به‌صورت بخش‌های هلالی شکل و مجزای از یکدیگر به نام دیکتیوزوم‌ها[3] (مرکب از واژه یونانیِ diction به معنی تور و رشته، و Soma به معنی جسم؛ نامی که در سال ۱۹۱۰ به وسیلهٔ پرونسیتو (Perroncito) ابداع شد)، در برش‌های یاخته‌ها دیده شود.



شکل ۹-۱. نمایی از دستگاه شبکه‌ای درونی (دستگاه گلژی) که اولین بار در ۱۸۹۸ به وسیله کامیلّو گلژی رسم شده است.

تجسم‌ها و حالت‌های متفاوت ساختمانی برای دیکتیوزوم‌ها پیشنهاد شد و اختلاف نظر در مورد ساختار و فراساختار دیکتیوزوم‌ها و دستگاه گلژی تا زمانی که آنها را با میکروسکوپ‌های نوری مشاهده می‌کردند، همچنان باقی بود. از ۱۹۵۰ با استفاده از میکروسکوپ‌های الکترونی مشخص شد که دستگاه گلژی هم در یاخته‌های جانوری و هم در یاخته‌های گیاهی وجود دارد و یکی از اجزای مهم ساختمانی یاخته‌ها است که به ویژه در اعمال ترشحی یاخته‌ها فعالیت زیادی دارد.

دیکتیوزوم‌ها، در گیاهان پیشرفته، نخستین‌بار در سال ۱۹۵۷ شناخته شدند (بووا، پورتر، پرنر[4])، سپس به سرعت آنها را در جلبک‌ها (شاردار[5] و رویلر[6]، ۱۹۵۷) و در خزه گیاهان (هایتز[7]، ۱۹۵۸) یافتند؛ در قارچ‌ها، دیکتیوزوم‌ها کمیاب هستند و از ۱۹۶۲ در آنها شناخته شدند (مورومک آلر[8]). در پروکاریوت‌ها تاکنون دیکتیوزومی شناخته نشده است.

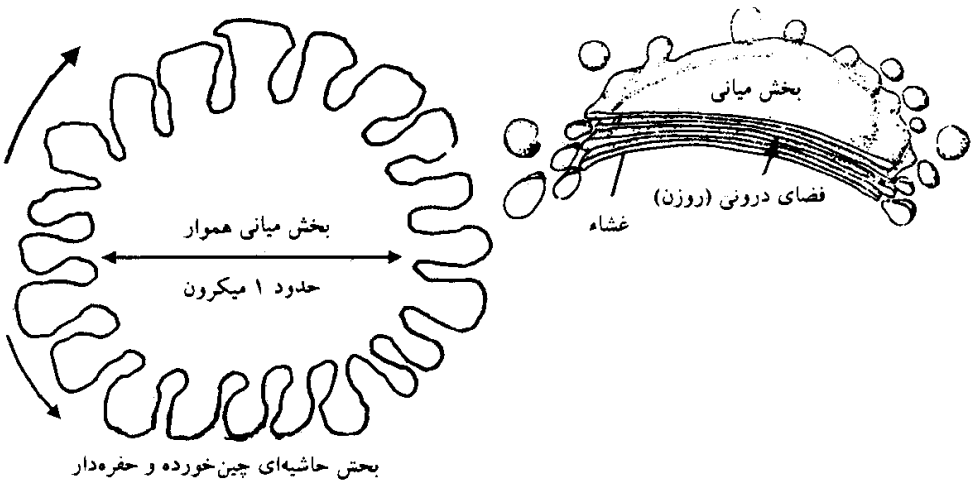
1- Golgi ratus 2- Internal reticular apparatus 3- Dictiosomes 4- Perner
5- Chai 6- Rouiller 7- Heitz 8- Mac Alear

فراساختار

واحد ساختمانی یا بخش اصلی سازندهٔ دستگاه گلژی، دیکتیوزوم است و شکل‌های دیگر آن می‌توانند از اجتماع تعدادی دیکتیوزوم تشکیل شوند.

مولن‌هاور[1] با استفاده ازفن فرامرکزگریزی[2]، دیکتیوزوم‌ها را از یاخته‌های ذرّت جدا کرد و پس از رنگ‌آمیزی با فنّ رنگ‌آمیزی منفی (استفاده از اسیدفسفوتنگستیک) آنها را به دقت مطالعه کرد. هر دیکتیوزوم به‌طور معمول از اجتماع ۳ تا ۸ ساختمان کیسه‌ای غشایی که هر کدام را یک ساکول، سیسترون یا سیسترنا نیز می‌نامند تشکیل شده است (گاهی مجموعه کیسه‌های هر دیکتیوزوم را نیز سیسترن نامیده‌اند). تعداد کیسه‌ها در دیکتیوزوم‌های مختلف یک یاخته و در یاخته‌های متفاوت، یکسان نیست و گاهی به ویژه در یاخته‌های آغازیان به بیش از ۲۰ هم می‌رسد.

هر کیسه یا ساکول خود به‌صورت یک کیسه پهن و قرصی شکل غشایی است که بخش میانی آن وسعتی حدود یک میکرومتر دارد و هموار است، کناره‌های (حاشیه) کیسه حجیم، مجوّف، بسیار چین‌خورده وپیچیده و دارای حفره‌ها و لوله‌های در هم رفته است (شکل ۹-۲ الف و ب).



شکل ۹-۲. نمای فراساختاری ساکول‌های دیکتیوزومی الف - نمای از روبرو ب - نمای برش عرضی

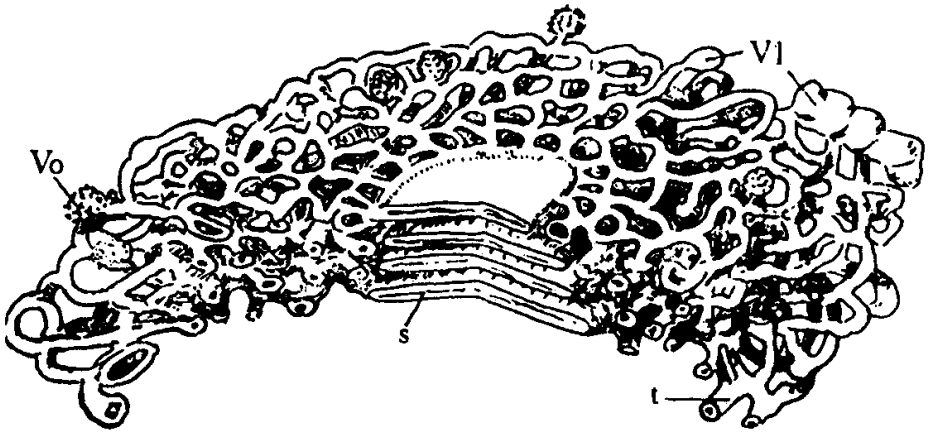
هر ساکول ضمن آن که کیسه‌ای غشایی و قرصی شکل است، کم‌وبیش حالت کمانی دارد و دارای یک سطح برآمده (گوژ) و یک سطح گود (کاو) است. ضخامت غشاء ساکول همانند غشاء شبکه آندوپلاسمی حدود ۳۶۰ آنگستروم و وسعت فضای درونی آن حدود ۱۰۰ تا ۲۰۰ آنگستروم است. فضای درونی کیسه (روزن) در بخش حاشیه‌ای وسیع‌تر است. درون روزن از مجموعه مواد مختلفی شامل: آب، نمک‌های کانی و یون‌ها، مواد آلی متنوع که از شبکه آندوپلاسمی به کیسهٔ دیکتیوزومی رسیده‌اند یا موادی که در کیسه ساخته شده و یا تغییر و تحول یافته‌اند، پر شده است.

وقتی با فن فرامرکزگریزی دیکتیوزوم‌ها را از یاخته جدا می‌کنیم، کیسه‌های (ساکول‌های) سازندهٔ هر دیکتیوزوم وابسته به‌هم و به‌صورت گروهی باقی می‌مانند که این نشانه‌ای از اشتراک قوی کیسه‌ها با یکدیگر است. بررسی‌های انجام شده به کمک میکروسکوپ‌های الکترونی وجود سیتوزول در بین کیسه‌های هر دیکتیوزوم و نیز وجود پروتئین‌های رشته‌ای و لوله‌ای در این بخش‌های سیتوزولی را تأیید کرده و نشان داده است که همهٔ ریزلوله‌های پروتئینی که در سیتوزول بین دو کیسه قرار دارند همسو هستند. در بخش سیتوزولی بین ساکول‌ها، ریبوزوم وجود ندارد.

کنارهٔ کیسه‌ها اغلب جوانه می‌زند و حفره‌های کوچکی را به وجود می‌آورد که به‌تدریج از کیسه جدا می‌شوند و

1- Mollenhaver 2- Ultracentrifugation

به‌صورت حفره‌های (وزیکول‌ها، آمپول‌ها یا واکوئل‌های)) گلژی در سیتوزول آزاد می‌گردند، به همین دلیل کیسه‌ها اغلب کناره‌های بسیار نامنظم (پنجره‌ای) دارند (شکل ۹-۳).



شکل ۹-۳. تفسیر فراساختار دیکتیوزوم با کناره‌های پنجره‌ای: چین‌خوردگی کیسه‌ها (s) که به وسیلهٔ شبکه‌ای از لوله‌های کوچک درهم رفته‌ای (t) تا اطرافشان ادامه یافته حفره‌هایی با دیوارهٔ صاف (vl) یا مزین (vt) را به وجود آورده‌اند (اقتباس از: ژنه‌وس Geneves).

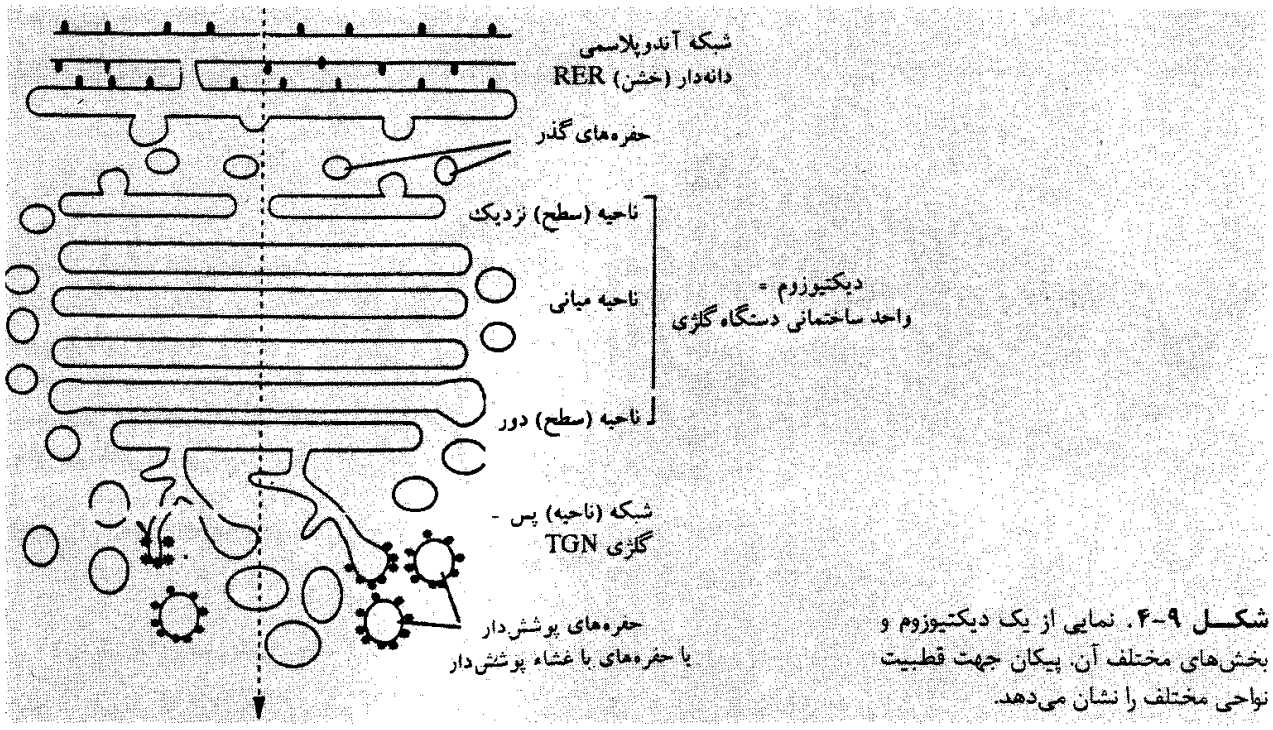
در برش‌های عمود بر سطح کیسه‌ها (برش‌های عرضی)، دیکتیوزوم‌ها اغلب به‌صورت کمان‌های کم‌وبیش خمیده‌ای دیده می‌شوند که در آنها دو سطح قابل تشخیص است، یکی سطح برآمده (گوژ) یا قطب پیشین که آن را سطح تشکیل[1] نیز می‌نامند و دیگری سطح گود (کاو) یا قطب پسین که، سطح ترشح یا سطح بلوغ[2] (رسیدگی) نامیده می‌شود.

حفره‌های گلژی به طرف سطح ترشح فراوان‌تر هستند، همچنین بررسی‌ها نشان می‌دهد که دو سطح هر دیکتیوزوم ویژگی‌های متفاوتی دارند و به عبارت دیگر هر دیکتیوزوم دارای دو سطح ناهمگن است. بعد از تثبیت یاخته‌ها به کمک اسمیوم و رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین، یا بعد از استفاده از نمک‌های نقره بخش برآمده، رنگ‌دوست (کروموفیل) است و ذرات مواد رنگی یا ذرات رسوب نمک‌های نقره در این بخش متراکم می‌شوند، در حالی که بخش گود دیکتیوزوم رنگ‌گریز (کروموفوب) است. هنگام اشباع‌سازی یاخته‌ها از اسمیوم نیز سطح برآمده اسمیوم خواهی (اسمیوفیلی) بیشتری از سطح گود دیکتیوزوم دارد. به‌طوری که خواهیم دید ویژگی‌های ترکیب شیمیایی و آنزیمی این دو سطح نیز یکسان نیست.

هم‌اکنون برای هر دیکتیوزوم بخش‌های (نواحی یا کَده[3]های) زیر را در نظر می‌گیرند (شکل ۹-۴):

- **ناحیه یا سطح نزدیک**[4] که به سوی شبکه آندوپلاسمی (و یا گاهی پوشش هسته‌ای) است و از راه حفره‌های گذر با شبکه در ارتباط است و باواسطه این حفره‌ها مواد و به ویژه ماکرومولکول‌ها را از شبکه دریافت می‌کند. این سطح سطحی که به‌طور معمول سطح تشکیل معرفی شده است انطباق دارد؛
- **ناحیه میانی** که دارای چند کیسه (ساکول) است که به‌طور منظمی روی هم قرار گرفته‌اند (در فاصله بین این کیسه‌ها، سیتوزول و پروتئین‌های رشته‌ای و لوله‌ای قرار دارند). تعداد این کیسه‌ها به نوع سلول وابسته است و اغلب نزدیک به ۵ است. این کیسه‌ها، اغلب لبه‌های بسیار نامنظم و پنجره‌ای دارند که نتیجه فعالیت جوانه‌زنی و تشکیل حفره‌های گلژی است.
- **ناحیه یا سطح دور**[5]، سطح مقابل به سطح نزدیک است که به‌طور معمول تا محل تجمع تعداد زیادی از حفره‌های گلژی امتداد دارد. سطح با سطحی که اغلب آن را سطح ترشح یا سطح رسیدگی (بلوغ) می‌نامند، تطبیق می‌کند. مواد و به‌خصوص ماکرومولکول‌ها اغلب از مجاورت این سطح و با واسطه حفره‌های گلژی به سوی بخش‌های دیگر یاخته از جمله غشاء سیتوپلاسمی فرستاده می‌شوند.

1- Forming face 2- Maturing face 3- Compartment 4- Cis face 5- Tans face



شکل ۹-۴. نمایی از یک دیکتیوزوم و بخش‌های مختلف آن. پیکان جهت قطبیت نواحی مختلف را نشان می‌دهد.

حفره‌های ایجاد شده به وسیله کنارهٔ کیسه‌های دیکتیوزومی دو نوع هستند:

برخی دارای یک غشاء صاف شبیه غشاء کیسه‌ها (ساکول‌ها) هستند که آنها را حفره‌های ساده[1] می‌نامند و غشاء عده‌ای دیگر به وسیله کلاترین یا پروتئین‌های دیگر پوشیده شده است؛ این حفره‌ها را حفره‌های پوشش‌دار[2] یا حفره‌های با غشاء پوشش‌دار می‌نامند (شکل ۹-۴).

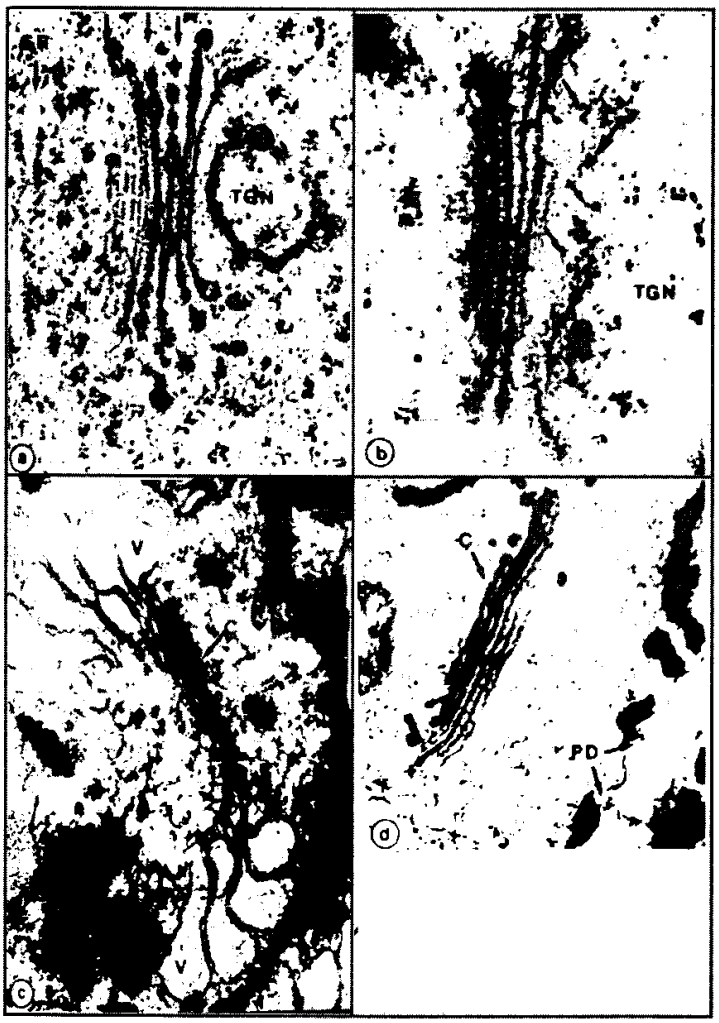
در مجاورت سطح دور، مخصوصاً در دیکتیوزوم‌های یاخته‌های گیاهی می‌توان «شبکه پس گلژی یا TGN (از انگلیسی Trans Golgi Network) را مشاهده کرد که، از مجموعه‌ای از کیسه‌های چند شکل[3] و حفره‌های متفاوتی ساخته شده است (شکل ۹-۴). وضع این شبکه بسیار متنوع است.

در مجموع هر دیکتیوزوم دارای نوع قطبیت ریخت‌شناسی و فراساختاری است که با قطبیتی شیمیایی و رفتاری انطباق دارد. شکل ۹-۵، ریزنگارهای الکترونی از دیکتیوزوم‌ها، قطبیت آنها و ناحیه TGN را نشان می‌دهد.

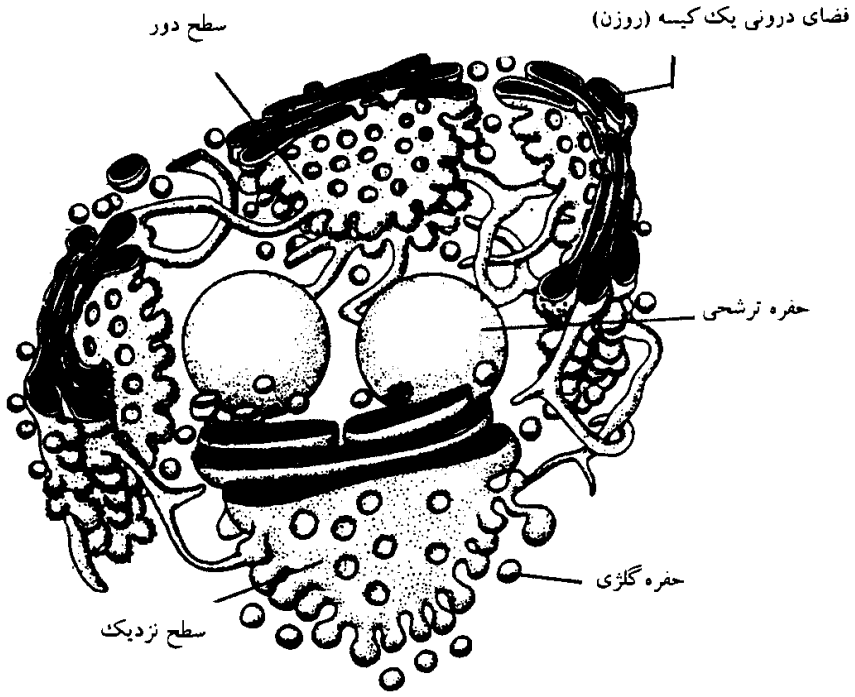
اندازه دیکتیوزوم‌ها در یاخته‌ها متفاوت است، برای مثال در یاخته‌های ریشه پیاز قطر هر دیکتیوزوم حدود ۱ میکرومتر و ضخامتش حدود ۰/۲ میکرومتر است، در حالی که در برخی یاخته‌ها، دیکتیوزوم‌ها چندین میکرومتر قطر دارند و می‌توان آنها را با میکروسکوپ‌های نوری مشاهده کرد.

در تفسیر دستگاه گلژی هنوز اختلاف نظر وجود دارد. برخی پژوهشگران مجموعهٔ چند (۴ یا ۵) دیکتیوزوم را که مجاور هم قرار گرفته و به وسیله لوله‌های بسیار باریکی به‌هم متصل شده‌اند، دستگاه گلژی گویند و برخی دیگر معتقدند که همه دیکتیوزوم‌های یک یاخته می‌توانند در ارتباط و پیوستگی باشند و مجموع آنها را دستگاه گلژی می‌نامند. به‌طور کلی در یاخته‌های جانوری دیکتیوزوم‌ها اغلب به‌هم پیوسته‌اند و شبکه‌ای واقعی را تشکیل می‌دهند که همان دستگاه گلژی است (شکل ۹-۶). در یاخته‌های گیاهی دیکتیوزوم‌ها، اغلب جدا از هم هستند و به همین دلیل مشاهده میکروسکوپی آنها نیز دشوارتر است.

1- Simple Vesicles 2- Coated Vesicles 3- Polymorphe



شکـــل ۹-۵. دستگاه گلژی در گیاهان. a) یکی از دیکتیوزوم‌ها با حالت قطبی مشخص. کیسه‌های سطح نزدیک کوتاه و کم‌تراکم و کیسه‌های بخش میانی (M) و سطح دور طویل‌تر و فضای درونی‌شان نیز متراکم‌تر است. بخش‌های حاشیه‌ای این کیسه‌ها، حفره‌های گلژی زیادی را به وجود آورده‌اند. منطقه پس - گلژیی (TGN) به خوبی مشخص است و از آن حفره‌های ساده و پوشش‌دار تشکیل شده است (۸۰۰۰۰×) (برگرفته از کارهای A.Staehelin و همکاران، ۱۹۹۰). b) تجمع مواد پلی‌سارکاریدی در حفره‌های گلژی و انتقال آنها. افزایش اولین بخش‌های گلوسیدی خیلی زود و در حدّ شبکه آندوپلاسمی و کیسه‌های سطح نزدیک به وسیله ترانسفرازها انجام می‌شود و در کیسه‌های سطح دور تکمیل می‌گردد (۱۱۵۰۰×) (برگرفته از کارهای A.Staehelin). c) و d) مشخص‌کردن قطبیت دیکتیوزومی با استفاده از یدور روی - اسمیوم، هنگام تثبیت نمونه‌ها (ریشه ذرّت). شدت پذیرش ماده رنگی و تجمع آن که موجب افزایش کونتراست و تیرگی رنگ شده است در شبکه آندوپلاسمی و کیسه‌های دیکتیوزومی سطح نزدیک (C) است. کیسه‌های بخش میانی تراکم کمتری دارند. کیسه‌های سطح دور و به ویژه حفره‌های گلژیی (V) رنگ نگرفته‌اند. در شکل d، پلاسمودسماتا (PD) و دسموتربول‌هایی که از آنها می‌گذرند نیز مشخص است (۸۰۰۰۰×) (برگرفته از کارهای C.Hawes، ۱۹۸۲).



شکـــل ۹-۶. دستگاه گلژی. شبکه گلژی از آرایش و اتصال ۴ دیکتیوزوم در یک یاخته جانوری تشکیل شده است.

ترکیب شیمیایی

اولین تفکیک‌های تقریباً خالص دیکتیوزوم‌ها به وسیله کاف[1] و دالتون[2] (۱۹۵۹) و با استفاده از فن فرامرکزگریزی مرحله‌ای، از اپیدیدیم موش به‌دست آمده‌اند. سپس مورّه[3] و مولن‌هاور[4] (۱۹۶۴) دیکتیوزوم‌ها را از یاخته‌های گیاهی جدا کردند. تجزیه شیمیایی دیکتیوزوم‌ها به وسیله کاف و دالتون وجود فسفولیپیدها، پروتئین‌ها و فعالیت فسفاتاز اسیدی در آنها را نشان داد. مورّه و همکارش، مقادیر فسفولیپیدها، استرول‌ها و لیپیدهای خنثی را در دیکتیوزوم‌ها مشخص کردند. سرشار بودن دیکتیوزوم‌ها از فسفولیپیدها، با غشاهای فراوان آنها مطابقت دارد.

بررسی‌های سیتوشیمیایی دیکتیوزوم‌ها در یاخته‌ها، وجود دو گروه از مواد سازنده را در آنها نشان داده است:

۱- پلی‌اوزیدها و موکوپلی‌اوزیدها که به ویژه در کیسه‌های قطب پسین (سطح دور) فراوان هستند. این مطلب قطبیت زیست شیمیایی دیکتیوزوم‌ها را آشکار می‌کند که با مشاهدات ریخت‌شناسی مطابقت دارد.

۲- آنزیم‌های مختلف موجود در کیسه‌ها و حفره‌ها. این آنزیم‌ها به‌خصوص فسفاتازهای مختلف و پراکسیداز هستند. فریند[5] و فارکار[6] (۱۹۶۷) در حفره‌های پوشش‌دار، هیدرولازها را که از آنزیم‌های ویژه لیزوزوم‌ها هستند، شناسایی کردند.

استفاده از فن فرامرکزگریزی با میزان غلظت وجود آب و مجموعه‌ای از مواد جامد به ویژه گلیکوپروتئین‌ها، موکوپلی‌ساکاریدها، پلی‌ساکاریدها را در ترکیب دیکتیوزوم‌ها مشخص ساخته است.

در یاخته‌های کبد موش صحرایی، دیکتیوزوم‌ها دارای ۶۰٪ پروتئین و ۴۰٪ لیپید هستند. پروتئین‌ها شبیه پروتئین‌های شبکه آندوپلاسمی هستند اما تنوع کمتری از پروتئین‌های شبکه و گوناگونی بیشتری از پروتئین‌های غشاء یاخته دارند. این وضع را دلیلی بر این مطلب می‌دانند که پروتئین‌های غشایی ابتدا در شبکه آندوپلاسمی ساخته می‌شوند و سپس به غشاءهای مختلف یاخته‌ای می‌رسند.

بررسی‌های انجام شده در مورد ترکیب شیمیایی دیکتیوزوم‌ها نشان داده است که دستگاه گلژی در انواع یاخته‌های جانوری و گیاهی تفاوت زیادی از نظر مقدار و نوع پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و ترکیبات لیپیدی دارد.

فسفولیپیدها می‌توانند بینابین فسفولیپیدهای موجود در شبکه آندوپلاسمی و پلاسمالم باشد. شبکه آندوپلاسمی کلسترول و اسفنگومیلین بیشتر و اسیدهای چرب غیراشباع کمتری دارد، از این نظر غشاءهای گلژی بیشتر شبیه غشاء سیتوپلاسمی هستند.

در دیکتیوزوم‌های کبد موش صحرایی مقدار فسفاتیدیل کولین زیاد است اما در گیاهان مقدار فسفاتیدیک اسید و فسفاتیدیل گلیسرول بیشتر است.

غشاءهای گیاهی که شامل غشاء گلژی نیز می‌شوند، فاقد اسید زیالیک هستند اما، این قند و نیز گلیکواسفنگولیپیدها در دیکتیوزوم‌های کبد موش صحرایی به مقدار زیاد وجود دارند.

دیکتیوزوم‌های یاخته‌های گیاهی و جانوری به‌طور مشترکی دارای برخی ترکیبات قندی مانند گلوکز آمین، گالاکتوز، گلوکز، مانوز و فوکوز هستند. دیکتیوزوم‌های گیاهان دارای پنتوزهای آرابینوز و گزیلوز نیز هستند.

از ویژگی‌های مهم شیمیایی دیکتیوزوم‌ها وجود آنزیم‌های مختلف در آنهاست. این آنزیم‌ها در بخش‌های مختلف دیکتیوزوم پراکنش همگنی ندارند و مهم‌ترین آنها عبارتند از:

- تیامین پیروفسفاتاز (TP − ase) و نوکلئوزید دی فسفاتاز (ND − ase)، در **دو کیسهٔ اول** از سطح نزدیک؛

1- Kuff 2- Dalton 3- Morre 4- Mollenhaver 5- Frind
6- Farquhar

- فسفاتازهای اسیدی در کیسه‌های سطح دور؛
- نوکلئوتید آدنین دی نوکلئوتید فسفاتاز (NADP – ase) در کیسه‌های بینابینی (ناحیه میانی) و یک ´۵ نوکلئوتیداز آدنیلات سیکلاز در کیسه‌های سطح نزدیک و دور. این دو آنزیم در لبه‌های آبکی و حجیم کیسه‌ها تراکم بیشتری دارند. این آنزیم‌ها از آنزیم‌های شاخص غشاء سیتوپلاسمی نیز هستند.

تقریباً همه این آنزیم‌ها در سطح درونی (روزنی) غشاءهای کیسه‌های دیکتیوزومی قرار دارند. اما برخی بررسی‌های شیمی بافتی نشان داده است که برخی آنزیم‌ها مثل ´۵ نوکلئوتیداز آدنیلات سیکلاز در سطح سیتوپلاسمی کیسه‌ها قرار دارند.

فسفاتاز اسیدها، در فضای درونی کیسه‌ها وجود دارند.

بررسی‌های ایتو[1] و پالاد (۱۹۸۵) در مورد ترکیب شیمیایی دیکتیوزوم‌ها نشان داده است که هر دیکتیوزوم ساختمان همگنی ندارد، کیسه‌های تشکیل دهنده آن ترکیب شیمیایی و پراکنش آنزیمی یکسانی ندارد و حتی هر کیسه (ساکول) نیز در تمام بخش‌های خود همگن نیست و ساختمان موزائیکی دارد: بخش میانی هر کیسه که آن را بخش گلژیی نامند سرشار از گالاکتوزیل ترانسفرازها است؛

لبه‌های متورم کیسه که آن را بخش شبکه‌ای نامند غنی از گلوکز ۶- فسفاتاز و NADH سیتوکروم ردوکتاز، از آنزیم‌های شاخص شبکه آندوپلاسمی است (نشانه ارتباط دیکتیوزوم و شبکه آندوپلاسمی).

از ترکیبات مهمی که در ساختمان شیمیایی دیکتیوزوم‌ها شناسایی شده‌اند، گلیکواسفنگولیپیدها هستند که در دیکتیوزوم‌های یاخته‌های کبد موش صحرایی به مقدار زیاد وجود دارند. این ترکیبات که به‌طور اختصاصی در دیکتیوزوم‌ها ساخته می‌شوند، در برقراری اتصال‌های یاخته‌ای دخالت می‌کنند. این ترکیبات در عده‌ای از یاخته‌های سرطانی شده کمیاب هستند. نظر این است که در کمبود گلیکواسفنگولیپیدها، اتصال‌های یاخته‌ای سست می‌شوند، یا برقرار نمی‌گردند. این وضع می‌تواند عاملی برای خود مختاری یاخته‌ها و سرطانی شدن آنها باشد.

غشاءهای گلژی دارای آنزیم‌های دیگری مثل: NAHD سیتوکروم b_5 ردوکتاز، NADH سیتوکروم C ردوکتاز و ´۵ نوکلئوتیداز هستند که اساساً از آنزیم‌های شبکه آندوپلاسمی می‌باشند. جدول ۹-۱ مقایسه‌ای بین برخی آنزیم‌های موجود در دستگاه گلژی با سایر اندامک‌ها را مشخص می‌سازد.

جدول ۹-۱. پراکنش آنزیم‌های نشانه در بخش (فراکسیون) گلژی و بخش مشابهٔ دیگر اندامک‌ها در یاخته‌های کبدی موش صحرایی (برگرفته از نتایج پژوهش‌های موزه و مولن‌هاور، ۱۹۷۱).

آنزیم	بخش	فعالیت ویژه در بخش مشابه	فعالیت ویژه در دستگاه گلژی	نسبت
´۵ نوکلئوتیداز	غشای یاخته	۴۱/۹	۵/۸	۰/۱۴
گلوکز ۶ فسفاتاز	شبکه آندوپلاسمی	۱۱/۴	۱/۱	۰/۱
سیتوکروم اکسیداز	میتوکندری	۶۷/۸	۱/۸	۰/۰۳
اسیداوریک اکسیداز	پروکسیزوم‌ها	۵۰	۰/۵	۰/۰۱

یکی از عمده‌ترین گروه‌های آنزیمی بخش گلژیی، گلیکوزیل ترانسفرازها هستند که با انتقال قندهابه پروتئین‌ها و به لیپیدها به ترتیب موجب تشکیل گلیکوپروتئین‌ها و گلیکولیپیدها می‌شوند. نمونه‌های مهم این آنزیم‌ها: سیانیل

1- ITTO

ترانسفراز، گالاکتوزیل ترانسفراز، N – استیل گلوکز آمین ترانسفراز و گالاکتوزیل – N – استیل گلوکز آمین ترانسفراز هستند.

اعمال زیستی دستگاه گلژی

تا قبل از دو دهه اخیر، دستگاه گلژی را اغلب به‌صورت جایگاهی برای تجمع و تغلیظ موادی که از شبکه آندوپلاسمی می‌رسند و سپس بسته‌بندی و توزیع این مواد در یاخته‌ها می‌دانستند و نقش بیوسنتزی برای آن در نظر نمی‌گرفتند. بررسی‌های سال‌های اخیر و به کارگیری فنون نوینی از جمله نشاندار کردن پروتئین‌ها و قندها و ردیابی آنها در یاخته‌ها و نیز استفاده از روش‌های آنزیم‌شناسی، ایمنی‌شناسی سلولی و کاربرد میکروسکوپ‌های الکترونی نشان داد که دیکتیوزوم‌ها نه تنها محل انباشتن، تغلیظ، بسته‌بندی و هدایت مواد به سوی هدف نهایی می‌باشند بلکه با داشتن آنزیم‌های متفاوت و فعالیت این آنزیم‌ها در بیوسنتز و تغییر و تحول مواد به‌خصوص انتقال قندها به پروتئین‌ها و لیپیدها (واکنش‌های گلیکوزیلاسیون) نقش مهم و در بسیاری موارد، پایانی دارند. علاوه بر این دیکتیوزوم‌ها در سولفاتاسیون[1]، انجام مراحلی از تجزیه پروتئین‌ها، بسته‌بندی لیپوپروتئین‌ها و ذرات ترشحی، بیوژنز غشاء، ترمیم و بازسازی غشاء یاخته‌ای، غشاء ذرات ذخیره‌ای و ترشحی، پذیرش غشاءهای بازگشتی از سطح یاخته، فراهم‌آوری آنزیم‌های لیزوزومی، ترشح مواد، سازمان‌دهی برخی اجزای یاخته‌ای، تقسیم سیتوپلاسم در یاخته‌های گیاهی دخالت دارد.

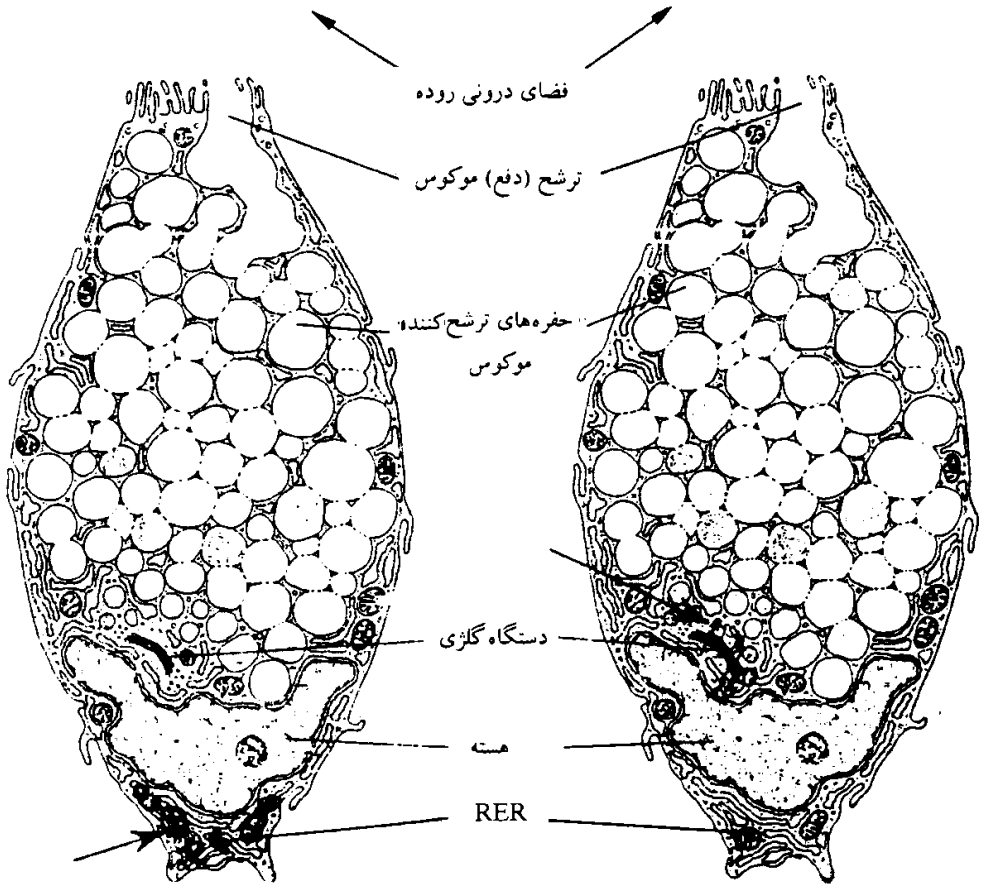
۱- گلیکوز یلاسیون (افزودن قندها)

بسیاری از پروتئین‌های ترشحی، قنددار (گلیکوزیله) می‌شوند و بنابراین از گروه گلیکوپروتئین‌ها هستند. یک تجربه متداول از نوع خود پرتونگاری نشان می‌دهد که پدیده گلیکوزیلاسیون در کجا اتفاق می‌افتد (شکل ۹-۷). این تجربه در یاخته‌های موسیلاژی که فضای درونی رودهٔ پستانداران را می‌پوشانند انجام شده است. بخش عمده‌ای از حجم این یاخته‌ها به وسیله حفره‌های ترشحی سرشار از موکوس (گلیکوپروتئین‌هایی که در آنها بخش قندی برتری دارد) اشغال شده است.

یاخته‌های ترشحی رودهٔ موش صحرایی (یاخته‌های موکوسی) در محیط کشت قرار گرفته‌اند. برخی یاخته‌ها به مدت سه دقیقه با مانوز تریسیوم‌دار (^{3}H مانوز) و عده‌ای دیگر به همین مدت با فوکوز تریسیوم‌دار (^{3}H فوکوز) تیمار شده‌اند. سپس بافت‌ها شسته شده و با تثبیت‌کننده‌های شیمیایی تثبیت و برای خود پرتونگاری با میکروسکوپ الکترونی آماده شده‌اند. نتایج دو نشانه‌گذاری نشان داده است که مانوز در حد شبکه آندوپلاسمی (شکل ۹-۷ الف) و فوکوز دیرتر و در حد دستگاه گلژی به پروتئین‌ها افزوده شده است (شکل ۹-۷ ب).

با این ترتیب گلیکوزیلاسیون فرآیندی مرحله‌ای (ترتیبی) به‌نظر می‌رسد که، از شبکه آندوپلاسمی خشن آغاز می‌گردد. در یوکاریوت‌ها، قندها بر روی ۴ زنجیره از اسیدهای امینه متفاوت، تثبیت شده‌اند. در این زمینه دو حالت در نظر گرفته می‌شود: الف) قندهای متصل به O (گروه گلیکولِ سرین، ترئونین یا هیدروکسی لیزین)؛ ب) قندهای متصل به N (گروه آمیدِ آسپاراژین). ساختمان این قندها متفاوت است (شکل ۹-۸).

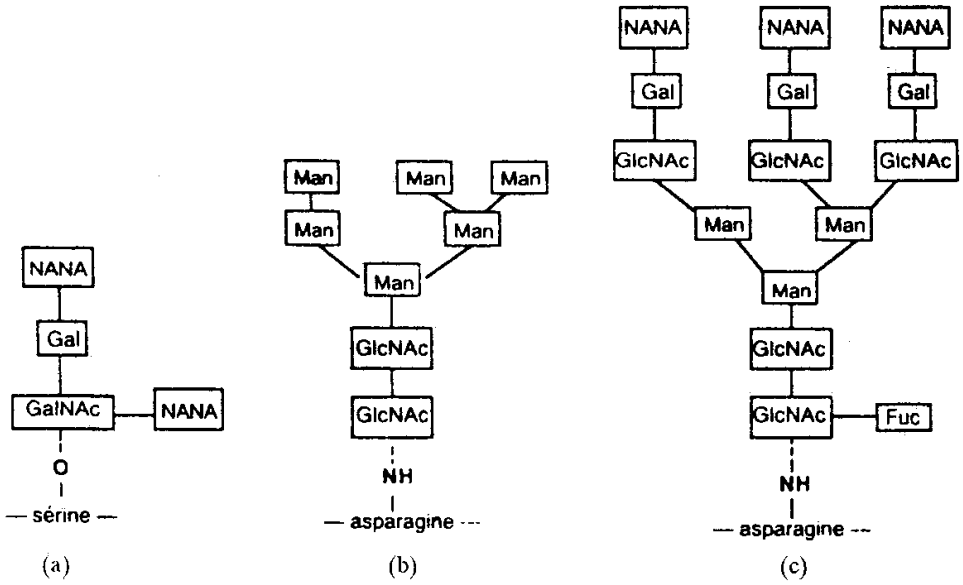
1- Sulfatation



a) تیمار به مدت ۳ دقیقه با مانوزتریسیوم‌دار

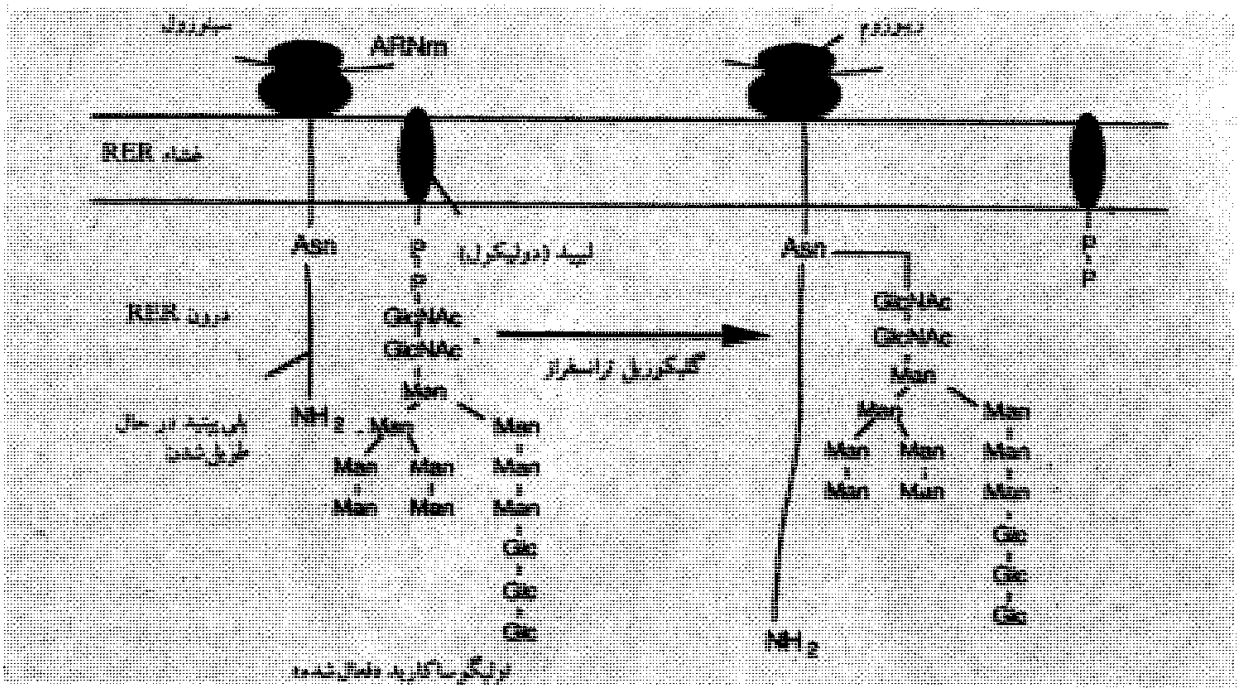
b) تیمار به مدت ۳ دقیقه با فوکوز تریسیوم‌دار

شکل ۹-۷. تجربه نشان دهنده گلیکوزیلاسیون مرحله‌ای (ترتیبی) پروتئین‌ها در یاخته‌های روده‌ای که ترشح‌کننده موکوس هستند. الف - پس از تیمار یاخته‌ها به مدت ۳ دقیقه با مانوزتریسیوم‌دار ب- پس از تیمار یاخته‌ها به مدت ۳ دقیقه با فوکوزتریسیوم‌دار. پیکان‌ها موقعیت ذرات نقره و بنابراین جایگاه تداخل (افزایش) ماده پیش‌ساز به پروتئین‌ها را نشان می‌دهند. (برگرفته از نتایج پژوهش‌های T.L.LENTZ، ۱۹۷۱).



شکل ۹-۸. ساختمان اولیگوساکاریدهای متصل شده به N و O الف - اولیگوساکارید متصل به O (اکسیژن گروه‌های هیدروکسیلِ سرین، یا تِرئونین). ب - اولیگوساکارید متصل به N (ازتِ آمیدِ آسپاراژین)، نوع با مانّوز بیشتر. ج - اولیگوساکارید متصل به N، نوع آمیخته NANA، N — استیل نورآمینات؛ Gal، گالاکتوز؛ GlcNac، N — استیل گلوکز آمین؛ GalNac، N — استیل گالاکتوز آمین؛Man، مانّوز؛ Fuc، فوکوز

برای مثال افزایش قندهای متصل به آسپاراژین (قندهای متصل به N) را در نظر بگیریم. پیش‌ساز همهٔ قندهای متصل به N برای تمام یاخته‌ها مشترک و عبارت است از: اولیگوساکاریدی دارای ۱۴ حلقه قندی که بیشتر آن از مانّوز است. این پیش‌ساز به دو فسفات متصل است، بنابراین به حالت «فعال شده» است و به یک جزء لیپیدی از غشاء شبکه آندوپلاسمی خشن چسبیده است. این پیش‌ساز به یک زنجیره پلی‌پپتیدی در حال تولید (طویل شدن) منتقل و نگهداری می‌شود. این انتقال با واسطه یک گلیکوزیل - ترانسفراز و با خرج انرژی موجود در پیوندهای فسفات انجام می‌شود (شکل ۹-۹).



شکل ۹-۹. گلیکوزیلاسیون در شبکه آندوپلاسمی. انتقال رهبری شدهٔ یک اولیگوساکارید «فعال شده» به آسپاراژینِ یک پلی‌پپتید در حال طویل‌شدن. این انتقال با واسطه ناقل لیپیدی «دولیکول[1]» رهبری (انجام) می‌شود.

در این گیرنده گلوسیدی دو بخش را می‌توان مشخص کرد:

- **یک ناحیه پیشین**، که تغییر نخواهد یافت؛ پس به حالت نهایی است؛
- **یک ناحیه پایانی**، سرشار از مانّوز و گلوکز، که بازآرایی خواهد شد (شکل ۹-۱۰ الف).

در دستگاه گلژی پروتئین‌های قنددار شده، تغییراتی را در ساختمان و ترکیب اولیگوساکاریدها متحمل می‌شوند. این تغییرات به وسیلهٔ عمل ترتیبی (مرحله‌ای) گلیکوزیدازها که بخشی از قندها را جدا می‌کنند (برای مثال مانّوزیدازها) و گلیکوزیل ترانسفرازها که قندها (گالاکتوز، فوکوز، NANA «N – استیل نورآمینات») را می‌افزایند، انجام می‌شود. بنابراین ناحیه پایانی به صورتی بسیار اختصاصی و برنامه‌ریزی شده تغییر می‌یابد (شکل ۹-۱۰ ب).

در حقیقت، این تغییر و تبدیل از دخالت منظم و مشخص شدهٔ آنزیم‌هایی نتیجه می‌شود که هر یک محصول عمل آنزیم قبل از خود را، به‌عنوان گوهر مایهٔ (سوبسترای) خود می‌شناسد. بنابراین، ویژه بودن (تخصص یافتگی) آنزیم‌های موجود در غشاءها است (رمزدار شده به وسیله ژنوم هسته‌ای) که نوع اولیگوساکاریدهای تثبیت شونده را مشخص می‌سازد. بررسی‌های انجام شده نشان داده‌اند که پدیده حذف برخی بخش‌های قندی در حدّ سطح نزدیک و نیز به‌خصوص در حد بخش میانی دستگاه گلژی انجام می‌شود، در حالی که افزایش قندهای جدید (به وسیله گالاکتوزیل - ترانسفرازها، فوکوزیل - ترانسفرازها و...) در حدّ سطح دور دستگاه گلژی صورت می‌گیرد (شکل ۹-۱۱).

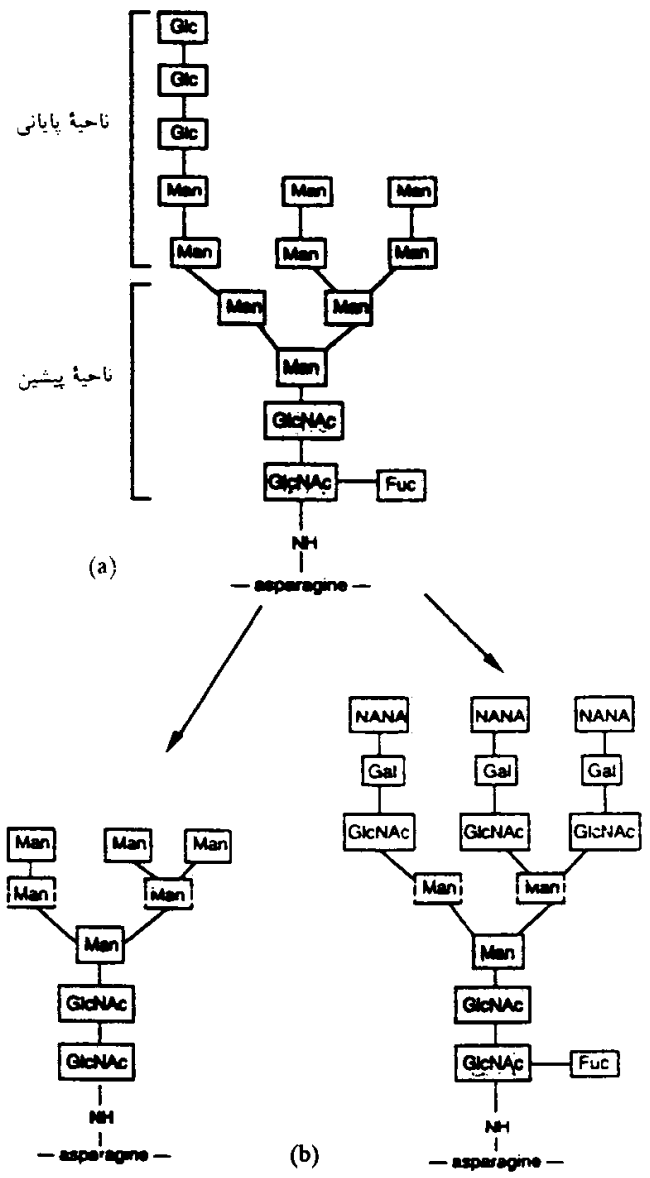
به خلاف آنچه در مورد پروتئین‌ها دیده‌ایم، ترتیب اولیگوساکاریدی، ناشی از یک ماده زمینه‌ای نیست، بلکه نتیجه‌ای از فعالیت ترتیبی، منظم و هماهنگ تعداد زیادی مجموعه‌های آنزیمی است که در غشاءهای اجزای مختلف یاخته‌ای تثبیت شده‌اند.

با بهره‌گیری از قندهای نشاندار و فنّ خود پرتونگاری، آگاهی‌های زیادی در مراحل گلیکوزیلاسیون در شبکه

1- Dolicole

آندوپلاسمی و دستگاه گلژی به‌دست آمده است. همان گونه که جدول ۹-۲ نشان می‌دهد سه الگوی پیوستگی ارائه شده است. وقتی به‌عنوان پیش‌ساز، د - مانّوز نشاندار به کار گرفته شود، نخست شبکه آندوپلاسمی خشن نشان‌دار می‌شود و سپس به ترتیب دیکتیوزوم‌ها (دستگاه گلژی)، ذرات ترشحی، غشاء یاخته‌ای یا فضای بیرون یاخته‌ای، نشان‌دار می‌گردند. اما وقتی که اسید سیالیک، ال - فوکوز یا د - گالاکتوز نشان‌دار به کاربرده شود، دستگاه گلژی نشان‌دار می‌شود؛ با د - گلوکز آمین، شبکه آندوپلاسمی خشن و دستگاه گلژی، به‌طور همزمان نشان‌دار می‌شوند. بررسی مقایسه‌ای ترشح گلیکوپروتئین‌ها و ترشح آلبومین به وسیله یاخته کبدی، تفاوت‌هایی را در مدت زمان انتقال این مواد از بخش‌های مختلف دستگاه واکوئلی نشان داده است. آلبومین به‌طور مستقیم از فضای درونی کیسه‌ها می‌گذرد، در حالی که گلیکوپروتئین‌ها چسبیده به غشاء کیسه‌ها باقی می‌مانند و در آن‌جا با دخالت گلیکوزیل ترانسفرازها، قنددار می‌شوند.

در بررسی‌های خود پرتونگاری با استفاده از میکروسکوپ‌های الکترونی، فوکوز تریسیوم‌دار (^3H - فوکوز) به‌عنوان پیش‌ساز برتر انتخاب شده است، زیرا، تنها در گروه‌های انتهایی اولیگوساکاریدهای گلیکوپروتئین‌ها وارد می‌شود و در موکوپلی‌ساکاریدها نیز وجود ندارد. در یاخته‌های روده‌ای به کارگیری فوکوز تریسیوم‌دار موجب می‌شود که خیلی سریع و حدود دو دقیقه بعد از تزریق، دستگاه گلژی نشان‌دار شود.



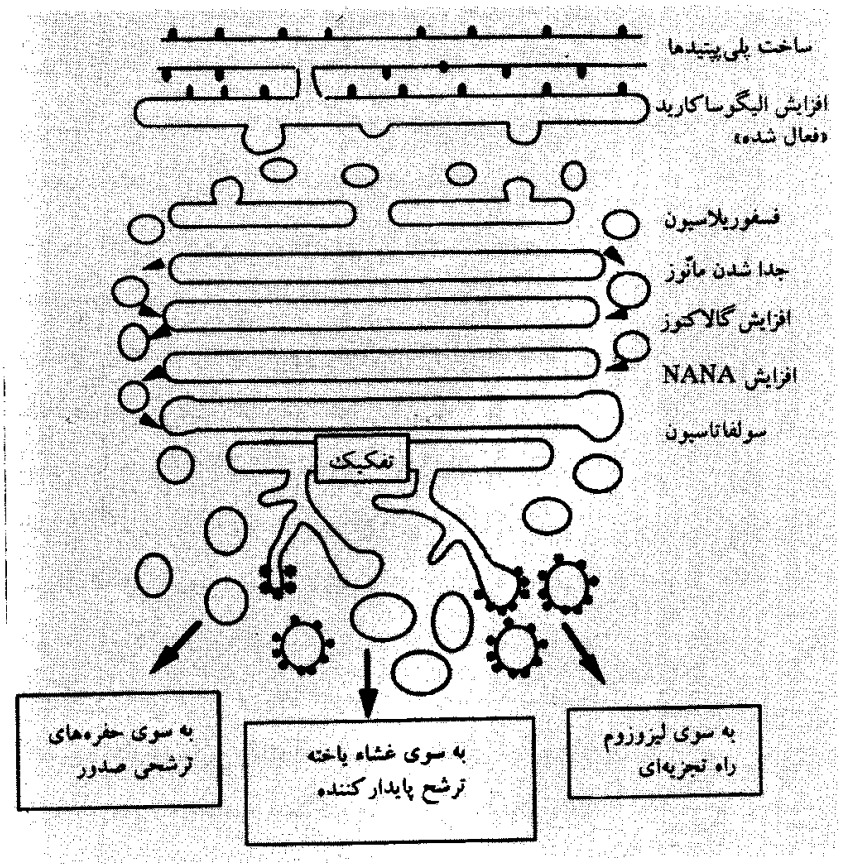
شکل ۹-۱۰. مثال‌هایی از تغییرات اولیگوساکاریدها به وسیله حذف برخی قندها و سپس افزایش قندهای جدید. الف - بخش اولیگوساکاریدی انتقال یافته و تثبیت شده بر روی آسپاراژین یک زنجیره پلی‌پپتیدی در حال تولید در شبکه آندوپلاسمی خشن (شکل ۹-۱۰ را نیز ببینید)؛ این اولیگوساکارید دارای یک ناحیه پیشین نهایی و یک ناحیه پایانی است که که بازآرایی خواهد شد. ب - اولیگوساکاریدهای بالغ شده بعد از بازآرایی در دستگاه گلژی.

سپس گلیکوپروتئین‌های نشان‌دار شده به سوی کناره‌های یاخته مهاجرت می‌کنند و در مدت ۴ ساعت به غشاءهای رأسی یاخته‌ها می‌رسند. مهاجرت درون یاخته‌ای گلیکوپروتئین‌ها با واسطهٔ حفره‌های کوچکی که به وسیله دیکتیوزوم‌ها تشکیل می‌شوند، انجام می‌گیرد.

علاوه بر گلیکوپروتئین‌هایی که از یاخته‌ها به خارج صادر می‌شوند و آنهایی که در ساختمان غشاء یاخته‌ای وارد می‌شوند، گلیکوپروتئین‌های دیگری نیز وجود دارند که به لیزوزوم‌ها می‌روند. فوکوز تریسیوم‌دار ابتدا به دستگاه گلژی وارد می‌شود و پس از مدتی به لیزوزوم‌ها، پلاسمای خون و از آنجا به غشاءهای سلولی می‌رسد.

بررسی‌های انجام شده در مورد نقش دستگاه گلژی در گلیکوزیلاسیون مواد مختلف نشان داده است که علاوه بر گلیکوزیلاسیون گلیکوپرورتئین‌ها، گلیکوزیلاسیون لیپیدها و به‌خصوص آنهایی که دارای گالاکتوز انتهایی، اسید سیالیک، سروبروزیدها و گانگلیوزیدها هستند، در دستگاه گلژی صورت می‌گیرد.

کشف ترکیبات مختلف گلیکولیپیدی از جمله دو لیکول‌فسفات[1]ها در بافت‌های جانوری، موجب این نظر شده است که این مواد می‌توانند به‌صورت میانجی در ساخت گلیکوپروتئین‌ها عمل کنند. این ترکیبات در دستگاه گلژیِ یاخته‌هایی فعال هستند که، آنها را به‌عنوان ناقل قندها، متناسب با ساخت گلیکوپروتئین‌ها مورد استفاده قرار می‌دهند.



شکل ۹-۱۱. ناحیه (کَدَه)بندی در دستگاه گلژی. برخی مراحل بلوغ (رسیدگی) و سه مسیر اصلی که بعد از ناحیه سطح دور دیکتیوزوم و شبکهٔ پس -گلژیی، برای پیشروی مواد منظور شده است.

جدول ۹-۲. ورود (تداخل) پیش‌سازهای متفاوت به گلیکوپروتئین‌ها (برگرفته از پژوهش‌های H.J.Schachter، ۱۹۷۳).

نوع ساختار	پیش‌ساز نشاندار	تفسیر آزمایش‌های ردیاب
A	لوسین د - مانوز	شبکه آندوپلاسمی خشن ← گلژی ← ذره ترشحی ← فضای برون‌یاخته‌ای، یا غشا یاخته ↑ نشانه
B	اسید زیالیک ال - فوکوز د - گالاکتوز	شبکه آندوپلاسمی ← گلژی ← ذره ترشحی ← فضای برون یاخته‌ای، یا غشاء یاخته ↑ نشانه
C	د - گلوکزآمین	شبکه آندوپلاسمی ← گلژی ← ذره ترشحی ← فضای برون یاخته‌ای، یا غشاء یاخته ↑ نشانه ↑ نشانه

۲- سولفاتاسیون

به کمک تجربیات خود پرتونگاری با گوگرد نشان‌دار می‌توان محلی را که در آن گروه‌های سولفات به پروتئین‌ها

1- Dolicol Phosphate

افزوده می‌شوند، مشخص ساخت. با استفاده از ایزوتوپ ^{35}S، نشان‌دارشدن دیکتیوزوم‌های یاخته‌های موسیلاژی به اثبات رسیده است. سولفاتاسیون در دستگاه گلژی با دخالت سولفو - ترانسفرازهای متصل به غشاء در سطح دور انجام می‌شود (شکل ۹-۱۱) و ضمن آن گروه سولفات از یک دهنده فعال جدا شده و به یک پذیرندهٔ مناسب انتقال می‌یابد.

در سال ۱۹۶۴، لان[1] و همکارانش با روش خود پرتونگاری عمل سولفاتاسیون را در دستگاه گلژی به اثبات رساندند، سپس گودمن[2] و دیگران و کمی بعد یانگ[3] پژوهش‌هایی را با همین روش و استفاده از میکروسکوپ الکترونی انجام دادند در یاخته‌های متفاوتی از جمله یاخته‌های گابلت[4] (یاخته‌های جامی شکلی که در پوشش درون دستگاه گوارش به ویژه روده وجود دارند و تولیدکننده موسیلاژ هستند)، یاخته‌های غضروفی، یاخته‌های شوان، یاخته‌های اندوتلیال، فیبروبلاست‌ها، یاخته‌های فولیکولی تخمدان و گویچه‌های سفید، جذب سولفات نشان‌دار به وسیله دیکتیوزوم‌ها را مشخص ساختند.

ادامهٔ پژوهش‌ها نشان داد که در یاخته‌هایی که پروتئوگلیکان‌های سولفات‌دار (سولفات کوندروئیتن، موسین) ترشح می‌کنند، از جمله یاخته‌های گابلت و یاخته‌های غضروفی، جایگاه این سولفاتاسیون، دستگاه گلژی است.

در عمل سولفاتاسیون، همانند آنچه در گلیکوزیلاسیون رخ می‌دهد، سولفات با پیوستن به یک نوکلئوتید فعال می‌شود و به وسیله یک سولفو - ترانسفراز اختصاصی به مولکول‌پذیرنده خود منتقل می‌گردد. محلّ استقرار این آنزیم‌ها نسبت به گلیکوزیل ترانسفرازها ناشناخته‌تر است، اما مشخص شده که تعدادی از سولفو - ترانسفرازها در دستگاه گلژی وجود دارند. نخستین سولفو - ترانسفرازی که در دستگاه گلژی شناخته شد، سروبروزید سولفو - ترانسفراز است که اولین بار در بافت کلیوی موش صحرایی شناسایی شد. این آنزیم مسئولیت تبدیل سروبروزید به سولفاتید را که یک گلیکولیپید سولفات‌دار است، بر عهده دارد.

۳- افزودن گروه‌های فسفات

بررسی‌هایی که با استفاده از فسفر رادیواکتیو بر روی دستگاه گلژی انجام شده است، نشان داده که افزایش گروه‌های فسفات به برخی پروتئین‌ها که در دستگاه گلژی صورت می‌گیرد، انتقال اجباری آنها به سوی لیزوزوم‌ها را موجب می‌شود.

۴- راهنمایی پروتئین‌ها

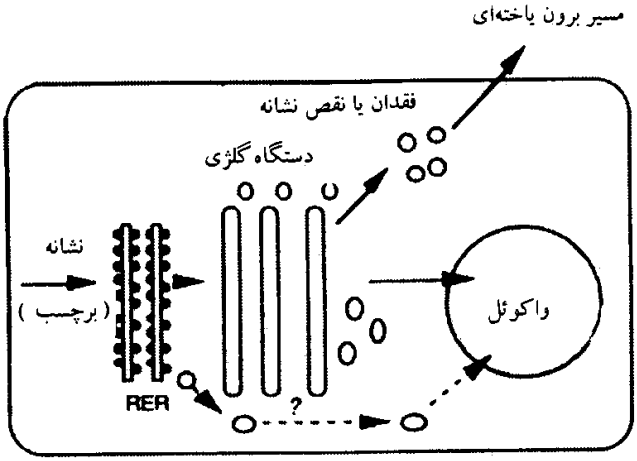
پدیده گلیکوزیلاسیون را راهی برای پشتیبانی از پروتئین‌ها در برابر حمله‌های آنزیمی، ضمن انتقالشان در نظر گرفته‌اند. اما نقش مهمتر زنجیره‌های جانبی قنددار شده، بی‌تردید فراهم‌آوردن ره‌یافت صحیح پروتئین‌ها به سوی هدف نهایی است. دستگاه گلژی به‌عنوان یک مرکز جداگر است که از آن پروتئین‌ها در سه مسیر اصلی هدایت می‌شوند (شکل ۱۱-۹):

- صدور به خارج از یاخته. این عمل به وسیلهٔ حفره‌هایی که اغلب پوشیده شده از کلاترین هستند و از سطح دور دیکتیوزوم‌ها جوانه می‌زنند (TGN)، انجام می‌شود. این حفره‌ها پوشش کلاترینی خود را از دست می‌دهند و سپس می‌توانند برای انجام دفع یاخته‌ای، با غشاء سیتوپلاسمی ادغام می‌شوند. بسیاری از آنزیم‌های گوارشی و نیز انسولین به همین ترتیب از یاخته خارج می‌شوند. ترتیب‌های اولیگوساکاریدی برای این ره‌یابی، حکم برچسب را دارند؛

1- Lane 2- Godman 3- Young 4- Goblet Cell

- تداخل به غشاء یاخته‌ای برای فراهم ساختن امکان بازسازی و باز چرخش آن: این پدیده‌ای است که آن را ترشح پایدارکننده می‌نامند. برای این مسیر بسیار جالب (که امکان بازسازی غشاء یاخته‌ای را فراهم می‌سازد)، رمز راهنما به خوبی شناخته نشده است. ممکن است این مسیر با فقدان یا نقصانی در برچسب مطابقت داشته باشد.
- مسیر لیزوزومی، یا مسیر تجزیه‌ای. برچسب ویژه این مسیر مانّوز ۶ - فسفات است.

در یاخته‌هایی که قطبیت آشکاری دارند، تفکیک پروتئین‌هایی که سوی قطب انتهایی و قطب‌های جانبی و قاعده‌ای هدایت می‌شوند، احتمالاً در حدّ دستگاه گلژی انجام می‌شود (شکل ۹-۱۲).



شکل ۹-۱۲. راهنمایی پروتئین‌ها در یاخته گیاهی. پروتئین‌هایی که در سطح شبکه آندوپلاسمی خشن ساخته شده‌اند، به کمک یک ترتیب نشانه، به درون شبکه نفوذ می‌کنند. پرتئین‌های صادراتی در نتیجه فقدان یا نقصان نشانه (برچسب)، راهیِ سطح یاخته می‌شوند. (گیرنده‌های اولیگوساکاریدی به صورتی که در یاخته‌های جانوری وجود دارند، به کار گرفته نمی‌شوند). گلیکوپروتئین‌هایی که بایستی به واکوئل مرکزی بروند، دارای اطلاعاتی هستند که برایشان در حکم نشانه (برچسب) است. این اطلاعات به احتمال زیاد در بخش‌های پلی‌پپتیدی موجود در درون مولکول نهفته‌اند. گذر مستقیمی از شبکه آندوپلاسمی به سوی واکوئل و نیز حفره‌های ترشحی نفی شده است، اما بایستی شناخته شود.

در یاخته‌های گیاهی، چگونگی هدایت پروتئین‌ها ابتدا در سطح شبکه آندوپلاسمی خشن ساخته می‌شوند و به کمک ترتیب نشانه به درون شبکه می‌رسند. اما هنگام «جدایی» فرآیندها متفاوت است. به نظر می‌رسد که در یاخته‌های گیاهی به دلیل فقدان یا نقصان نشانه (برچسب) است که پروتئین‌ها به مسیر برون یاخته‌ای راهنمایی می‌شوند و به سطح یاخته می‌رسند (و نه به وسیله گیرنده‌های اولیگوساکاریدی). برعکس گلیکوپروتئین‌هایی که برای رفتن به واکوئل مرکزی منظور می‌شوند، دارای برچسب (نشانه) هستند؛ این برچسب مانّوز -۶- فسفات نیست، بلکه به احتمال زیاد، بخش‌های پلی‌پپتیدی هستند که در درون مولکول وجود دارند.

چگونگی عبور گلیکوپروتئین‌ها از دستگاه گلژی

یکی از مسائلی که هم‌اکنون مورد توجه دانشمندان و پژوهشگران علوم زیستی است، شناخت دقیق چگونگی جابه‌جایی مواد در یاخته‌ها می‌باشد. بررسی چگونگی حرکت و پراکنش مواد در بین اندامک‌ها با واسطهٔ حفره‌های انتقالی، چگونگی جوانه‌زدن و تشکیل این حفره‌ها و این که چگونه این حفره‌ها، مقاصد نهایی و اصلی خود را می‌یابند، به آنها می‌پیوندند و با آنها ادغام می‌شوند از مسایل مهم مورد پژوهش در زیست‌شناسی یاخته‌ای و مولکولی است. در این میان دستگاه گلژی به‌عنوان یک مرکز جداگر و هدایت‌کننده نقش و اهمیت اساسی دارد. در مورد چگونگی عبور پروتئین‌ها از دستگاه گلژی و رسیدن آنها از سطح نزدیک به سطح دور طرح‌های متفاوتی ارائه شده است که مهم‌ترین آنها به شرح زیر است:

الف - طرح پیشرفت (جابه‌جایی) کیسه‌ها[1]

در این طرح، حفره‌های گذر که از جوانه‌زدن شبکه آندوپلاسمی ایجاد شده‌اند به سطح نزدیک دیکتیوزوم

1- Cisterbak Progression model

می‌رسند، در آنجا به‌هم می‌پیوندند، ادغام می‌شوند و کیسه جدیدی را به وجود می‌آورند. کیسه‌ها به‌تدریج به سطح دور جابه‌جا می‌شوند و در آنجا، حفره‌های انتقالی را می‌سازند که در نهایت، پروتئین‌ها و مواد دیگر را به مقاصد اصلی می‌رسانند. بر بنای همین طرح بوده است که سطح نزدیک را سطح تشکیل و سطح دور را سطح رسیدگی (بلوغ) یا سطح ترشح نامیده‌اند. در این طرح هیچ ماده‌ای از بین کیسه‌ها منتقل نمی‌شود، بلکه کیسه‌ها به‌تدریج جابه‌جا می‌شوند و ضمن جابه‌جایی ویژگی‌های بیوشیمیایی خود را تغییر می‌دهند. گرچه این طرح هنوز به ویژه برای یاخته‌های گیاهی مطرح است، اما دلایل عملی کافی ندارد؛ برعکس ناهمگنی کیسه‌ها ی هر دیکتیوزوم این سؤال را مطرح می‌سازد که چگونه کیسه‌ها می‌توانند ویژگی‌های خود را ضمن جابه‌جایی تغییر دهند؟!

ب - *طرح انتقال حفره‌ای یک مسیری* [1]

در این طرح کیسه‌ها به‌صورت بخش‌های ساختاری مشخص باقی می‌مانند و به یکدیگر تبدیل نمی‌شوند بلکه، پروتئین‌ها در حفره‌هایی که از جوانه‌زدن کناره هر کیسه ایجاد می‌شوند، بسته‌بندی می‌شوند؛ این حفره‌ها از کناره هر کیسه جدا می‌شوند و به کیسه مجاور خود که به سطح‌دور، نزدیک‌تر است می‌پیوندند و به این ترتیب پرتئین‌ها و دیگر مواد درون حفره‌ها، از کیسه‌ای به کیسه دیگر دیکتیوزوم در جهت سطح نزدیک به سوی سطح دور دیکیتوزوم منتقل می‌شوند و از آنجا با واسطه حفره‌های ترشحی یا انتقالی به سوی مقاصد نهایی هدایت می‌گردند (شکل ۹-۱۱).

نشان‌دادن این پدیده انتقال جهشیِ [2] حفره‌ها از کیسه‌ای به کیسه دیگر دیکتیوزوم در یاخته‌هایی که تعدادی دیکتیوزوم دارند، دشوار است زیرا به‌طور قطعی نمی‌توان قضاوت کرد که پروتئین در حالت انتقال، از کیسه‌های یک دیکتیوزوم است یا از دیکتیوزوم‌های مجاور رسیده است. در عین حالت پژوهشگران با استفاده از یاخته‌های طبیعی و جهش‌یافته تخمدان‌ها مسترچینی (CHO) و به کارگیری فن خود پرتونگاری، پدیدهٔ انتقال جهشی یا انتقال حفره‌ای یک مسیری را به اثبات رسانیده‌اند (Tartakoff و Vassali، ۱۹۸۳).

ج - *طرح انتقال‌های اتفاقی حفره* [3]*ها*

این طرح مشابه طرح قبلی است با این تفاوت که حفره‌های ایجاد شده از کنارهٔ هر کیسه دیکتیوزومی به جای آن که در مسیری مشخص و به صورتی منظم از کیسه‌ای به کیسه مجاور خود به سوی سطح دور انتقال یابد، به‌طور اتفاقی (یا انتخابی؟) می‌تواند به هر کیسه دیکتیوزومی منتقل شود و همراه خود پروتئین‌ها و مواد دیگر درون خود را انتقال دهد.

د - *طرح نفود جانبی* [4]

در این طرح پروتئین‌ها با استفاده از نواحی نفوذی در کناره‌های کیسه‌های دیکتیوزومی، که به‌طور دائمی یا موقت کیسه‌ها را به‌هم متصل می‌کنند، از خلال دستگاه گلژی می‌گذرند. برخی از این نواحی اتصال به کمک میکروسکوپ الکترونی دیده شده‌اند اما، به‌طور قطع نمی‌توان گفت که این اتصال‌ها، واقعی هستند یا بر اثر نقش تثبیت‌کننده‌ها ایجاد شده‌اند و بنابراین، ساختارهایی مجازی هستند.

هـ- *طرح انتقال سطحی*

در این طرح حفره‌هایی که از کنارهٔ کیسه‌های دیکتیوزوم جوانه می‌زنند، بلافاصله به کیسه مجاور می‌چسبند

1- Vesicular transport unidirection model 2- Hopping
3- Vesicular transfers at rims random Walk model 4- Lateral diffusion model

و قدرت رهایی و دور شدن از دستگاه گلژی را ندارند.

از بین طرح‌های متفاوتی که برای عبور پروتئین‌ها از دستگاه گلژی ارائه شده‌اند، طرح انتقال حفره‌ایِ یک مسیری و طرح انتقال‌های اتفاقی حفره‌ها، بیشتر مورد توجه هستند.

یاخته‌های سرطانی - تغییرات در گلیکوزیلاسیون لیپیدها و پروتئین‌ها

دستگاه گلژی در ساخت گانگلیوزیدها و گلیکواسفنگولیپیدهای دیگر نقش مرکزی دارند. بسیاری از ترانسفرازهایی که در گلیکوزیلاسیون گلیکواسفنگولیپیدها دخالت دارند با تراکم زیادی در دستگاه گلژی و با میزان کمتری در شبکه آندوپلاسمی وجود دارند. گلیکواسفنگولیپیدها، همانند گلیکوپروتئین‌ها در نتیجه افزوده شدن تدریجی قندها (که از مجموعهٔ «قند - نوکلئوتید» آزاد می‌شوند) به سِرامید یا به پذیرنده‌های گلیکولیپیدی در حال تشکیل، ساخته می‌شوند. دلایلی در دست است که نشان می‌دهند در یاخته‌های سرطانی، سطح غشاء دستخوش تغییراتی می‌شود که با از دست دادن گلیکواسفنگولیپیدها همراه است. بخشی از این تغییرات، نتیجهٔ کاهش یک یا تعدادی از گلیکوزیل ترانسفرازهای موجود در دستگاه گلژی است. این مطلب که این تغییرات در گلیکوپروتئین‌ها و گلیکواسفنگولیپیدهای سطح غشاء می‌تواند با گسترش حالت بدخیم در یاخته‌ها وابسته باشد، هم‌اکنون مورد توجه زیاد است.

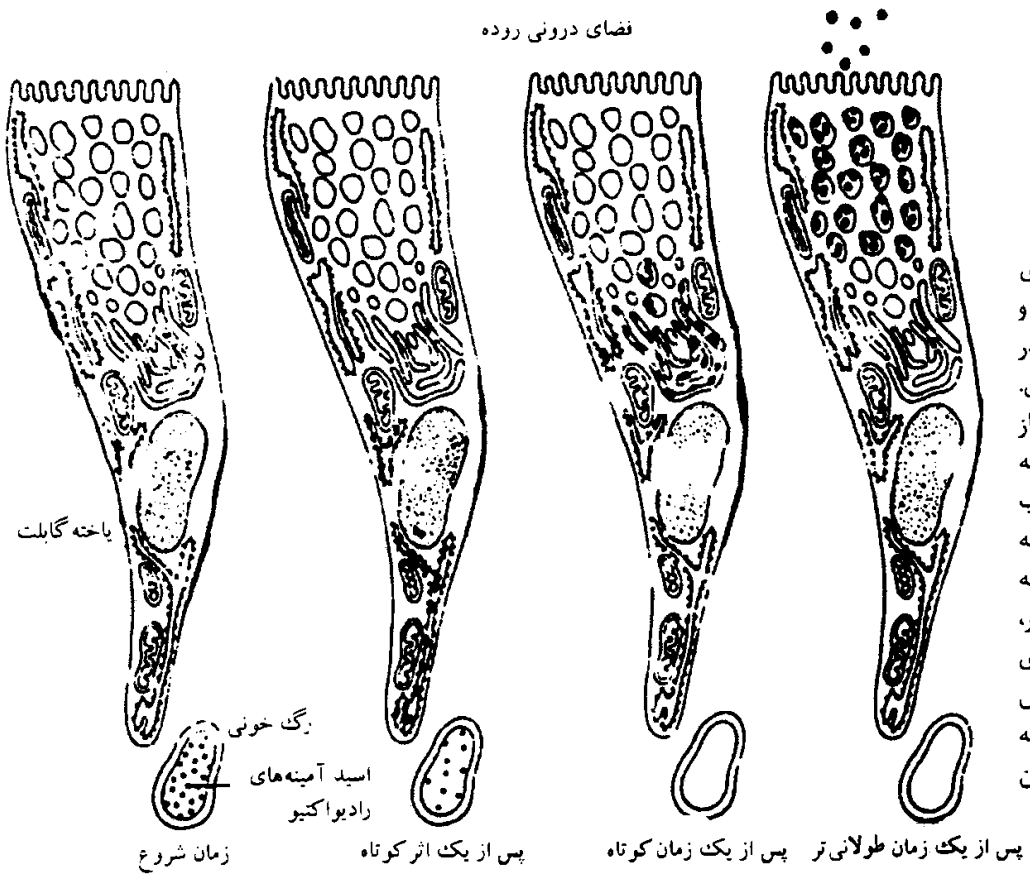
۵- ترشح - عمل اصلی دستگاه گلژی

به‌طور کلی شبکه آندوپلاسمی و دستگاه گلژی اندامک‌های اصلی هستند که به‌طور مستقیم در ساخت، انتقال و رهایی ماکرومولکول‌ها در یاخته‌ها نقش اساسی دارند.

نقش دستگاه گلژی در ترشح یاخته‌ای با پژوهش‌های کاجال[1] در ۱۹۱۴ به خوبی مشخص شد. کاجال در تجربه‌ای بر روی یاخته‌های گابلت (یاخته‌های جامی شکل ترشح‌کننده موکوس، موجود در پوشش نورونی لوله گوارش) که قطبیت مشخصی دارند با استفاده از لوسین تریسیوم‌دار و فن خودپرتونگاری، نشان داد که حدود ۵ دقیقه بعد از ورود لوسین تریسیوم‌دار به یاخته‌ها، شبکه آندوپلاسمی خشن نشاندار می‌شود که دلیلی بر استفاده از لوسین برای ساخت پروتئین‌ها به وسیله ریبوزوم‌ها در سطح غشاء شبکه خشن و سپس نفوذ پروتئین‌ها به درون این شبکه است؛ حدود ۲۰ دقیقه بعد از ورود لوسین تریسیوم‌دار، شبکه آندوپلاسمی صاف و سپس دیکتیوزوم‌های مجاور آن نشان‌دار می‌شوند. سپس نوبت به نشان‌دارشدن ذرات پیش آنزیم (زیموژن) موجود در حفره‌های ترشحی جدا شده از دیکتیوزوم‌ها می‌رسد و پس از حدود ۳ تا ۴ ساعت، یاخته از مواد نشان‌دار تخلیه می‌شود (شکل ۹-۱۳).

نقش ترشح دستگاه گلژی منحصر به یاخته‌های گابلت یا دیگر یاخته‌های ترشحی جانوری نیست. در یاخته‌های گیاهی نیز، ترشح پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌هایی که در تشکیل دیواره اسکلتی به کار گرفته می‌شوند، به وسیله دستگاه گلژی و حفره‌های گلژی به دیواره می‌رسند. تجربیات رولان[2] که با استفاده از روش تیه‌ری (در روش تیه‌ری از اثر دادن تیوکربوهیدرازید - پروتئینات نقره بر پلی‌ساکاریدها و افزایش تیرگی (کوانتراست) آنها در مشاهدات با میکروسکوپ‌های الکترونی گذاره استفاده می‌شود)، بر روی یاخته‌های کلانشیمی با دیواره‌های اسکلتی ضخیم و دارای رشد سریع انجام شد، نشان داد که نه تنها حفره‌های گلژی دارای ترکیبات پلی‌ساکاریدی هستند، بلکه هرچه این حفره‌ها به غشاء یاخته و دیواره نزدیک‌تر می‌شوند، محتویاتشان با روش تیه‌ری، تیره‌تر می‌شوند که نشانه‌ای از

1- Cajal 2- Roland Thiery



شکل ۹-۱۳. به کارگیری اسیدهای امینه نشاندار و روش خودپرتونگاری در یاخته‌های گابلت روده‌ای. اسیدهای امینه نشاندار پس از جذب از خون و ورود به یاخته‌ها به ترتیب موجب نشاندارشدن شبکه آندوپلاسمی دانه‌دار، شبکه صاف، حفره‌های گذر، دیکتیوزوم‌ها، حفره‌های ترشحی دارای ذرات پیش آنزیم می‌شوند و در نهایت به خارج از یاخته یعنی به درون روده هدایت می‌شوند.

تحولات و به احتمال پلیمریزاسیون این مواد در حفره‌ها است. سرانجام این حفره‌های گلژی به غشاء سلولی می‌چسبند و محتویات خود را به دیواره تخلیه می‌کنند (شکل ۹-۱۴). این پلی‌ساکاریدها در ساختار بخش همی‌سلولزی و پکتیکی دیواره دخالت دارند.

شکل ۹-۱۴. تغییر حالت حفره‌ها (متراکم و تیره‌تر شدن محتوای درونی آنها) ضمن نزدیک شدن آنها به غشاء، اتصال به غشاء یاخته و تخلیه محتویات به دیواره (۴۰۰۰۰×)

علاوه بر موارد قبلی که در مورد نقش ترشحی دستگاه گلژی شرح داده شد، آنزیم‌های موجود در لیزوزوم‌ها و پراکسیزوم‌های یاخته‌های جانوری و گیاهی در یک فرآیند ترشحی تولید و ترشح می‌شوند.

با عمومیت‌دادن ترشح یاخته‌ای، می‌توان گفت که چنین فعالیتی در یاخته‌های پروکاریوتی نیز دیده می‌شود و موجبی برای تشکیل دیوارهٔ یاخته‌ای باکتری‌ها و ترشح آنزیم‌های متفاوت در محیط به وسیله آنها است. در برخی تک یاختگان، واکوئل‌هایی مشابه با دستگاه گلژی وجود دارند و با انقباض خود، آب را به خارج از سلول می‌رانند.

چرخهٔ ترشحی - پیوسته یا ناپیوسته

ترشح تغییرات ممتدی را ایجاب می‌کند که می‌توان آن را با بررسی مراحل مختلف، فعالیت یاخته‌ای مشخص کرد. در برخی یاخته‌های ترشحی،

ترشح پیوسته است و ماده ترشحی به تدریج که ساخته می‌شود، آزاد می‌گردد. در این یاخته‌ها، تمام مراحل فرآیند ترشح به‌طور همزمان انجام می‌شود. برای مثال در ترشح گلیکوپروتئین‌ها به وسیلهٔ یاخته‌های کبدی و یا ترشح پادتن‌ها به وسیله یاخته‌های پلاسمایی (شکل ۹-۱۵)، مواد ترشحی در ذرات ویژه‌ای انباشته نمی‌شوند و آزاد شدن مواد ترشحی کم‌وبیش با تولید و انتقال درون یاخته‌ای آنها همراه است.

در یاخته‌های دیگر، سیر ترشحی ناپیوسته است و بنا به یک ترتیب ویژه، به نحوی انجام می‌شود که مواد ترشحی پس از تولید، در ذرّات انباشته‌کننده، ذخیره می‌شوند و سپس به فضای بیرون سلولی. آزاد می‌گردند (شکل ۹-۱۶). در این یاخته‌ها، سیمای یاخته شناختیِ سیر ترشحی بسیار متنوع است. این سیر ترشحی، اغلب با تولید و سپس انباشته‌شدن مواد ترشحی تا آن حدّ که با میکروسکوپ قابل مشاهده شوند، همراه است و بعد نوبت به خارج‌کردن این مواد از یاخته می‌رسد. این مواد ترشحی می‌توانند ذراتی متراکم با ضریب شکست زیاد، واکوئل‌ها، قطرات مواد ترشحی و نظایر آنها باشند که در یاخته، جایگاه مشخصی دارند و به حسب زمان، واکنش‌های شیمیایی ویژه‌ای نشان می‌دهند. ذرات متراکم دارای آنزیم‌ها که، اغلب به حالت غیرفعال (پیش آنزیم) هستند را به‌طور معمول ذرات زیموژن نامند (شکل ۹-۱۶، A).

شکل ۹-۱۵. ریزنگار الکترونی از یک یاختهٔ پلاسمایی. در مجاورت هسته (N)، دستگاه گلژی (G) متشکل از تعدادی دیکتیوزوم که هر یک دارای تعدادی کیسه‌های گسترده غشایی و تعدادی حفره‌های کوچک و بزرگ هستند، دیده می‌شود. بسیاری از حفره‌های درشت (پیکان‌ها) از موادی پر شده‌اند. اطراف دستگاه گلژی را شبکه آندوپلاسمی دانه‌دار (reg) با کیسه‌هایی پُر از مواد بی‌شکل (پیکان‌ها)، احاطه کرده است. mi، میتوکندری‌ها؛ En پوشش هسته‌ای؛ ri، ریبوزوم‌ها. درشت‌نمایی ۴۸۰۰۰ برابر. بخش درون مربع، ۱۰۰۰۰۰ برابر (برگرفته از De Robertis و Iraldi).

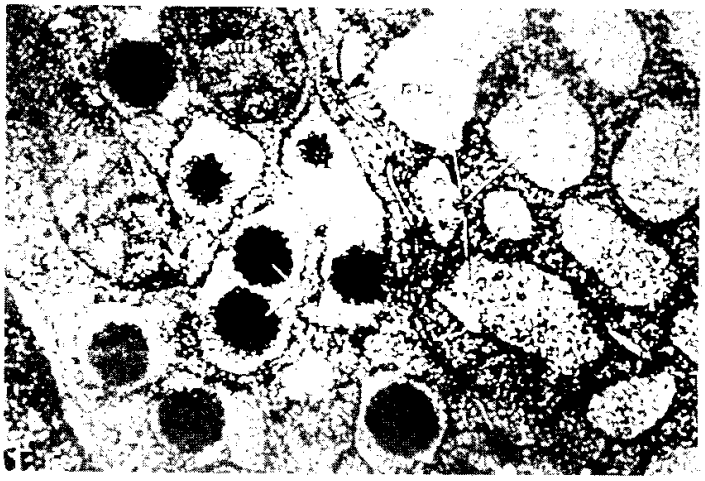
فرآیند ترشح در لوزالمعده - شش مرحله پیاپی

در یک یاخته غده‌ای برون ریز، مثل یاخته لوزالمعده که، فرآیند ترشح آن موضوع بررسی‌های علمی زیاد بوده است، شش مرحله که با دخالت سیستم غشایی درون یاخته‌ای انجام می‌شود، تشخیص داده می‌شود (شکل ۹-۱۷).

مرحله ۱ یا مرحله ریبوزومی. مرحله آغازی است که ضمن آن با دخالت پلی‌ریبوزوم‌های چسبیده به سطح غشاء

شبکه آندوپلاسمی خشن، پروتئین‌ها ساخته می‌شوند. همان گونه که در فصل قبل دیده‌ایم، این مرحله در سیتوزول و به وسیله ریبوزوم‌های آزاد شروع می‌شود و سپس با کمک پپتید نشانه، اتصال ریبوزوم به غشاء شبکه آندوپلاسمی در جایگاه‌های اختصاصی صورت می‌گیرد.

مرحله ۲ یا مرحله کیسه‌ای. این مرحله با نفوذ شعاعیِ (عرضی یا بُرداری) پروتئین‌های ساخته شده به درون کیسه‌های شبکه آندوپلاسمی تطبیق می‌کند. این مرحله را نیز در فصل قبل بررسی کرده‌ایم. دخالت پپتید نشانه، گیرنده‌های ویژه آن در سطح غشاء شبکه خشن، باز شدن مجرای عبور از نواحی اختصاصی پروتئینی و نفوذ زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی در حال تشکیل به درون شبکه. در اغلب موارد، ماده پروتئینی حالتی شبیه محلول آبکی از ماکرومولکول‌ها را دارد و در برخی شرایط، به نظر می‌رسد که در ذرات کوچکی در درون شبکه قرار گرفته باشد (شکل ۱۶-۹، B).



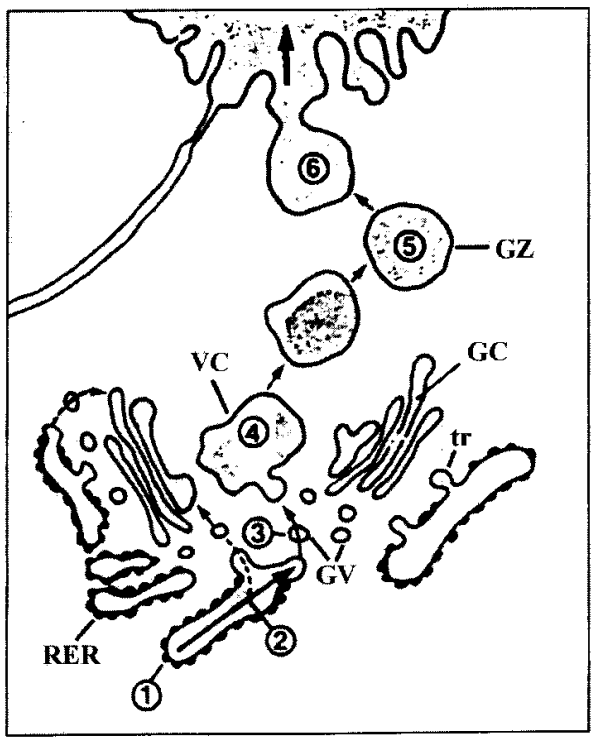
شکل ۹-۱۶. ناحیه رأسی از یک یاخته آسینی لوزالمعدهٔ خوکچهٔ هندی که، ذرات آنزیم‌ساز یا زیموژن (Z) را نشان می‌دهد. یکی از ذرات، به دنبال ادغام غشایی و ضمن دفع یاخته‌ای به فضای بیرون یاخته‌ای نفوذ کرده است. re، شبکه آندوپلاسمی خشن؛ mp، غشاء یاخته‌ای. ۳۰۰۰۰× (برگرفته از پژوهش‌های G.E.Palade). B - ناحیه قاعده‌ای همان یاخته که حفره‌های وسیعی از شبکه آندوپلاسمی (re) را نشان می‌دهد. برخی از این حفره‌ها دارای ذرات درونی (gi) هستند؛ mi، میتوکندری؛ mp، غشاء یاخته‌ای. ۳۰۰۰۰× (برگرفته از پژوهش‌های D.Zambrano).

مرحله ۳ یا مرحلهٔ انتقال درون یاخته‌ای. در این مرحله پروتئین‌های ترشحی از شبکه آندوپلاسمی خشن به‌طور مستقیم یا پس از گذر از شبکه آندوپلاسمی صاف وارد حفره‌های گذری می‌شوند که از جوانه‌زدن کیسه‌های شبکه آندوپلاسمی به وجود می‌آیند و در فضای بین شبکه و دیکتیوزوم‌ها قرار می‌گیرند. این حفره‌ها در نهایت با کناره‌های حجیم کیسه‌های دیکتیوزومی، به ویژه در سطح بلوغ دیکتیوزوم‌ها ادغام می‌شوند. پروتئین‌های ترشحی پس از گذر از دیکتیوزوم‌ها و تغییرات لازم، به تدریج در ذرات پیش‌زیموژن و یا واکوئل‌های غلیظ‌کننده‌ای به وسیله یک غشاء احاطه شده‌اند، جمع می‌شوند. پس از مدتی به نسبت طولانی (حدود ۱ تا ۳ ساعت) این پروتئین‌ها در ذرات زیموژن یافت می‌شوند و همراه آنها به سوی غشاء یاخته مهاجرت می‌کنند و در نهایت به فضای بیرون یاخته‌ای ترشح می‌شوند. همان گونه که دیده‌ایم این مراحل را کاجال در تجربیات جالب خود با استفاده از لوسین‌تریسیوم‌دار و فن خودپرتونگاری در یاخته‌های گابلت (یاخته‌های جامی موکوسی) نیز نشان داده است.

نتایج بررسی‌های انجام شده به کمک اسیدهای امینه نشان‌دار از جمله لوسین‌تریسیوم‌دار در مجموع نشان داده

است که پس از ورود این ماده به یاخته ترشحی، به ترتیب: شبکه آندوپلاسمی خشن، دیکتیوزوم‌ها، ذرات نابالغ (واکوئل‌های غلیظ‌کننده و پیش زیموژن)، ذرات بالغ (زیموژن) نشان‌دار می‌شوند. در موش صحرایی مدت زمان کلی بقای یک ذره زیموژن حدود ۵۲/۴ دقیقه است.

ضمن ترشح، انتقال پروتئین از شبکه آندوپلاسمی تا دستگاه گلژی تقریباً در تمام یاخته‌های سازندهٔ پروتئین‌های ترشحی از جمله یاخته‌های تیروئید، پاراتیروئید و نظایر آنها که با روش خودپرتونگاری بررسی شده‌اند، یکسان است.



شکل ۹-۱۷. نمای نشان دهنده مراحل مختلف تولید و ترشح پروتئین‌های ترشحی در یک یاخته ترشحی مراحل شش‌گانه ترشح در متن آمده است. RER، شبکه آندوپلاسمی خشن؛ tr، جوانه‌هایی که به حفره‌های گذر تبدیل می‌شوند؛ Gc، کیسه‌های دیکتیوزومی؛ Vc، واکوئل‌های غلیظ‌کننده؛ Gz، ذرات زیموژن. (برگرفته از پژوهش‌های J,D Jamieson و G.E.Palade، ۱۹۷۷).

از آنجا که انتقال درون یاخته‌ای در خلاف شیب (میزان) غلظت انجام می‌شود، جالب است نیازهای متابولیکی آن مشخص گردد. انتقال یک زنجیر پلی‌پپتیدی تازه تشکیل شده از ریبوزوم به درون شبکه آندوپلاسمی، نیاز به انرژی ندارد و به نظر می‌رسد به وسیله ارتباط ساختمان جزء بزرگ ریبوزوم با غشاء شبکه آندوپلاسمی کنترل شود. وقتی در یاخته‌های لوزالمعده و سلول‌های عصبی ترشح‌کننده، ساخت پروتئین‌ها به وسیلهٔ پورومیسین متوقف گردد، پپتیدهای کامل نشده به درون شبکه آندوپلاسمی انتقال می‌یابند. بررسی مشابهی اما با سیکلوهگزیمید که باز دارنده دیگر ساخت پروتئین است، نشان داده است که، انتقال درون یاخته‌ای به ساخت پروتئین‌های ترشحی وابسته نیست و حتی وقتی هم که چنین پروتئین‌هایی تولید نمی‌شوند می‌تواند انجام شود.

انتقال از شبکه آندوپلاسمی به سوی واکوئل غلیظ‌کننده، با به کارگیری باز دارنده‌های تنفس یاخته‌ای (ازت، سیانور آنتی‌میسین A)، یا فسفوریلاسیون اُکسایشی (دی‌نیتروفنل، اولیگومیسین)، متوقف می‌شود. تفسیر جالبی که از این بررسی‌ها ایجاد شده این است که در اطراف دستگاه گلژی، در عوامل انتقال‌دهنده‌ای که بین شبکه آندوپلاسمی تا حفره‌های کوچک دستگاه گلژی یافت می‌شوند، نوعی کنترلِ انتقال وجود دارد که وابسته به انرژی است. چنین کنترلی، پخش پروتئین‌های ترشحی را تنظیم می‌کند. به‌طور خلاصه، انتقال درون یاخته‌ای در نبود تولید ATP متوقف می‌شود. انرژی ممکن است برای شکافتن غشایی و ادغامی باشد که هنگام تشکیل حفره‌های ناقل از عناصر گذر و نیز ادغام این حفره‌ها با واکوئل‌های غلیظ‌کننده مورد نیاز است (نظر Jamieson و Palade، ۱۹۷۷).

مرحله ۴ یا تغلیظ پروتئین‌های ترشحی. در این مرحله، محتویات واکوئل‌های غلیظ‌کننده، غلیظ‌تر می‌شوند، این واکوئل‌ها برای تبدیل به ذرات زیموژن، به‌تدریج پُر می‌شوند و در نهایت به‌صورت توده‌های کدر (متراکم) نسبت به الکترون‌ها در می‌آیند. این تغییر و تبدیل نیاز به انرژی متابولیکی ندارد زیرا با توقف گلیکولیز یا تنفس، ادامه می‌یابد. به‌علاوه غشاءِ ذرات زیموژن، پمپ آت‌پ‌آز وابسته به K^+، Na^+ را که برای انتقال فعال لازم است، ندارد.

این آگاهی‌ها هیچ‌گونه توضیحی را در مورد چگونگی غلیظ شدن پروتئین‌های ترشحی به‌دست نمی‌دهند. در عین حال، تداخل سولفات دارای ^{35}S در اجزای دستگاه گلژی و ذرات زیموژن امکان توضیح احتمالی چگونگی این غلیظ شدن را فراهم ساخته است. حضور یک پپتید و گلیکان سولفات‌دار در دستگاه گلژی و واکوئل‌های غلیظ‌کننده به اثبات رسیده است که به‌صورت یک پُلی‌آنیونِ درشت، با پروتئین‌های بازی ترشحی وارد عمل می‌شود. هم‌اکنون تصور می‌شود که تشکیل توده‌های غیرفعال اسمزی، عبور غیرفعال آب از حفره‌های ترشحی به سیتوزولی را که نسبت به آنها فشار اسمزی بیشتری دارد، امکان‌پذیر می‌سازد.

مرحله ۵ یا انباشتن درون یاخته‌ای. مرحله قبل با انباشته شدن مواد ترشحی در ذرات ترشحی‌ای پایان می‌یابد که با تأثیر یک محرک مناسب (هورمون یا میانجی‌گر عصبی «نوروترانسمیتر») به یاخته، آزاد می‌شوند. این ذخیره‌سازی موجب می‌شود که یاخته بتواند نیاز خود به مواد ترشحی را هنگامی که این نیاز بیش از میزان تولید باشد، برآورده سازد. پدیده ذخیره‌سازی منحصر به یاخته‌های ترشحی نیست، یاخته‌های دیگری هم که مولکول‌های کوچک‌تری مثل پپتیدها و آمین‌ها را تولید می‌کنند، این توانایی را دارند. برای مثال ذرات حامل کاتکول آمین در یاخته‌های بخش مرکزی غدد فوق کلیوی دارای پروتئین‌های زیاد (ذرات رنگین) و ATP هستند که به کمک آنها، آمین‌ها تشکیل مجموعه‌هایی را می‌دهند.

مرحله ۶ یا دفع سلولی (اگزوسیتوز). تخلیهٔ ذرات ترشحی ضمن پدیدهٔ دفع یاخته‌ای است که با جابه‌جایی ذرات ترشحی به سوی ناحیه انتهایی (رأسی) یاخته و ادغام غشاء این ذرات با غشاء یاخته‌ای همراه است. به دنبال این ادغام و سپس شکافتگی غشایی که با حذف لایه‌های سطحی همراه است، سوراخی ایجاد می‌شود که از راه آن مواد ترشحی تخلیه می‌شوند (شکل ۱۶-۹، A). از دیدگاه بیوشیمیایی، دفع یاخته‌ای نیاز به افزایش Ca^{2+} درون یاخته‌ای و تولید ATP دارد. بنابراین دفع یاخته‌ای نیاز به انرژی دارد و دومین مرحله‌ای است که در مجموعِ جریانِ ترشح مواد، نیازمند انرژی است. تصور می‌شود بخشی از این انرژی برای ادغام و شکافتگی غشایی باشد که ضمن دفع یاخته‌ای صورت می‌گیرد. همچنین ممکن است انرژی هنگام پیشروی ذرات ترشحی به سوی انتهای یاخته مصرف شود.

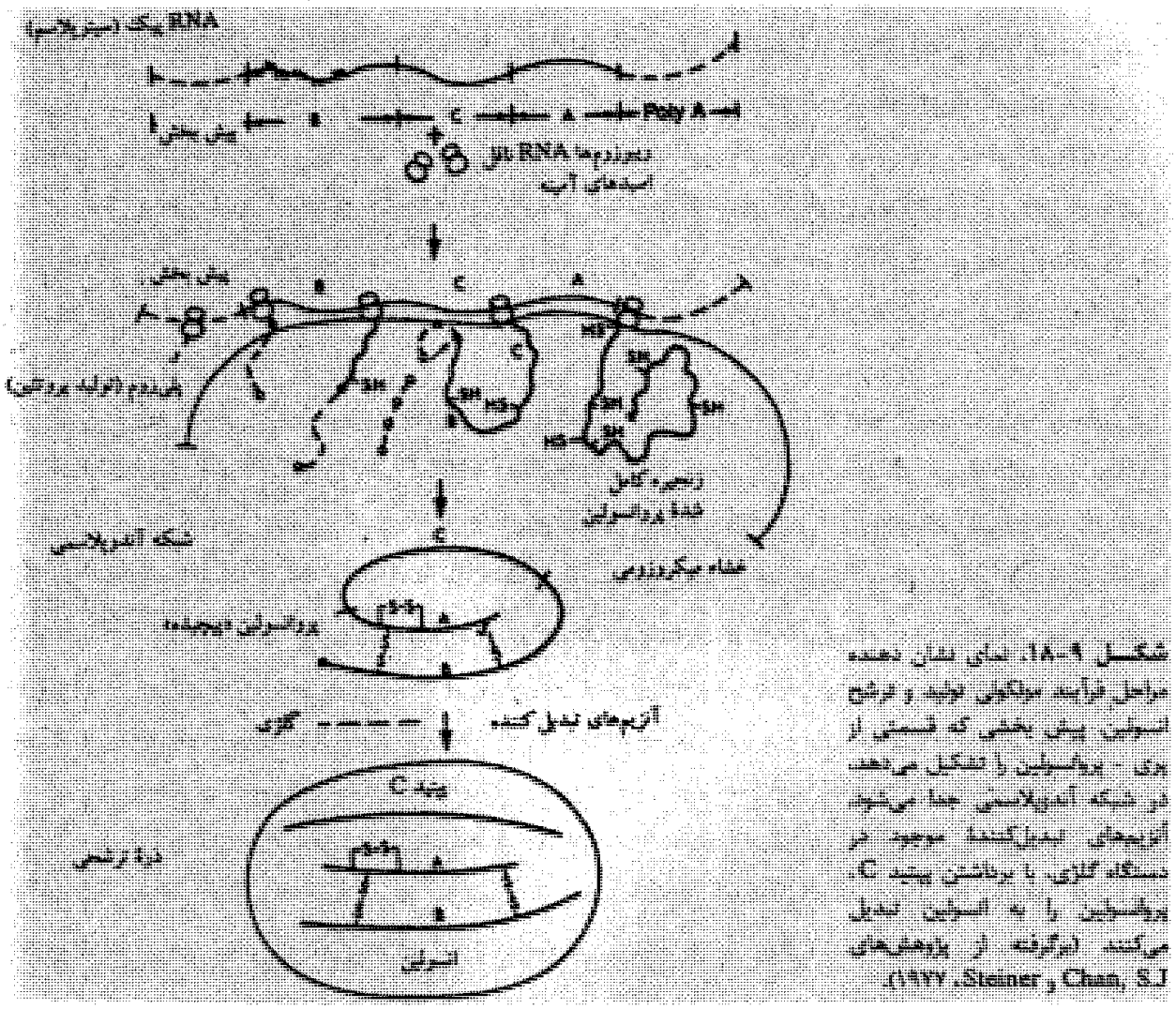
در یک یاخته لوزالمعده‌ای که در آن ساخت پروتئین‌ها مهار (متوقف) شده باشد، برای پروتئین‌های ترشحی که قبل از مهار تولید شده‌اند مراحل: انتقال، غلیظ شدن، انباشته شدن و آزاد شدن، انجام می‌شود. در طول مدت این مراحل که حدود ۶۰ تا ۹۰ دقیقه است، پروتئین‌های جدید غشایی که به‌عنوان بخش‌هایی از ساختار غشاءهای ذخیره‌کنندهٔ مواد ترشحی به کارگرفته می‌شوند، تولید نمی‌گردند. به بیان دیگر، غشاءهای درون یاخته‌ای، نیمه‌عمر بسیار طولانی دارند و به احتمال هنگام فرآیندهای ترشحی دوباره (ازنو) مورد استفاده قرار می‌گیرند.

غشاء ذرات زیموژن را می‌توان همانند واکوئلی در نظر گرفت که پیوسته بین دستگاه گلژی و سطح یاخته در رفت و برگشت است.

چگونگی برداشته شدن قطعات غشایی از ناحیه انتهایی یاخته هنوز ناشناخته است. تصور می‌شود که قسمت‌هایی از غشاء به درون برگشتگی پیدا می‌کنند و به‌صورت حفره‌های کوچکی از آن جدا می‌شوند که به درون یاخته و به سوی دستگاه گلژی برمی‌گردند تا در آنجا، برای در برگرفتن مواد ترشحی، دوباره مورد استفاده قرار گیرند. بنابراین فرآیند دفع یاخته‌ای (اگزوسیتوز) با سیر بخش‌های غشایی به درون یاخته (آندوسیتوز؟) همراه است. افزایش تعداد و ابعاد دیکتیوزوم‌ها، به دنبال تحریک لوزالمعده در شرایط آزمایشگاهی به وسیله کاربامیل‌کولین، این فرضیه را تأیید می‌کند. این افزایش حتی وقتی که تولید پروتئین‌ها تقریباً به‌طور کامل به وسیلهٔ سیکلوهگزیمید مهار شده باشد، دیده می‌شود.

بررسی‌های انجام شده نشان داده‌اند که «5AMP´ − 3´» می‌تواند در فرآیند دفع یاخته‌ای دخالت کند. تولید و ترشح انسولین، مثال خوبی از فرآیند مولکولی ترشح است.

در فصل ۸ در مورد چگونگی تولید، بلوغ و ترشح پروتئین‌های ترشحی از جمله انسولین مطالبی مورد بحث قرار گرفت (فصل ۸، صفحات ۸ تا ۱۱)، در اینجا به منظور توجه به نقش دستگاه گلژی در پدیدهٔ ترشح، مراحل تدریجی تولید و ترشح انسولین را به کمک طرح ساده‌ای (شکل ۹-۱۸) مورد بازبینی قرار می‌دهیم.



شکل ۹-۱۸. نمای نشان دهنده مراحل فرآیند مولکولی تولید و ترشح انسولین. پیش بخشی که قسمتی از پری - پروانسولین را تشکیل می‌دهد در شبکه آندوپلاسمی جدا می‌شود. آنزیمهای تبدیل‌کننده موجود در دستگاه گلژی، با برداشتن پپتید C، پروانسولین را به انسولین تبدیل می‌کنند. (برگرفته از پژوهش‌های Chan, S.J و Steiner، ۱۹۷۷).

۶- دخالت در سازمان‌دهی برخی اندامک‌ها و اجزای یاخته‌ای

یکی از نقش‌های زیستی مهم دستگاه گلژی، دخالتش در سازمان دادن برخی اجزای یاخته‌ای است که برای مثال به موارد زیر اشاره می‌شود:

الف - تشکیل لیزوزوم‌ها. همان‌گونه که در صفحات قبل شرح داده شد، از جوانه‌زدن کناره کیسه‌های دیکتیوزومی به ویژه از منطقهٔ میانی و سطح دور آن، حفره‌های گلژی زیادی جدا می‌شوند (با غشاء عادی یا پوشیده از کلاترین و یا پروتئین‌های دیگر)؛ حفره‌هایی که دارای هیدرولازهای زیاد، به‌صورت محلول و یا جای گرفته در غشاءشان باشند را لیزوزوم اولیه می‌نامند که در واقع حفره‌های گلژی سرشار از آنزیم‌های هیدرولازیی هستند که، هنوز فعالیت آنزیمی خود را آغاز نکرده‌اند. به ترتیبی که خواهیم دید از اتصال و ادغام لیزوزوم‌های اولیه با حفره‌های ریزه‌خواری (فاگوسیتوزی) یا قطره‌خواری (پینوسیتوزی)، شرایط و امکانات عمل برای آنزیم‌های هیدرولازی

موجود در لیزوزوم‌های اولیه فراهم می‌شود و با آغاز به کار آنها، لیزوزوم‌های ثانویه ایجاد می‌شوند. بنابراین دیکتیوزوم‌ها در تشکیل لیزوزوم‌ها سهم قابل توجهی دارند. از آنجا که پروتئین‌های ساختمانی غشاء لیزوزوم‌ها، و یا پروتئین‌های آنزیمی موجود در این اندامک‌ها با دخالت شبکه آندوپلاسمی خشن تولید می‌شوند و شبکه آندوپلاسمی صاف نیز در ساخت لیپیدهای غشایی از جمله لیپیدهای غشاءهای لیزوزومی دخالت دارد، بنابراین تشکیل بسیاری از لیزوزوم‌ها در واقع یکی از نتایج اشتراک عمل شبکه آندوپلاسمی (خشن و صاف) و دستگاه گلژی است.

ب - ***تشکیل و گسترش غشاء یاخته‌ای.*** تاکنون دیده‌ایم (جلد ۱، فصل ۶، صفحه ۴۱۰ و ۴۱۱) که، در یاخته‌های گیاهی، هنگام تشکیل دیوارهٔ اسکلتی، از تحولات و جایگزینی ویژه عده‌ای از حفره‌های گلژی، فراگموزوم‌ها تشکیل می‌شوند. ضمن اتصال و ادغام فراگموزوم‌ها برای تشکیل تیغه میانی، غشاء آنها نیز اتصال و اشتراک یافته و بخش‌های جدید غشایی را برای هر یک از دو یاختهٔ حاصل از تقسیم، ایجاد می‌کنند (شکل ۵۵-۶ را نیز ببینید).

از سوی دیگر هنگام ترشح و یا دفع یاخته‌ای، حفره‌های ترشحی و حفره‌های اگزوسیتوزی به غشاء یاخته‌ای می‌چسبند و پس از شکافتگی غشایی، غشاء تعدادی از این حفره‌ها (آنهایی که به‌طور کامل از یاخته خارج نگردند)، با غشاء یاخته‌ای ادغام می‌شوند و موجب گسترش آن می‌گردند. تجربیات مختلف از جمله استفاده از تأثیر اسیدفسفوتنگستیک نشان داده است که جابه‌جایی حفره‌های ترشحی یا دفعی می‌تواند با تغییراتی در ترکیب شیمیایی غشاء این حفره‌ها همراه باشد، تغییراتی که آنها را برای اتصال و اشتراک با غشاء یاخته سازگار می‌کند؛ غشاء یاخته با اسیدفسفوتنگستیک واکنش دارد و به اصطلاح APT (اسیدفسفوتنگستیک) مثبت است، در حالی که غشاء بسیاری از حفره‌های ترشحی یا دفعی با این اسید واکنش و افزایش کدورت نوری یا الکترونی (افزایش کونتراست) ندارد و به اصطلاح APT منفی است. بررسی‌های انجام شده بر روی حفره‌های ترشحی یا دفعی نشان داده است که، به‌تدریج که این حفره‌ها به غشاء یاخته نزدیک می‌شوند، تغییر حالت می‌دهند و همانند غشاء یاخته، APT مثبت می‌گردند، سپس به غشاء متصل می‌شوند و با آن ادغام می‌گردند.

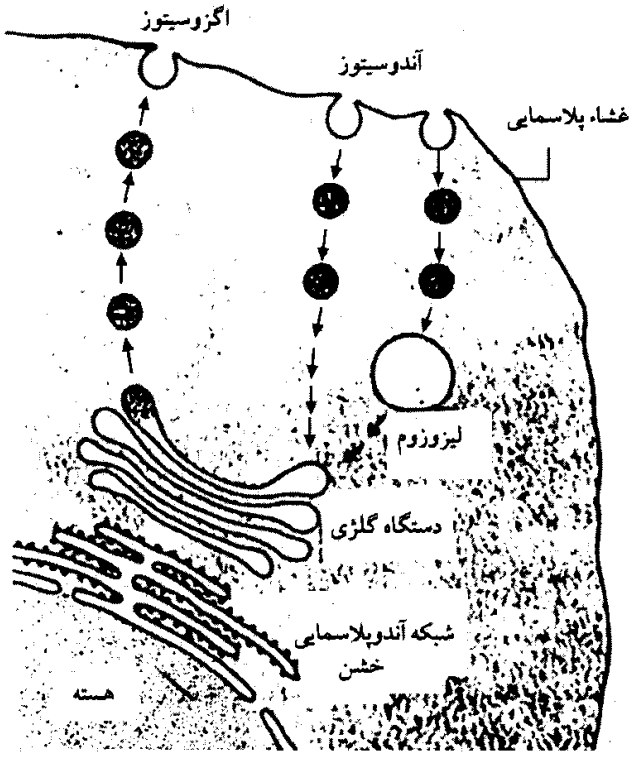
به‌طور کلی اتصال حفره‌های دفعی و ترشحی به غشاء یاخته‌ای به منظور بیرون ریختن محتویاتشان به بیرون یاخته، با گسترش سطح غشاء همراه است. از سویی ضمن آندوسیتوز بخش‌هایی از غشاء به درون یاخته کشیده می‌شود. با وجود همه این تغییرات دائمی، به‌طور معمول سطح غشاء تغییرات اندکی دارد؛ حالت شبه چرخه‌ای قطعات و عناصر غشایی دلیل این مطلب است، برخی بخش‌های غشایی به درون کشیده شده، دوباره به سطح باز می‌گردند و برخی بخش‌های اضافه شده، دوباره، ضمن آندوسیتوز به درون کشیده می‌شوند. دستگاه گلژی در بازیابی پروتئین‌های غشایی که ضمن آندوسیتوز به سیتوزول می‌رسند نیز نقش مهمی دارد. برای مثال غشاء یاخته‌های تیروئید را می‌توان با فرّیتین نشان‌دار کرد و سپس با افزودن تیروتروپین به محیط کشت یاخته‌ها، آندوسیتوز را القاء نمود. با شروع آندوسیتوز، فرّیتین در آندوزوم‌ها و سپس لیزوزوم‌ها پدیدار می‌شود و پس از حدود ۳۰ دقیقه در کیسه‌های دیکیتوزومی نیز قابل تشخیص می‌گردد. بنابراین عناصر غشایی که پس از آندوستیوز به دیکتیوزوم‌ها می‌رسند، می‌توانند با پردازش مجدد و بازیابی، در فرآیندهایی مثل تشکیل لیزوزوم‌ها، ترشح و گسترش یا تجدید غشاء یاخته مورد استفاده قرار گیرند. خلاصه این مسیرها در شکل ۹-۱۹ نشان داده شده است.

۷- دخالت در تشکیل، رشد طولی و افزایش ضخامت دیواره اسکلتی

دستگاه گلژی با تشکیل فراگموزوم‌ها در مرحله متافاز، در یاخته‌های گیاهی موجب تشکیل تیغه میانی بین دو

یاخته می‌شود که اولین بخش دیواره اسکلتی است (شکل ۹-۲۰ الف و ب). (شرح مطلب در صفحه ۲۴۷ و ۲۴۸ فصل ۶ نیز آمده است)؛ همچنین در مراحل رشد طولی یاخته و نیز پس از آن، تا زمانی که دیواره اسکلتی یاخته‌ضخیم می‌شود، حفره‌های گلژی با انتقال مواد دیواره‌ای یا پیش‌سازهای آنها به دیواره اسکلتی امکان گسترش طولی و افزایش ضخامت آن را فراهم می‌سازند (مراجعه به جلد ۱، فصل ۶، بخش دیواره اسکلتی).

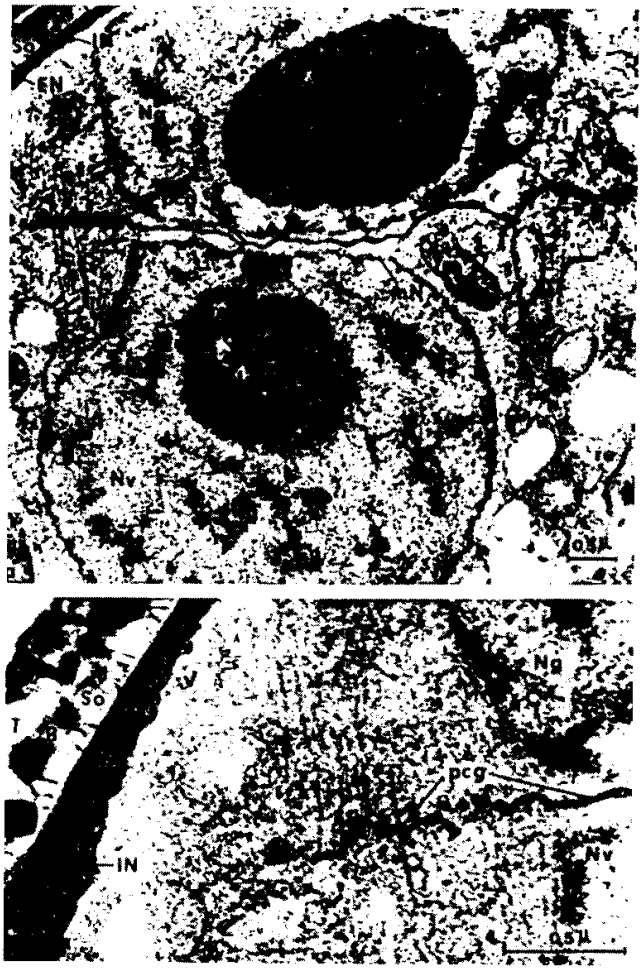
از آنجا که دیکتیوزوم‌ها با تشکیل فراگموزوم‌ها، در ایجاد تیغه میانی بین دو یاخته جدید و تقسیم سیتوپلاسم دخالت می‌کنند، این عمل را به‌عنوان نقش دستگاه گلژی در تقسیم یاخته‌ای نیز مطرح می‌کنند.



شکل ۹-۱۹. نقش دستگاه گلژی در چرخهٔ غشاء یاخته و بازیابی عناصر غشایی

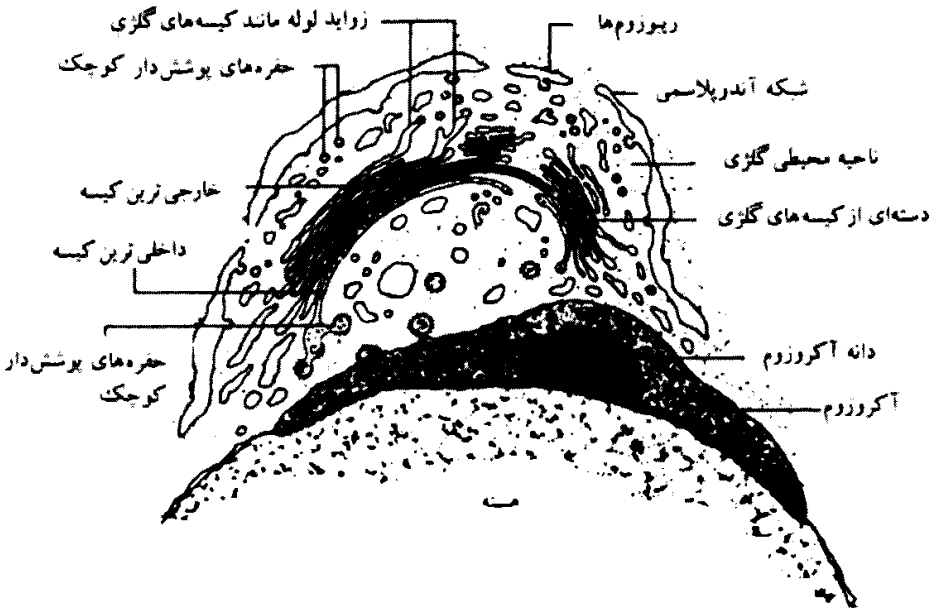
۸- تشکیل آکروزوم و دخالت در لقاح

یکی از اندامک‌هایی که با دخالت دستگاه گلژی تشکیل می‌شود، آکروزوم است. آکروزوم اندامکی است که در بخش جلویی سر اسپرماتوزوئید اکثر جانوران، در مجاورت هسته قرار دارد. هنگام تشکیل آکروزوم یک ذرهٔ متراکم پروتئینی در مجاورت هسته پدیدار می‌شود که، گاهی آن را پیش آکروزوم می‌نامند، سپس دیکتیوزوم‌ها، در مجاورت این ذره جمع می‌شوند (گاهی مجموعهٔ ذرّه متراکم و دیکتیوزوم‌های متراکم شدهٔ اطراف آن را بر روی هم پیش آکروزوم



شکل ۹-۲۰. a) تجمع فراگموزوم‌ها (Pcg) در استوای دوک تقسیم سیتوپلاسم (f) هنگام تقسیم میتوزی در دانه گرده. Ng، هسته زایشی؛ Nv، هسته رویشی؛ iN، انتین؛ v، حفره گلژی؛ EN اگزین درونی، So، B و T سه بخش سازنده اگزین بیرونی هستند. b) به‌هم پیوستن تدریجی فراگموزوم‌ها به روش گریز از مرکز و تشکیل صفحه سلولی و سپس تیغه میانی بین دو یاخته رویشی و زایشی دانه گرده. nu هستک؛ mN، پوشش هسته‌ای؛ m، میتوکندری؛ re، شبکه آندوپلاسمی. برگرفته از پژوهش‌های F.Roland، ۱۹۷۱).

نامند)، حفره‌های گلژی آزاد شده از دیکتیوزوم‌ها به سوی آکروزوم در حال تشکیل مهاجرت می‌کنند و در تشکیل این اندامک شرکت می‌نمایند (شکل ۲۱-۹).



شکل ۹-۲۱. تشکیل آکروزوم با مشارکت دستگاه گلژی، هنگام تکوین اسپرماتوزوئید. حفره‌هایی که در تشکیل آکروزوم دخالت می‌کنند، اساساً از سطح دور (ترانس) دیکتیوزوم‌ها منشاء می‌گیرند.

آکروزوم دارای آنزیم‌های هیدرولازی زیاد است و به همین دلیل برخی آن را یک لیزوزوم غول‌پیکر می‌دانند. از فراوان‌ترین هیدرولازهای شناخته شده در آکروزوم، هیالورونیداز[1] است که عامل تخریب لایه‌های محافظ تخمک و فراهم ساختن امکان لقاح است. بخشی از غشاء آکروزوم نیز در شناسایی و اتصال اسپرماتوزوئید به سطح تخمک برای لقاح نقش دارد.

به‌تدریج که آکروزوم رشد می‌کند، دستگاه گلژی کاهش می‌یابد و در بسیاری از اسپرماتوزوئیدهای بالغ، دستگاه گلژی ناپدید می‌گردد. غشاء بیرونی آکروزوم با غشاء رأس یاخته اسپرمی ادغام می‌شود؛ در اسپرماتوزوئید موش این ناحیه از غشاء یاخته‌ای دارای بخش‌هایی است که با کانکاناوالینِ‌آ (نوعی لکتین) متصل می‌شوند. افزایش گلیکوپروتئین‌ها در این بخش از غشاء را نشانهٔ منشأ گرفتن آن از دستگاه گلژی می‌دانند.

۹- ترشح موسیلاژها

یکی از مواد ترشحی که به مقدار زیاد با دخالت دستگاه گلژی فراهم و ترشح می‌شود، موسیلاژها با زیر بنای پلی‌ساکاریدهای اسیدی هستند. این مواد در یاخته‌های مختلف به ویژه یاخته‌های گیاهی و از جمله یاخته‌های کلاهک ریشه فراوان هستند. تغییر خواص فیزیکی خاک برای امکان رشد نوک ریشه در خاک با تولید حالت ژلی پایدار، پناه دادن انواع میکروارگانیسم‌های مفیدی که با یاخته‌های کلاهک ریشه سازگار شده‌اند و نیز پشتیبانی نوک ریشه در برابر عوامل بیماریزا به عهدهٔ این موسیلاژها است.

هر یاخته کلاهک ریشه ممکن است صدها دیکتیوزوم داشته باشد که در سیتوزول، همانند مجموعه‌ای هماهنگ عمل می‌کنند. کلاهک ریشه هر روز ممکن است صدها تا هزاران یاخته در حال ترشح را بیرون بریزد (در ذرّت این تعداد به حدود ۱۲۰۰۰ می‌رسد و هر گیاه صدها نوک ریشه‌ای و کلاهک دارد). وقتی «لعاب» در خاک، آب جذب می‌کند، حجمش چندین برابر می‌شود. از دیدگاه یاخته‌شناسی، یاخته‌های کلاهک ذرّت در حدود ۵ میلیون

1- Hyaluronidase

دیکتیوزوم دارند و در هر دقیقه ۲ میلیون حفره گلژی تشکیل می‌دهند؛ وقتی این حفره‌ها با غشاء یاخته ادغام می‌شوند و محتویات خود را ترشح می‌کنند، سطح غشاء یاخته‌ای را در هر دقیقه تا ۱۰ درصد افزایش می‌دهند.

۱۰- دخالت در تولید و ترشح پولک‌ها و پوشش سیلیسی سطح جلبک‌ها

در شاخه‌های مختلف جلبک‌ها به ویژه کریزوفیتانشان داده شده که دیکتیوزوم‌ها در تولید، فراهم‌آوری و ترشح ترکیبات گلوسیدی و یا ترکیبات سیلیسی که برای تشکیل بخش‌های پولک مانند یا پوشش سیلیسی سطح این جلبک‌ها لازم هستند، دخالت دارند.

خلاصه - (اعمال دستگاه گلژی)

دستگاه گلژی را می‌توان همانند واسطه‌ای بینابین شبکه آندوپلاسمی و فضای بیرون یاخته‌ای در نظر گرفت که از آن مواد به‌طور دائم جریان می‌یابند (برای مثال، مواد مایع، ماکرومولکول‌ها، واحدهای دیواره‌های یاخته‌ای و نظایر آنها). این جریان در برگیرنده سیر غشایی، تمایز غشاءها و باز یافت سریع آنها نیز می‌باشد (۲۰ تا ۴۰ دقیقه برای دیکتیوزوم‌های کبد).

یکی از اعمال اصلی دستگاه گلژی قنددار کردن (گلیکوزیلاسیون) لیپیدها و پروتئین‌ها برای تولید گلیکوپروتئین‌ها است. زنجیره‌های گلوسیدی به صورتی منظم و دارای ترتیب، به وسیله ترانسفرازها انتقال داده می‌شوند. در مورد گلیکوپروتئین‌ها، پس از آن که بخش پروتئینی در شبکه آندوپلاسمی ساخته شد اولیگوساکاریدهای مرکزی به آن افزوده می‌شوند و سپس نوبت به گروه‌های انتهایی گلوسیدی می‌رسد. گلیکوپروتیئن‌ها ممکن است ترشح شوند یا به پوشش یاخته‌ای و به لیزوزوم‌ها تداخل یابند. گلیکوزیلاسیون لیپیدها که، موجب تولید گانگلیوزیدها و گلیکوسفنگولیپیدها می‌شود، ممکن است در یاخته‌های سرطانی دستخوش اختلال گردد.

نقش اصلی دستگاه گلژی ترشح یاخته‌ای از جمله ترشح پروتئین‌های ترشحی و آنزیم‌های موجود در لیزوزوم‌ها و پراکسیزوم‌ها است. ترشح می‌تواند پیوسته یا ناپیوسته باشد. در ترشح پیوسته، مواد ترشحی بلافاصله پس از تولید و بدون آن که انباشته شوند، ترشح می‌گردند (مثل ترشح گلیکوپروتئین‌ها به وسیلهٔ یاخته‌های کبدی، پادتن‌ها به وسیله یاخته‌های پلاسمایی). ترشح ناپیوسته با انباشته شدن مواد ترشحی در ذرات ترشحی یا ذرات زیموژن همراه است (برای مثال ترشح به‌وسیلهٔ لوزالمعده غده پاروتید و نظایر آن).

شش مرحله به شرح زیر در ترشح مواد از لوزالمعده و دیگر غدد ترشح‌کنندهٔ ذرات زیموژن شناخته شده است: (۱) **مرحله ریبوزومی**، تولید پروتئین‌ها به وسیله پلی‌زوم‌های چسبیده به غشاء شبکه آندوپلاسمی خشن. (۲) **کیسه‌ای (سیسترنی)**، که همان مرحلهٔ انتقال عرضی (بُرداری) پروتئین‌ها به فضای درونی شبکه آندوپلاسمی است که بر بنای فرضیه نشانه انجام می‌شود. ماده ترشح شده ممکن است به حالت یک محلول آبکی، یا گاهی به‌صورت ذرات موجود در کیسه‌ها (سیسترن‌ها) باشد. (۳) **انتقال درون یاخته‌ای**، در این مرحله، پروتئین‌های ترشحی به درون لوله‌ها یا حفره‌هایی وارد می‌شوند که آنها را به دستگاه گلژی هدایت می‌کنند و در آنجا با **واکوئل‌های انقباضی** بزرگی که در سطح رسیدگی (بلوغ) دستگاه گلژی وجود دارند، ادغام می‌شوند. چگونگی این انتقال را می‌توان با به کارگرفتن اسیدهای امینه نشان‌دار و استفاده از فن خودپرتونگاری، یا جزءجزء کردن یاخته، ردیابی کرد. در غدهٔ پاروتید، دورهٔ کلیِ زیست یک ذره زیموژن ۵۲/۴ دقیقه محاسبه شده است. انتقال از شبکه آندوپلاسمی تا واکوئل انقباضی نیاز به مصرف انرژی (ATP) دارد. (۴) **تغلیظ مواد ترشحی**، به وسیله یک فرآیند غلیظ کننده، واکوئل انقباضی (متراکم‌کننده) به

یک ذره زیموژن تبدیل می‌شود. این تغییر حالت نیاز به انرژی ندارد و به احتمال نتیجهٔ تشکیل توده‌های غیرفعال اسمزی از پپتید و گلیکان‌های سولفاتی و از دست دادن آب به سیتوزول است. (۵) انباشتن درون یاخته‌ای، تشکیل ذرات ترشحی. (۶) دفع یاخته‌ای، تخلیه ذرات ترشحی مستلزم جابه‌جایی آنها به سوی ناحیهٔ رأسی و ادغام غشاءها (غشاء ذرّه ترشحی و غشاء یاخته) است. دفع یاخته‌ای به Ca^{+2} و انرژی (ATP) نیاز دارد. نیاز به انرژی به احتمال به فرآیندهای ادغام و تفکیک غشاءها وابسته است.

در ناحیهٔ رأسی، پدیدهٔ آزاد شدن و به کارگیری (چرخهٔ مجدد) بخش‌های غشایی برقرار است. دفع یاخته‌ای ممکن است نیاز به حضور «5AMP´ — 3´ حلقوی» داشته باشد.

دستگاه گلژی در تشکیل و گسترش غشاء یاخته، دیواره اسکلتی، تشکیل لیزوزوم‌های اولیه و آکروزوم نقش دارد. در تولید و ترشح موسیلاژها، ترکیبات دیواره‌ای (به ویژه همی‌سلولزها و پکتین‌ها) یا پیش‌سازهای آنها دخالت می‌کند؛ با تشکیل تیغه میانی و سپس دیواره اسکلتی بین دو سلول دختر، در تقسیم یاخته‌های گیاهی سهیم است و با تشکیل آکروزوم به‌طور غیرمستقیم در لقاح بسیاری از یاخته‌های جانوری دخالت دارد.

بسیاری از آنزیم‌های لیزوزومی از گلیکوپروتئین‌ها هستند که در دستگاه گلژی مراحلی از گلیکوزیلاسیون خود را گذرانیده‌اند. یکی از مثال‌های جالب در مورد تولید مولکول‌های پروتئینی ترشحی، تولید انسولین است، هورمونی که تولید آن از مراحل تشکیل پری‌پروانسولین و پروانسولین می‌گذرد.

دیکتیوزوم‌های یاخته‌های کلاهک ریشه با دخالت در تشکیل و ترشح موسیلاژها، شرایط را برای امکان رشد نوک ریشه، پایداری در برابر عوامل بیماریزا، جذب رطوبت و جلب میکروارگانیسم‌های سازگار شده با یاخته‌های نوک ریشه، مناسب می‌کنند.

دیکتیوزوم‌های جلبک‌ها از جمله جلبک‌های شاخه کریزوفیتا در تولید، فراهم‌آوری و ترشح ترکیبات گلوسیدی و با ترکیبات سیلیسیِ سازندهٔ پولک‌ها و پوشش سیلیسی سطح یاخته‌ها فعالیت زیادی دارند.

خاستگاه (منشأ) دستگاه گلژی

گرچه دیکتیوزوم‌ها در تمام یاخته‌های یوکاریوتی وجود دارند، اما ویژگی‌های آنها و تعداد حفره‌هایی که ایجاد می‌کنند، برحسب بافت‌ها و در گیاهان بیش از جانوران، متغیّر است. تعداد کیسه‌ها ممکن است تحت تأثیر عوامل سمّی کم یا زیاد شود، چنان که بر اثر «اکتینومیسین D» (ورز[1] ۱۹۶۴) و یا «اتیونین[2]» (هرمان[3] و فیتزجرالد[4]، ۱۹۶۲) کاهش می‌یابد و تحت تأثیر «۶- هیدرواوراسیل» افزایش حاصل می‌کند (هال[5] و ویتکوس[6]، ۱۹۶۴). همچنین ممکن است دیکتیوزوم‌ها بر اثر آنتی‌پیرین، با تبدیل شدن به حفره‌ها یا پخش آن کیسه‌ها به کلی خراب شوند (دیسون و بنبادیس[7]، ۱۹۶۸)؛ وقتی آنتی‌پیرین حذف شود دیکتیوزوم‌ها دوباره به سرعت تشکیل می‌شوند.

مسئله خاستگاه دیکتیوزوم‌ها هنوز مورد بحث است و در این زمینه فرضیه‌ها و نظریه‌های چندی ارائه شده است. بدیهی است که هر یاخته در شرایط عادی به‌طور معمول تعدادی از دیکتیوزوم‌های خود را از یاخته والدی به ارث برده است (جدول ۹-۳).

نظریه تشکیل کیسه (ساکول)های جدید که به دیکتیوزوم‌های قبلی افزوده می‌شوند گرچه تا حدی روشن به نظر می‌رسید و تصور می‌شد که این کیسه‌ها از الحاق حفره‌های گذری به وجود می‌آیند که از شبکهٔ آندوپلاسمی صاف و

1- Werz 2- Ethionine 3- Herman 4- Fizgerald 5- Hall
6- Witkus 7- Benbadis

جدول ۹-۳. اعمال مهم دستگاه گلژی

یاخته	بافت یا اندام	عمل گلژی
برون‌ریز (اگزوکرین)	لوزالمعده	ترشح زیموژن (پروتئازها، لیپازها، کربوهیدرازها، و نوکلئازها)
یاخته‌های غده‌ای	غده پاروتید	ترشح زیموژن
یاخته‌های جامی (گابلت)	پوششی روده	ترشح موکوس و زیموژن
یاخته‌های فولیکولی	غده تیروئید	پیش ساز تیروگلوبولین
سلول‌های پلاسما	خون	ایمنوگلوبولین‌ها
میلوسیت‌ها، گروه‌های سمپاتیک و یاخته‌های شوان	بافت عصبی	واکنش‌های سولفاسیون
یاخته‌های آندوتلیال	رگ‌های خونی	واکنش‌های سولفاسیون
یاخته‌های کبدی	کبد	ترشح لیپید (تغییر و تبدیل چربی‌ها)
یاخته‌های غدد خوشه‌ای (برونر)	روده‌ها	تولید و ترشح موکوپلی‌ساکاریدها، آنزیم‌ها و هورمون‌ها
بافت پیوندی	آمبیستوما[1] (جوانه اندام‌های حرکتی)	تولید و ترشح کلاژن
قرنیه	چشم پرندگان	ترشح کلاژن
یاخته‌های گیاهی	اکثر بافت‌ها	ترشح پکتین‌ها، همی‌سلولزها و پیش‌سازهای سلولز
یاخته‌های کلاهک ریشه	ریشه	تولید و ترشح موسیلاژها
یاخته‌های عده‌ای از جلبک‌ها	جلبک‌ها (برای مثال شاخه کریزوفیتا)	تولید و ترشح پولک‌های پلی‌ساکاریدی سیلیسی
یاخته‌های گرده‌ای	دانه‌های گرده	تولید و ترشح پلی‌ساکاریدهای انتین

۱

یا گاهی از پوشش هسته‌ای به وجود آمده و بر سطح نزدیک یا سطح تشکیل دیکتیوزوم افزوده می‌شوند، هم‌اکنون به ویژه در یاخته‌های جانوری مورد بحث است و تأیید عمومی ندارد (در صفحات قبل دیده‌ایم که حفره‌های گذر بیشتر جذب کناره کیسه‌های دیکتیوزومی می‌شوند و عاملی برای پایداری و امکان جوانه‌زنی کیسه‌ها هستند).

نظریه دیگری که بیشتر مورد توجه است، نظریه نوسازی دیکتیوزوم‌ها از حلقه‌های غشایی است که به احتمال زیاد از به‌هم پیوستن قطعاتی از شبکه آندوپلاسمی ایجاد می‌شوند. مارویاما[2] (۱۹۶۵) مشاهده کرده است که در طی تشکیل دانه‌های گرده در اواخر میوز، در یاختهٔ مادر گروه دیکتیوزوم‌ها حضور ندارند و بعد، از نو پدیدار می‌شوند؛ به این ترتیب که ابتدا حلقه‌های غشایی منفردی در سیتوزول ظاهر می‌شوند که به احتمال از به‌هم پیوستن قطعاتی از شبکه آندوپلاسمی ایجاد شده‌اند، اطراف هر حلقه به وسیله قطعات جدیدی از شبکه آندوپلاسمی احاطه می‌شود

1- Ambystoma نوعی سمندر

2- Marruyama

که از الحاق آنها حلقه جدیدی در اطراف حلقه اولیه به وجود می‌آید، با تکرار این پدیده بر تعداد حلقه‌های متحدالمرکز غشایی افزوده می‌شود وقتی تعدادشان حداقل به سه حلقه غشایی رسید، حلقه‌ها از یک ناحیه شروع به بازشدن و تشکیل حفره‌های گلژی می‌کنند و به این ترتیب دیکتیوزوم‌های جوانی ایجاد می‌شوند که ابتدا بسیار خمیده‌اند (شکل ۹-۲۲) و سپس به‌تدریج از خمیدگی کیسه‌های آنها کاسته می‌شود. این دقیقاً همان فرآیندی است که هنگام بازسازی دیکتیوزوم‌های تخریب شده تحت تأثیر آنتی‌پیرین مشاهده شده است (دیسون و بنبادیس، ۱۹۷۱). فلیکینگر[1]، در آمیب مشاهده کرده است که دیکتیوزوم‌های نوپدید نیز حلقوی‌اند. مجد[2] (۱۹۷۶) نیز در یاخته‌های تترادی حاصل از میّوزِ یاخته‌های مادری گرده در لوبیای روغنی مشاهده کرده است که دیکتیوزوم‌های نوپدید حلقوی‌اند. تشکیل دیکتیوزوم‌های جدید از حلقه‌های غشایی طی مراحلی که شرح داده شد، ضمن بررسی مراحل تشکیل یاخته‌های جنسی در صدف مرواریدساز مهار، به وسیله بهزادی و پریور (۱۹۹۷) مورد تأیید قرار گرفته است.

بالاخره، چنان که از بعضی تصاویر برمی‌آید، این امر که دیکتیوزوم‌ها می‌توانند به دو قسمت تقسیم شوند نفی نشده است.

شکل ۹-۲۲. مراحل تدریجی تشکیل دیکتیوزوم در یکی از یاخته‌های مریستمی سیر (برگرفته از پژوهش‌های دیسون، ۱۹۷۶).

1- Flikinguer 2- Majd

۱۰ لیزوزوم‌ها[1] میکروبادی و دستگاه واکوئلی

تاریخچه

هر یاخته یوکاریوتی دارای گروهی از اندامک‌های سیتوپلاسمی به نام لیزوزوم‌ها است که، عمل اصلی آنها گوارش درون‌یاخته‌ای و برون‌یاخته‌ای است. این اندامک‌ها به وسیله ویژگی‌های ریختی و مخصوصاً اعمالی که دارند از سایر اندامک‌ها شناخته می‌شوند. مهم‌ترین اعمالشان عبارتست از: (۱) گوارش ذرات غذایی یا مواد گوناگونی که از راه ریزه‌خواری (فاگوسیتوز[2]) یا مایع‌خواری (پینوسیتوز[3]) جذب شده‌اند؛ (۲) گوارش بخش‌های مختلف یاخته به وسیلهٔ فرآیندی که خودخواری (اتوفاژی[4]) نامیده می‌شود؛ (۳) تجزیه مواد برون‌یاخته‌ای با رهاکردن آنزیم‌ها در محیط احاطه‌کننده یاخته.

شناخت لیزوزوم‌ها وابسته به پیشرفت فنون جداسازی اجزای یاخته‌ای و زیست شیمی است. از ۱۹۴۹ یک گروه پژوهشی به سرپرستی دودوو[5] مشغول بررسی پراکنش فسفاتازها در یاخته‌ها بودند و موفق شدند با فن فرامرکزگریزی بخشی را از یاخته‌ها جدا کنند که ویژگی‌های مرکزگریزی آنها بینابین میتوکندری‌ها و میکروزوم‌ها بود. اندامک‌های تشکیل دهنده این بخش اندازه‌ای کوچک‌تر از میتوکندری‌ها و ظاهری شبیه میتوکندری‌ها داشتند و به همین دلیل ابتدا آنها را میتوکندری‌های کوچک تصور کردند. این اندامک‌ها مقدار قابل توجهی فسفاتازهای اسیدی داشتند؛ بررسی برش‌های آنها با میکروسکوپ‌های الکترونی گذاره، توسط نویکوف[6] در ۱۹۵۵ نشان داد که، به خلاف میتوکندری‌ها اساساً دارای یک غشاء هستند و ساختمان‌های غشایی درونی شبیه میتوکندری‌ها را ندارند. مطالعات زیست شیمیایی نشان داد که این اندامک‌ها علاوه بر فسفاتازهای اسیدی سرشار از دیگر آنزیم‌های هیدرولازی هستند و به کمک این آنزیم‌ها قدرت تجزیه‌کنندگی زیادی دارند و می‌توانند ماکرومولکول‌ها و اجزای متفاوت یاخته‌ای را تخریب و تجزیه کنند. به دلیل این ویژگی‌های آنزیمی، این اندامک‌ها را لیزوزوم (از Lyis به معنی تجزیه و حل‌کردن و Soma به معنی جسم یا پیکر) نامیدند.

هم‌اکنون متجاوز از ۵۰ هیدرولاز لیزوزومی شناخته شده است (جدول ۱-۱۰) که می‌توانند بیشتر ترکیبات زیستی را تجزیه و گوارده کنند. لیزوزوم‌ها در یاخته‌های جانوری، گیاهی و تک یاخته‌ها وجود دارند. باکتری‌ها لیزوزوم ندارند، اما فضایی که پری‌پلاسم[7] نامیده می‌شود و گاهی بین غشاء سیتوپلاسمی و دیوارهٔ یاخته‌ای وجود دارد، می‌تواند با آنزیم‌هایش نقشی شبیه لیزوزوم‌ها را بازی کند.

پایداری لیزوزوم‌ها در یاخته‌های زنده یک ویژگی قابل توجه است. آنزیم‌های لیزوزومی به وسیله یک غشاء احاطه شده‌اند و به راحتی در تماس با گوهر مایه‌های (سوبستراهای) خود قرار ندارند، زیرا اغلب این مواد امکان عبور از غشاء لیزوزوم‌ها را ندارند. مقدار قابل اندازه‌گیری آنزیم‌های لیزوزومی با استفاده از همگن‌سازی و سپس جداسازی آنها کم است. این مقدار به دنبال تیمار لیزوزوم‌ها با محلول‌های کم غلظت و یا عواملی که بر سطح لیزوزوم‌ها اثر می‌گذارند (مثل تریتون) تا حد قابل توجهی افزایش می‌یابد. کمیِ مقدار آنزیم‌ها در حالت اول که

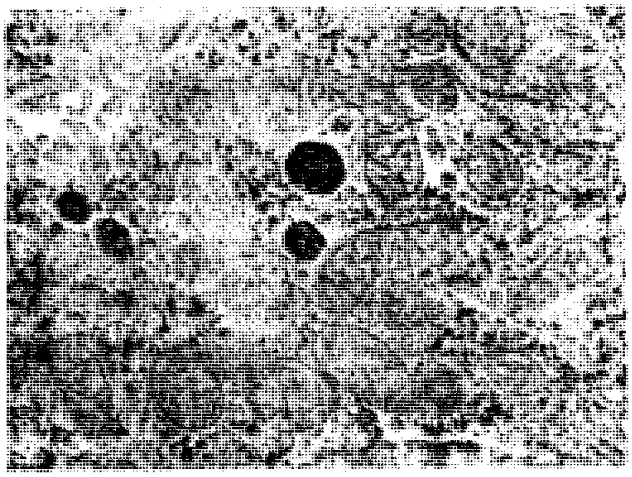
1- Lysosomes 2- Phagocytose 3- Pinocytose 4- Autophagy 5- De Duve
6- Novikof 7- Pre Plasma

لیزوزوم‌ها در شرایط و وضعیت عادی قرار دارند به دلیل آن است که به وسیله غشاء لیزوزومی احاطه شده‌اند.

غشاء لیزوزوم‌ها نسبت به اثر آنزیم‌هایی که آنها را محدود می‌کند، مقاوم است و فرآیندهای گوارش مواد در درون لیزوزوم‌ها انجام می‌شود. غشاء لیزوزوم‌ها قسمت‌های متفاوت یاخته را در برابر اعمال تخریبی آنزیم‌های لیزوزومی محافظت می‌کند و سلامت آن برای امکان اعمال طبیعی و زیست یاخته اهمیت اساسی دارد. به هر دلیل که غشاء لیزوزوم‌ها آسیب ببیند یا حتی نفوذپذیری آن از حدّ طبیعی بیشتر شود، منجر به رهایی آنزیم‌های لیزوزومی و تخریب و هضم بخش‌های مختلف یاخته می‌شود، به همین دلیل لیزوزوم‌ها را در حکم کیسه‌های خودکشی یاخته و یا نارنجک‌های درون‌یاخته‌ای می‌دانند که تخریب غشاء آنها می‌تواند موجب تجزیه مواد و اجزای یاخته‌ای و مرگ یاخته شود. در مورد فرضیه‌های مختلفی که برای پایداری غشاء لیزوزوم‌ها در برابر آنزیم‌های لیزوزومی وجود دارد در صفحات بعدی بحث خواهد شد.

ویژگی‌ها و فراساختار لیزوزوم‌ها

گرچه لیزوزوم‌ها اغلب کروی یا بیضی شکل‌اند و اندازه‌ای کوچک‌تر از میتوکندری‌ها با قطر حدود ۰/۱ تا ۰/۸ میکرون دارند، اما به‌طور کلی اندامک‌هایی ناهمگن هستند و تنوع شکل و اندازه زیادی دارند (شکل ۱۰-۱). اندازه متوسط آنها حدود ۰/۴ میکرون است.



شکل ۱۰-۱. ناحیه جانبی یک یاخته کبدی که یک مویرگ دو لایه (Cb) و تعدادی لیزوزوم (Ly) را نشان می‌دهد. gl،گلیکوژن؛ mi، میتوکندری؛ N، هسته؛ re، شبکه آندوپلاسمی ۳۱۰۰۰× (برگرفته از پژوهش‌های K.R.Porter).

در فراساختار هر لیزوزوم بخش‌های زیر تشخیص داده می‌شود:

۱- غشاء که از نوع غشاءهای زیستی با ضخامت متوسط حدود ۸۰ تا ۹۰ آنگستروم و متشکل از دو لایه فسفولیپیدی و پروتئین‌ها است. این غشاء به‌طور نسبی غنی از لسیتین است (قابل توجه است که در لیزوزوم‌ها، لسیتیناز نیز وجود دارد).

۲- ماده زمینه‌ای (بستره[1]) که درون لیزوزوم را پر می‌کند، سرشار از آنزیم‌های هیدرولازی است. با میکروسکوپ‌های الکترونی گذاره، ماده زمینه‌ای، یا حالت متراکم و همگن دارد و یا دارای بخش‌های کم تراکمِ روشن و بنابراین ناهمگن است (شکل ۱۰-۱).

از آنجا که لیزوزوم‌ها اندامک‌هایی اغلب کوچک و ناهمگن هستند، از فنون متفاوت شیمی یاخته‌ای نیز برای تشخیص آنها استفاده می‌شود. یکی از روش‌هایی که بیشتر مورد استفاده بوده است، روش گومری برای مشخص ساختن فعالیت فسفاتاز اسیدی لیزوزوم‌ها است (مراجعه به فصل ۴ صفحه ۲۱۰). واکنش‌های شیمی یاخته‌ای مورد استفاده برای تشخیص بتا - گلوکورونیداز، آریل‌سولفاتاز، N - استیل - بتا - گلوکزآمینیداز و ۵- برمو -۴- کلروایندول استات - استراز نیز می‌توانند برای رنگ‌آمیزی لیزوزوم‌ها به کار گرفته شوند. برخی مواد جذب شده به وسیله لیزوزوم‌ها نیز می‌توانند موجب شناسایی آنها گردند. همچنین پراکسیدازهای به درون کشیده شده به وسیلهٔ یاخته، می‌توانند به روش‌های شیمی یاخته‌ای شناسایی شوند. برخی رنگ‌کننده‌هایی که به یاخته‌های زنده افزوده می‌شوند در لیزوزوم‌ها جمع می‌شوند و سپس می‌توان آنها را به کمک میکروسکوپ فلوئورسانس شناسایی کرد. برای مثال قرمز خنثی، برخی ترکیبات دارویی ضدمالار یا و ویتامین A به وسیله لیزوزوم‌ها جذب می‌شوند.

لیزوزوم‌ها تنوع شکل زیادی دارند

یکی از ویژگی‌های ریخت‌شناختی مهم لیزوزوم‌ها تنوع شکل (چندشکلی) آنها است که به ویژه مربوط به اندازه و بی‌نظمی‌های ساختار درونی آنها می‌شود (شکل ۱۰-۱).

مشاهداتی که با میکروسکوپ‌های الکترونی بر روی بخش لیزوزومی به‌دست آمده از کبد انجام شده است، وجود اندامک‌هایی متراکم با اندازهٔ (قطر) حدود ۰/۴ میکرومتر را که دارای یک غشاء بوده‌اند و نیز ذرات بسیار متراکمی را که شبیه به ذرات فرّیتین بوده‌اند، نشان داده است. تاکنون بخش‌های لیزوزومی تقریباً خالصی نیز از یاخته‌های کبدی جدا شده است. همچنین از یاخته‌های کبدی بخش‌های پراکسیزومی تقریباً خالص و نیز ذراتی دارای ویژگی‌های ریخت‌شناختی مشابه به لیزوزوم‌ها جدا شده‌اند که این ذرات را به دلیل جایگزینی ترجیحی که در طول مجاری صفراوی دارند «ذرات متراکم پیش مجرایی[2]» نامیده‌اند.

ویژگی‌های عمدهٔ آنزیم‌های لیزوزومی

آنزیم‌های لیزوزومی تنوع بسیار زیادی دارند (جدول ۱۰-۱) و همان گونه که اشاره شد تاکنون متجاوز از ۵۰ گروه آنزیمی متفاوت در لیزوزوم‌های یاخته‌های گوناگون شناخته شده است. بدیهی است که هر لیزوزومی همهٔ انواع این آنزیم‌ها را ندارد.

از ویژگی‌های مشترک آنزیم‌های لیزوزومی موارد زیر قابل توجه هستند:

۱- عمل هیدرولازی دارند

۲- ساختمان گلیکوپروئینی دارند

۳- در PH اسیدی فعال هستند و PH بهینه برای عمل آنها حدود ۵ است.

از آنجا که تعداد گروه‌های آنزیمی لیزوزوم‌ها بسیار زیاد است تنها به اشاره‌ای در مورد عمل برخی از آنها اکتفا می‌شود: آنزیم ۴-۱، آلفاگلوکوزیداز عامل هیدرولیز و تجزیهٔ تدریجی گلیکوژن است و با عمل این آنزیم گلیکوژن به

1- Matrix 2- Pericanalicular dens granules

جدول ۱۰-۱. معرفی برخی از آنزیم‌های لیزوزومی.

نام آنزیم و نقش کلی آنها	گوهرمایه (سوبسترا)
۱- آنزیم‌های هیدرولیزکنندهٔ پروتئین‌ها:	
پروتئازها و پپتیدازها	
کاتپسین A، B، C، D، E	پروتئین‌ها و پپتیدهای گوناگون
کلاژناز	کلاژن
پروتئیناز خنثی	پروتئین‌های خنثی
آریل آمیداز	آریل آمیدها
پپتیداز	پپتیدها
رنین	
۲- آنزیم‌های هیدرولیزکنندهٔ لیپیدها:	
استرازها	استرهای اسیدهای چرب
فسفولیپازها	لسیتین، فسفاتیدیل اتانول آمین
اسفنگومیلینازها	اسفنگومیلین
۳- آنزیم‌های هیدرولیزکنندهٔ ترکیبات گلوسیدی:	
آلفا - گلوکوزیداز	گلیکوژن
بتا - گلوکوزیداز	بتا - گلوکوزیدها
بتا - گالاکتوزیداز	بتا - گالاکتوزیدها
آلفا - مانوزیداز	آلفا - مانوزیدها
استیل هگزوز آمینیداز	استیل هگزوآمینیدها، سولفات هپارین
سیالیداز	مشتقات اسید سیالیک
۴- آنزیم‌های هیدرولیزکننده گلیکوز آمینوگلیکان:	
بتا - گلوکورونیداز	ترکیبات پکتیکی - موکوپلی‌ساکاریدها -
بتا - گالاکتوزیدازها	پلی ساکاریدهای اسیدی
لیزوزیم‌ها	موکوپلی ساکاریدهای دیوارهٔ باکتری‌ها
هیالورونیداز	اسید هیالورونیک - سولفات کوندروئیتین
آریل سولفاتاز A و B	آریل سولفات‌ها، سولفات سریروزید، سولفات کوندروئیتین
۵- آنزیم‌های هیدرولیزکننده اسیدهای نوکلئیک:	
RNA - ases	RNAها
DNA - ases	DNAها
۶- فسفاتازها:	
اسید فسفاتاز	منواسترهای فسفات
فسفودی استراز	فسفودی استرها، اولیگونوکلئوتیدها
فسفاتیدیک اسید فسفاتاز	فسفاتیدیک اسیدها

گلوکز تبدیل شده سوخت‌وساز آن در یاخته‌ها آغاز می‌شود. کمبود یا نبود این آنزیم موجب عدم تجزیهٔ گلیکوژن، انباشته‌شدن آن در یاخته‌ها به ویژه یاخته‌های کبدی، ماهیچه‌ای و از جمله ماهیچه قلب می‌شود که در حالت پیشرفته موجب اختلال در کار عضله قلب و بروز برخی سکته‌های قلبی (آنفاراکتوس) می‌گردد.

کلاژنازها گروه آنزیمی مهمی هستند که بر روی کلاژن‌ها از ترکیبات پروتئینی اثر می‌کنند و در مواردی که لیزوزوم‌ها آسیب ببینند با رهاشدن کلاژنازها امکان آسیب‌دیدگی زردپی‌ها، مشکلات حفظ تعادل، کاهش قابلیت ارتجاع پوست فراهم می‌شود.

کاتپسین‌ها انواع مختلفی دارند و در هیدرولیز پروتئین‌ها و پپتیدهای گوناگون عمل می‌کنند. یکی از نقش‌های قابل توجه آنها دخالت در هیدرولیز و تجزیه پروتئین‌ها در یاخته‌های دُم نوزاد دوزیستان، تحلیل رفتن دم و انجام دگردیسی آنها است. هیدرولیز اولیه پروتئین‌ها به وسیلهٔ کاتپسین‌های D و E انجام می‌شود که پیوندهای پپتیدی را گسسته و قطعات پپتیدی با اندازه‌های مختلفی را تولید می‌کنند. سپس با عمل کاتپسین‌های A و B این قطعات به اسیدهای امینه تبدیل می‌شوند.

کاتپسین C، آریل‌آمیداز و دی‌پپتیداز لیزوزومی با هیدرولیز پپتیدهای ویژه، آنها را به اسیدهای امینه تبدیل می‌کنند.

آنزیم‌های هیدرولیزکننده اسیدهای نوکلئیک (RNA − ases و DNA − ases)، این ترکیبات پلی‌نوکلئوتیدی را به اولیگونوکلئوتیدها تبدیل می‌کنند و سپس به ترتیب فسفودی‌استرازها و فسفاتازها، اولیگونوکلئوتیدها را تا حد نوکلئوزیدها و فسفات معدنی تجزیه می‌کنند.

همان گونه که جدول ۱۰-۱ نشان می‌دهد در لیزوزوم‌ها، آنزیم‌های متنوع هیدرولیزکننده لیپیدها و پلی‌ساکاریدها وجود دارند.

گرچه اغلب آنزیم‌های لیزوزومی در درون این اندامک قرار دارند، اما برخی آنزیم‌ها از جمله استیل‌گلوکزآمینیداز، گلوکزیدازها و سیالیداز، جزء پروتئین‌های غشایی لیزوزوم‌ها هستند و برخی دیگر مثل اسیدفسفاتازها، ریبونوکلئازها، آریل‌سولفاتازها، گلوکورونیدازها که به‌صورت آزاد در لیزوزوم‌ها وجود دارند، ممکن است در برخی شرایط فیزیولوژیکی یا فیزیکوشیمیایی، به غشاء لیزوزوم‌ها متصل شوند.

آنزیم‌های جدا شده از لیزوزوم‌ها پایداری بسیار متفاوتی دارند، برخی تا چند ماه در یخچال سالم می‌مانند و برخی تنها تا چند ساعت پس از آزاد شدن فعال باقی می‌مانند.

سنتز آنزیم‌های لیزوزومی با دخالت ریبوزوم‌ها، شبکه آندوپلاسمی و فرضیه پپتید نشانه است که در بحث شبکه آندوپلاسمی مورد بحث قرار گرفت. گلیکوزیلاسیون این آنزیم‌ها خیلی زود و ابتدا ضمن سنتز این آنزیم‌ها در فضای درونی شبکه آندوپلاسمی خشن انجام می‌شود و پردازش‌های نهایی آنها پس از انتقال به دستگاه گلژی صورت می‌گیرد. بخش گلوسیدی آنزیم‌های لیزوزومی دارای مانوز ۶- فسفات است که به‌عنوان نوعی نشانه برای انتقال هیدرولازهای لیزوزومی از شبکه آندوپلاسمی به دیکتیوزوم‌ها و سپس به لیزوزوم‌های اولیه است. چگونگی این انتقال در بحث زیست‌آمایی (بیوژنز) لیزوزوم‌ها مورد بحث قرار خواهد گرفت.

غشاء لیزوزومی، اهمیت و برخی ویژگی‌های آن

توجه به تنوع گروه‌های آنزیمی لیزوزومی و اعمال آنها نشان می‌دهد که این آنزیم‌ها توانایی هیدرولیز و تجزیه انواع ترکیبات یاخته‌ای را دارند. این آنزیم‌ها توسط غشاء لیزوزوم‌ها محدود شده‌اند. اگر گوهرمایه‌های (سوبستراهای) آنزیم‌های لیزوزومی به یک بخش (فراکسیون) لیزوزومی دارای لیزوزوم‌های سالم افزوده شود، تغییری در گوهرمایه‌ها صورت نمی‌گیرد؛ برعکس چنانچه این گوهرمایه‌ها به یک بخش لیزوزومی با لیزوزوم‌های آسیب‌دیده (تحت تأثیر عوامل مکانیکی، شوک اسمزی یا عمل شوینده‌ها) افزوده شوند، هیدرولیز می‌گردند. بنابراین سلامت غشاء لیزوزوم‌ها یکی از شرایط اساسی لازم برای زیست یاخته‌ها است.

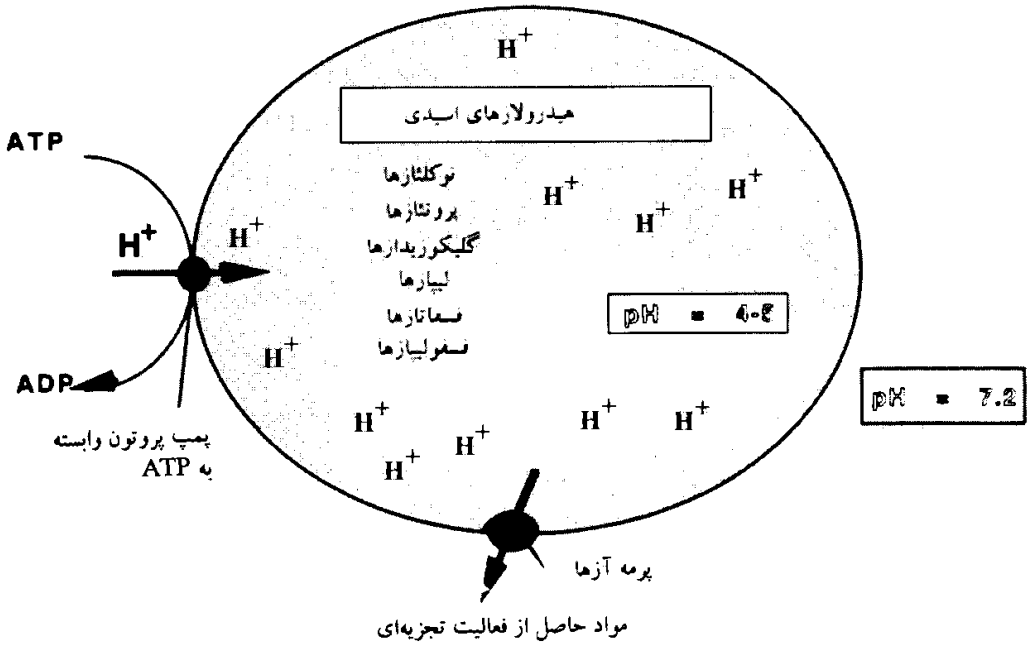
غشاء لیزوزومی ویژگی‌های زیادی دارد (شکل ۱۰-۲):

- بایستی لیزوزوم‌ها را به‌صورت یک مجموعه بسته نگهدارد؛
- امکان عبور یون‌های H^+ از سیتوزول به درون لیزوزوم را برای برقراری pH اسیدی در درون لیزوزوم و pH به

طرف قلیایی در سیتوزول را فراهم آورد (به خاطر آوریم که P^H مناسب برای عمل آنزیم‌های لیزوزومی حدود ۴ تا ۵ و P^H سیتوزول به‌طور معمول حدود ۷/۲ است). غشاء لیزوزوم دارای پمپ‌های پروتون وابسته به ATP برای امکان گذر پروتون‌ها است.

- غشاء لیزوزوم‌ها بایستی خروج مواد حاصل از گوارش انجام شده در درون لیزوزوم را امکان‌پذیر سازد. این عمل به حضور پرمه‌آزها نیاز دارد.
- غشاء خود بایستی در برابر عمل آنزیم‌های لیزوزومی پایدار باشد. گرچه چگونگی این پایداری هنوز به‌طور کامل شناخته نشده است اما دو فرضیه برای آن مطرح شده است:

یکی وجود یک پوشش درونی گلیکوپروتئینی که یک چتر واقعی پشتیبان را برای غشاء ایجاد می‌کند و دیگری وجود پمپ‌های پروتون در غشاء که موجب می‌شوند با تراکم یون‌های H^+ در مجاورت سطح درونی غشاء، P^H بسیار کاهش یابد و حتی تا حدود ۲ برسد. این حالت از P^H مناسب برای فعالیت آنزیم‌های لیزوزومی (۴ تا ۵) بسیار کم‌تر است و بر عمل آنزیم‌های لیزوزومی نقش مهارکننده دارد. پیروان این فرضیه آسیب‌پذیر شدن و تخریب غشاء لیزوزوم‌ها پس از مرگ یاخته را که با توقف ساخت ATP و از کار افتادن پمپ‌های پروتون همراه است دلیلی برای دفاع از این فرضیه می‌دانند.



شکل ۱۰-۲. ویژگی‌های عمده یک لیزوزوم و نقش غشاء آن.

گرچه سلامتی غشاء لیزوزوم‌ها اهمیت زیادی را برای امکان زیست یاخته‌ها دارد، اما لیزوزوم‌ها اندامک‌هایی بسیار آسیب‌پذیر هستند و غشاء آنها تحت تأثیر عوامل مختلفی تخریب می‌شود یا نفوذپذیریش تغییر می‌کند.

برخی عوامل مخرب غشاء لیزوزوم‌ها عبارتند از:

- عوامل مکانیکی مثل ضربه سنگین، نیشگون که با تخریب لیزوزوم‌ها، رهایی آنزیم‌های لیزوزومی و مرگ عده‌ای از سلول‌ها عاملی برای تغییر رنگ محل ضربه دیده می‌باشد (بخشی از تغییر رنگ ممکن است به دلیل پاره شدن مویرگ‌ها و یا خونریزی زیر جلدی باشد).

- عوامل فیزیکی مثل سرمای شدید، گرمای زیاد و تغییرات دمایی شدید، یکی از دلایل زیان‌آور شدن مواد غذایی که چندین بار منجمد و گرم می‌شوند همین است که، با تغییرات شدید دما، لیزوزوم‌های یاخته‌ها آسیب‌دیده آنزیم‌های آنها رها می‌شود و با تغییرات کنترل نشده مواد تحت تأثیر این آنزیم‌ها ترکیبات گوناگون و حتی سرطان‌زا تشکیل می‌شود.
- عوامل صوتی نیز از عوامل مؤثر بر غشاء لیزوزوم‌ها است صدای رعد، امواج ناشی از شکستن دیوار صوتی و حتی امواج صوتی ناشی از ترافیک شهری و مراکز صنعتی همه در ناپایداری و آسیب‌دیدن غشاء لیزوزوم‌ها مؤثرند، بررسی‌های علمی انجام شده شواهد زیادی از تأثیر این گونه امواج بر تخریب لیزوزوم‌ها و مشکلات ناشی از آن را به‌دست داده‌اند.
- عوامل شیمیایی و هورمونی. ترکیبات مختلف شیمیایی به شکل‌های متفاوتی بر غشاء لیزوزوم‌ها مؤثراند. افزایش گازکربنیک، اکسیژن یونی، ذرات سیلیس، قلع، روی، زمرّد، کمبود اکسیژن، سموم درونی[1]، ترکیبات استروئیدی از عوامل ناپایدارکننده و مخرب غشاء لیزوزوم‌ها هستند و الکالوئیدها و برخی ترکیبات کورتونی (کورتیزول، کورتیکوسترون) در پایداری غشاء لیزوزوم‌ها مؤثر هستند.
- عوامل زیستی از جمله ویروس‌ها. عواملی روحی از جمله تنش‌ها، شوک‌های ترس‌آور و هیجان‌های شدید، خستگی مفرط، کار سنگین بدنی نیز از عوامل مخرب و ناپایدارکننده غشاء لیزوزوم‌ها هستند. برعکس آرامش روانی، زندگی در محیط‌های دور از آلودگی‌های محیطی و دارای اکسیژن کافی و تغذیه مناسب سلامت و پایداری غشاء لیزوزوم‌ها و بنابراین سلامت یاخته‌ها و عمر طولانی‌تر آنها را موجب می‌شود.

اقسام لیزوزوم‌ها

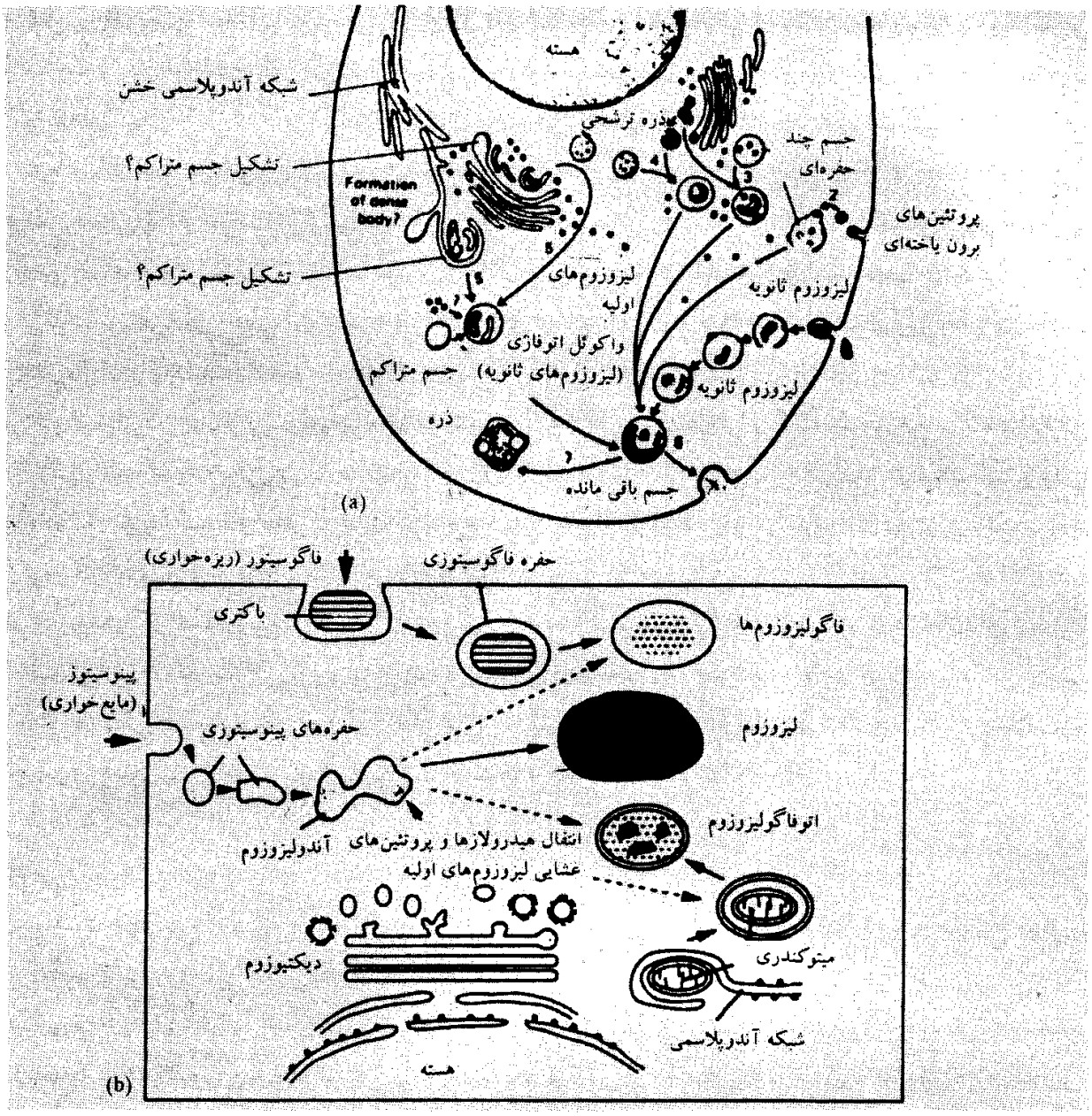
هم‌اکنون چهار نوع لیزوزوم در نظر گرفته می‌شود که تنها یک نوع آنها را لیزوزوم اولیه[2] نامند و سه نوع دیگر را به‌طور معمول لیزوزوم‌های ثانویه[3] گویند.

۱- ***لیزوزوم‌های اولیه (ذرات انبارکننده)***: اندامک‌های تک غشایی دارای آنزیم‌های هیدرولازی هستند که از بخش (سطح) دور دیکتیوزوم‌ها جدا شده‌اند و هنوز فعالیت آنزیمی خود را آغاز نکرده‌اند. این حفره‌ها اندازه متفاوتی دارند اما قطر متوسط آنها حدود ۱۰۰ نانومتر است. محتوای آنزیمی لیزوزوم‌های اولیه به وسیله ریبوزوم‌ها و دخالت شبکه آندوپلاسمی خشن ساخته می‌شود و سپس از شبکه این آنزیم‌ها به دستگاه گلژی و از آنجا به لیزوزوم‌ها می‌رسند و در آنجا به وسیله فسفاتاز اسید اولین مرحله تحوّل را می‌گذرانند (شکل ۱۰-۳ الف و ب). چگونگی تشکیل لیزوزوم‌های اولیه را با کشت منوسیت‌هایی که به ماکروفاژها تبدیل می‌شوند بررسی کرده‌اند. ضمن این تبدیل، مقدار قابل توجهی آنزیم‌های هیدرولازی، به سرعت ساخته می‌شوند که تولید آنها را می‌توان به وسیلهٔ پورومیسین متوقف کرد. با استفاده از لوسین تریسیوم‌دار و روش خودپرتونگاری نشان داده شده که انتقال پروتئین‌ها و از جمله آنزیم‌ها به ترتیب زیر در این یاخته‌ها انجام می‌شود:

شبکه آندوپلاسمی ⟵ دستگاه گلژی ⟵ لیزوزوم

۲- ***لیزوزوم‌های ثانویه***: همان گونه که اشاره شد اصطلاح لیزوزوم‌های ثانویه برای نامیدن همهٔ انواع لیزوزوم‌ها به جز لیزوزوم‌های اولیهٔ به کار می‌رود که عبارتند از:

1- Endotoxines 2- Perimary Lysosomes 3- Secondary Lysosomes

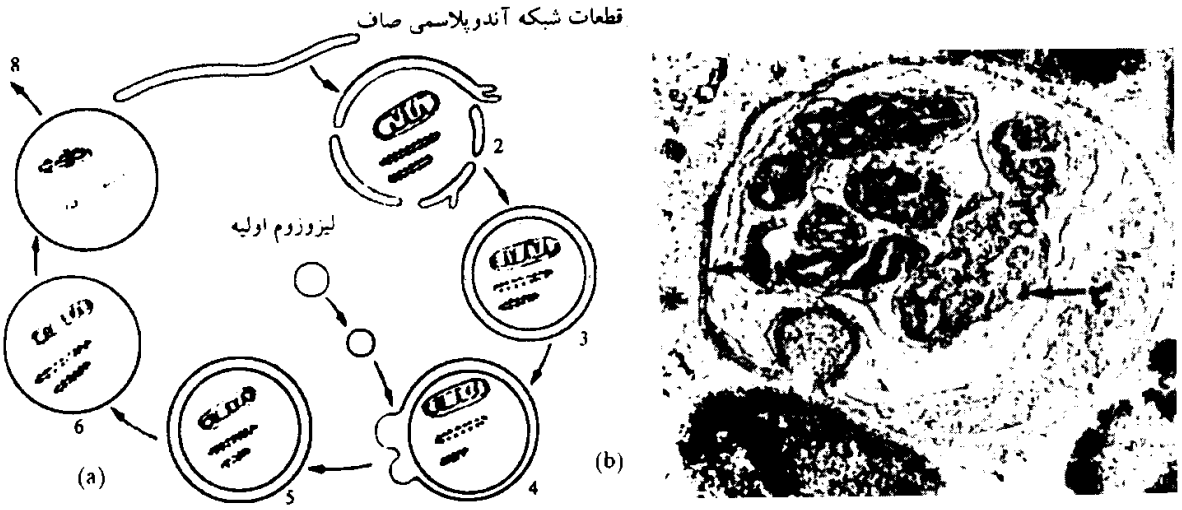


شکل ۱۰-۳. چگونگی تشکیل لیزوزوم‌ها a) نمای کلی از تشکیل انواع مختلف لیزوزوم‌ها b) نمایش دیگری از تشکیل انواع لیزوزوم‌ها

الف: **هتروفاگوزوم‌ها[1] یا واکوئل‌های دگرخواری (واکوئل‌های دگرخواری) یا واکوئل‌های گوارشی. در نتیجه پدیده ریزه‌خواری (فاگوسیتوز) یا مایع‌خواریِ (پینوسیتوز) موّاد بیگانه‌اند. این مواد که در یک بخش غشایی احاطه می‌شوند، واکنش مثبتی به فسفاتاز دارند که موجب می‌شود با یک لیزوزوم اولیه به‌هم بپیوندند (تشکیل لیزوزوم ثانویه) (شکل ۱۰-۳). سپس مواد بیگانه به‌تدریج به وسیلهٔ آنزیم‌های هیدرولازی، رسیده از لیزوزوم اولیه هضم می‌شوند؛ شدت و میزان گوارش به مقدار و نوع ترکیب شیمیایی مواد بیگانه، میزان فعالیت و نوع آنزیم‌های لیزوزومی وابسته است. در شرایط بهینه، گوارش موجب تشکیل محصولاتی با وزن مولکولی کم می‌شود که از غشاء لیزوزوم به درون سیتوزول می‌رسند و در مسیرهای متفاوت سوخت‌وسازی مورد استفاده قرار می‌گیرند (مطالب صفحه ۲۲۰ تا ۲۲۲ از فصل ۶ را ببینید).**

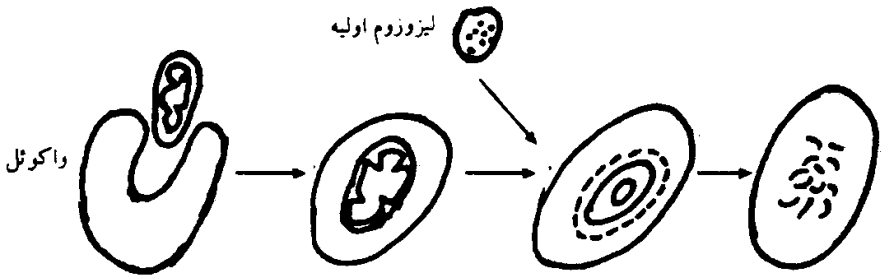
1- Heterophagosomes

ب: اتوفاگوزوم‌ها[1] یا واکوئل‌های خودخواری (واکوئل‌های اتوفاژی = سیتولیزوزوم = سیتوسگرزوم[2]): این نوع از لیزوزوم‌های ثانویه به این ترتیب تشکیل می‌شوند که بخشی (بخش‌هایی) از شبکه آندوپلاسمی، قسمتی از سیتوپلاسم یاخته را احاطه می‌کند، سپس با لیزوزوم اولیه ادغام می‌شود و به نوعی لیزوزوم ثانویه که همان اتوفاگوزوم است، تبدیل می‌شود و گوارش سیتوپلاسم محبوس شده در آن آغاز می‌گردد (شکل ۱۰-۳ و ۱۰-۴ الف و ب).



شکل ۱۰-۴. a) نمایی از چگونگی تشکیل واکوئل خودخواری. b) ریزنگار الکترونی از یک واکوئل اتوفاژی (۴۰۰۰۰×) ۱) غشاء واکوئل ۲) میتوکندری در حال تجزیه

واکوئل‌های خودخواری ممکن است یا به درون برگشتگی غشاء برخی واکوئل‌ها و همراه آن محبوس کردن بخشی از سیتوپلاسم یا اندامک‌های سیتوپلاسمی نیز تشکیل شوند. در این حالت نیز آنزیم‌های هیدرولازی از یک لیزوزوم اولیه کسب می‌شود (شکل ۱۰-۵).



شکل ۱۰-۵. راه دیگری برای تشکیل واکوئل خودخواری

تشکیل واکوئل‌های خودخواری اغلب با اهداف زیر صورت می‌گیرد:

- مبارزه با فقر غذایی. در یاخته‌هایی که به اندازه کافی مواد غذایی در اختیار نداشته باشند، یاخته با تشکیل واکوئل‌های خودخواری، بخشی از سیتوپلاسم خود را هضم می‌کند و در مسیرهای سوخت‌وساز مورد استفاده قرار می‌دهد. هنگام روزه‌داری، یاخته‌های کبدی دارای واکوئل‌های خودخواری زیادی می‌شوند که در برخی از این واکوئل‌ها، بقایای میتوکندری‌ها قابل تشخیص است. پدیده خودخواری را می‌توان در یاختهٔ کبدی با تزریق گلوکاگون، هورمون لوزالمعده‌ای مورد بررسی قرار داد، چنین تیماری موجب افزایش قابل توجه تعداد واکوئل‌های خودخواری و کاهش تعداد

1- Autophagosomes 2- Cytosegresomes

لیزوزوم‌های کوچک اولیه می‌شود. این وضع نشان می‌دهد که، لیزوزوم‌های اولیهٔ موجودِ از قبل به احتمال به‌عنوان منبع آنزیم‌های هیدرولازی برای تشکیل واکوئل‌های اتوفاژی قرار گرفته‌اند.

- انجام تمایزهای ویژه. برای مثال حذف تعدادی از اندامک‌ها از جمله میتوکندری‌ها، حذف محتویات یاخته برای تشکیل آوندهای چوبی
- حذف برخی بخش‌های اضافی مثل حذف مجرای مولر در پرندگان نر که چون نیازی به مجرای خروج تخم ندارند با عمل اتوفاژی، این مجرا تحلیل می‌رود؛ تحلیل بردن بخش عمده‌ای از رحم پس از زایمان به نحوی که وزن رحم از حدود ۲ کیلوگرم (قبل از زایمان) به حالت مشابه قبل از بارداری (حدود ۵۰ گرم) برمی‌گردد. تحلیل رفتن دم در نوزاد دوزیستان بی‌دم در مراحل دگردیسی نیز از این موارد است.

ج: اجسام باقی مانده[1]. چنانچه عمل گوارش در لیزوزوم‌های ثانویه (اعم از واکوئل‌های خودخواری یا دگرخواری) کامل نباشد، اجسام باقی مانده تشکیل می‌شوند. اجسام باقی مانده به حسب نوع مواد باقی مانده درونشان، نوع و شرایط فیزیولوژیکی یاخته، سرانجام متفاوتی دارند: ممکن است برای کسب آنزیم‌های هیدرولازی با لیزوزوم اولیه‌ای ادغام شوند و دوباره به‌صورت یک لیزوزوم ثانویه فعّال درآیند و این وقتی است که مواد باقی مانده در آنها هنوز قابل گوارش و قابل استفاده برای یاخته باشد، یا ممکن است اجسام باقی مانده به‌صورت واکوئل‌های دفعی عمل کنند و با پدیده دفع یاخته‌ای، مواد غیرقابل گوارش یا غیرقابل استفاده برای یاخته را دفع کنند (شکل ۱۰-۳). در برخی یاخته‌ها اجسام باقی مانده برای مدتی طولانی در یاخته باقی می‌مانند و در فرآیندهای پیری دخالت می‌کنند. برای مثال محتویات رنگی که در یاخته‌های عصبی جانوران مسّن دیده می‌شوند می‌توانند از این روند ایجاد شده باشند.

د: اجسام متراکم[2] یا تلولیزوزوم‌ها[3] (اجسام رسوبی). برخی از مواد که در نتیجه آندوسیتوز به یاخته راه یافته و هضم نشده‌اند و بخش‌هایی از اندامک‌هایی که به واکوئل‌های خودخواری وارد شده اما گوارده نشده‌اند، در برخی واکوئل‌های گوارشی باقی می‌مانند و اجسام متراکم (رسوبی) یا تلولیزوزوم‌ها را به وجود می‌آورند. اجسام متراکم اغلب حجیم، با شکل‌های متفاوت و متراکم در برابر الکترون‌ها هستند؛ بقایای هضم نشده اغلب به شکل لایه‌هایی غشایی (شکل ۱۰-۶)، توده‌های متراکم بی‌شکل، ذرات متراکم یا لایه‌هایی از ترکیبات متفاوت شیمیایی از جمله فسفولیپیدها (ساختمان میلینی) دیده می‌شوند. اجسام متراکم اغلب فعالیت هیدرولازی ندارند.

نقش زیستی لیزوزوم‌ها

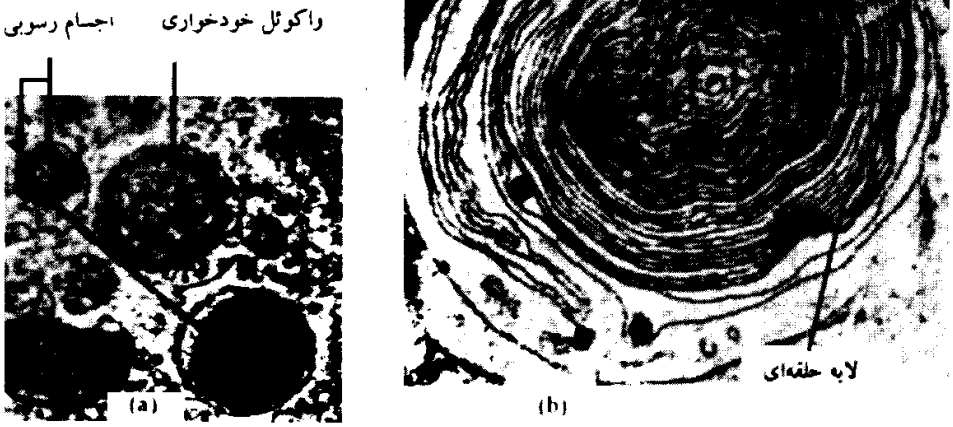
۱- انجام گوارش درون یاخته‌ای

موادگوناگون با سه روش متفاوت یعنی ریزه‌خواری، مایع‌خواری و خودخواری به لیزوزوم‌ها می‌رسند. گوارش این مواد به کمک آنزیم‌های لیزوزومی، در درون لیزوزوم‌ها انجام می‌شود و مواد حاصل از گوارش لیزوزومی با عبور از غشاء لیزوزوم‌ها به سیتوزول می‌رسند و مسیر سوخت‌وسازی ویژه خود را می‌گذرانند.

پدیدهٔ خودخواری

این پدیده‌ها که با گوارش بخشی از ترکیبات و ساختارهای یاخته‌ای همراه هستند و در واکوئل‌های خودخواری

1- Residual bodies 2- Dens bodies 3- Telolysosomes



شکل ۱۰-۶. ریزنگار الکترونی از اجسام متراکم (رسوبی). a) با نمایی از لایه‌های غشایی؛ b) با محتویات متراکم

انجام می‌شوند و به دو صورت امکان‌پذیر هستند:

- به درون برگشتگی سطح لیزوزوم‌ها که موجب به دام انداختن بخشی از سیتوپلاسم می‌شود (شکل ۱۰-۳). این پدیده در یاخته‌های گیاهی فراوان است.
- حلقه زدن بخشی از شبکه آندوپلاسمی یا اتصال قطعاتی از شبکه و محبوس کردن بخشی از سیتوپلاسم (شکل ۱۰-۳). هیدرولازها به این ساختمان‌ها تخلیه می‌شوند و در بخش سیتوپلاسمی محبوس شده، اندامک‌های مختلفی مثل میتوکندری‌ها، پلاست‌ها، قطعاتی در شبکه آندوپلاسمی، ریبوزوم‌ها، مجموعه‌هایی از ذرات گلیکوژن و... دیده می‌شوند.

سرعت خودخواری شگفت‌آور است. در برخی اندام‌ها، به ویژه کبد و کلیه، خودخواری پدیده‌ای منظم است. یک یاخته کبدی بخش عمدهٔ ساختار خود را در یک هفته خراب (گوارده) می‌کند. به ازای هر گرم از یاخته‌های کبدی، یک میلیارد میتوکندری در ساعت تخریب می‌شوند. این شدت خودخواری موجب می‌شود که میتوکندری‌های هر یاخته کبدی در هر نیم عمر خود که حدود ۱۵۰ روز است، ۱۵ بار بازسازی می‌شوند.

در برخی موارد، خودخواری بسیار دقیق است و در پاک‌سازی اندام‌ها یا بافت‌های مسّن دخالت دارد. این حالتی است که در اندام‌هایی که تحول و تکامل می‌یابند و برای مثال هنگام دگردیسی حشرات یا دوزیستان دیده می‌شود. اندام‌ها (مخصوصاً ماهیچه‌ها)، تحت تأثیر یک محرک هورمونی، گوارده می‌شوند و تک پارهای (مونومرهای) آزاد شده برای ساختن بافت‌های جدید مورد استفاده قرار می‌گیرند. در پستانداران، پدیدهٔ خودخواری برای تنظیم ترشح شیر، هنگام شیر دادن دخالت دارد: ترشح شیر مداوم است اما تخلیه صورت نمی‌گیرد، لیزوزوم‌ها تخریب ذرات ترشح‌کننده شیر و حتی ساختارهایی را که در تولید این ذرات مؤثرند یعنی شبکه آندوپلاسمی خشن و ریبوزوم‌ها را موجب می‌شوند.

همان گونه که دیده‌ایم پدیده خودخواری به یاخته‌ها امکان مبارزه با کمبود غذا، حذف اندامک‌ها و بخش‌های اضافی (برای مثال حذف تعدادی از میتوکندری‌ها برای کاهش تنفس یاخته‌ای)، بروز تمایزهای ویژه (حذف محتویات درونی یاخته‌ها و تشکیل آوندهای چوبی)، حذف برخی بخش‌های اضافی (مجرای مولر در پرندگان نر،

کاهش حجم و وزن رحم پس از زایمان) و پیشرفت دگردیسی حشرات و دوزیستان (خودخواری بخش‌های ماهیچه‌ای هنگام دگردیسی حشرات و تحلیل رفتن دم هنگام دگردیسی دوزیستان بی‌دم) را فراهم می‌سازد.

پدیدهٔ دگرخواری

ریزه‌خواری (فاگوسیتوز) و مایع‌خواری (پینوسیتوز) پدیده‌هایی هستند که موجب گوارش درون یاخته‌ای مواد برون‌زا می‌شوند. ماکروفاژها یاخته‌هایی بسیار تخصص یافته برای ریزه‌خواری هستند که در اندام‌ها و بافت‌های متفاوت و به ویژه در ریه‌ها به پاک‌سازی کمک عمده‌ای می‌کنند پس از گوارش درون لیزوزومی، یاخته از محصولات گوارش (اسیدهای امینه، قندها، نوکلئوتیدها...) که به احتمال با واسطهٔ ناقل‌ها از غشاء لیزوزوم‌ها می‌گذرند، استفاده می‌کند.

برخی باکتری‌ها از این عمل دگرخواری مصون می‌مانند، برای مثال باکتری جذام که به خوبی در لیزوزوم‌ها زنده می‌ماند.

تعداد زیادی از تک یاخته‌ها با روش دگرخواری، تغذیه می‌کنند. پس از گوارش درون یاخته‌ای، باقی مانده‌های غیرقابل استفاده دفع می‌شوند یا در یاخته باقی مانده و اجسام متراکم (رسوبی) را به وجود می‌آورند.

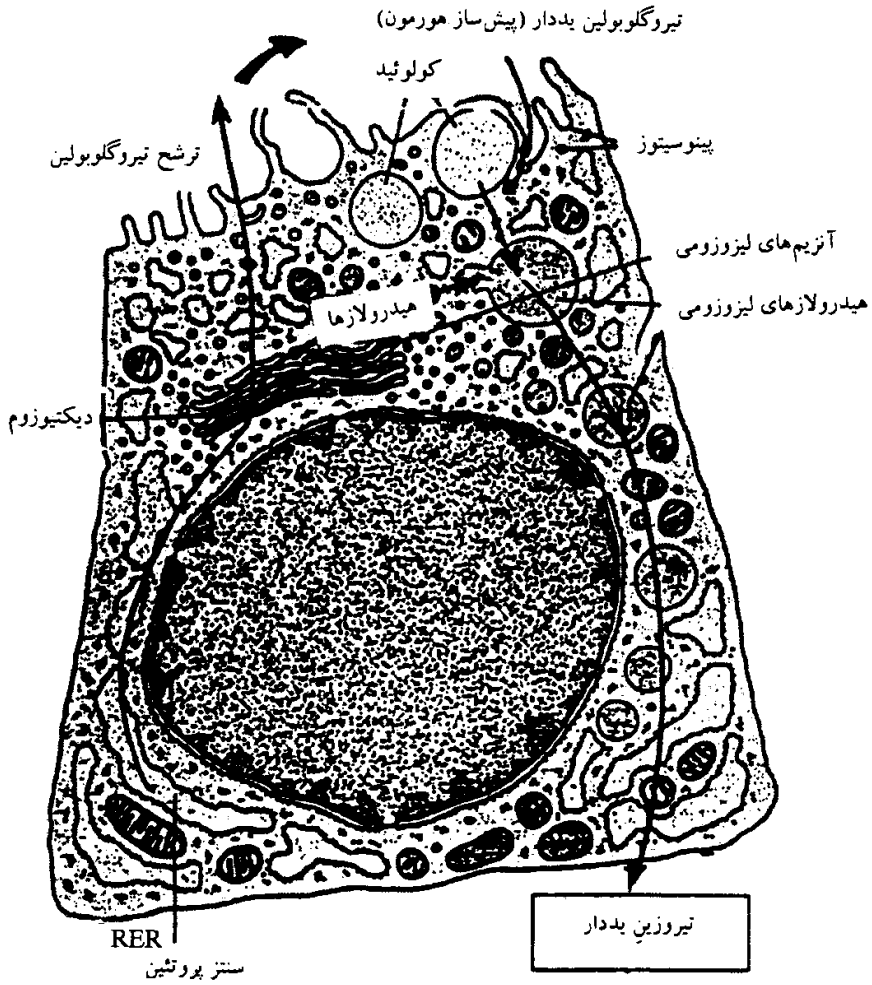
مایع‌خواری پدیده‌ای بسیار عمومی است که باز جذب پروتئین‌ها، تجزیه زیستی آنها و استفاده دوبارهٔ آنها به وسیلهٔ یاخته را امکان‌پذیر می‌سازد. این پدیده به یاخته‌های کلیوی در لوله‌های خمیده امکان می‌دهد که مولکول‌های پروتئینی تصفیه شده در لوله‌های ادراری و در بخش گلومرولی را مورد استفاده قرار دهند؛ همچنین در کبد، پروتئین‌هایی که از پلاسمای خون جدا شده‌اند، پس از تجزیه به وسیله لیزوزوم‌ها مورد استفاده یاخته‌ها قرار می‌گیرند.

مورد یاخته‌های حفره‌ای (فولیکولی) غدهٔ تیروئید که در آنها تولید هورمون‌های تیروئیدی تا حدی نتیجه‌ای از فعالیت مایع‌خواری است، مثال خوبی برای روشن‌کردن پدیده‌های دگرخواری است (شکل ۱۰-۷). پیش‌ساز هورمون، تیروگلوبولین است، پروتئینی ترشحی که به وسیله شبکه آندوپلاسمی خشن ساخته شده و دارای یک ترتیب یا پپتید نشانه است.

این پروتئین به فضای درونی شبکه منتقل می‌شود و در آنجا بالغ می‌گردد (مخصوصاً پدیده قنددار شدن را می‌گذراند) و در فضای حفره‌ها (فولیکول‌ها) جمع می‌شود. در این ناحیه، تیروگلوبولین یُددار می‌شود (یُد به بخش تیروزینی آن متصل می‌شود) و ترکیبی ساخته می‌شود که آن را کلّوئید تشکیل شده از تیروگلوبولین غیرفعال می‌نامند. تحت تأثیر تحریک هورمونی (عملِ آدنوهیپوفیز)، تیروگلوبولین با پدیده مایع‌خواری به درون یاخته‌ها کشیده می‌شود، در حفره‌های تشکیل دهنده قطرات کلّوئیدی درون یاخته‌ای انباشته می‌گردد و سپس به درون لیزوزوم‌های یاخته تخلیه می‌شود. این لیزوزوم‌ها هیدرولازهای خود را از سطح دور کیسه‌های دیکتیوزومی دریافت می‌کنند. در لیزوزوم‌های بالغ، تجزیه تیروگلوبولین انجام می‌شود: قندها، اسیدهای امینه و زنجیره‌های دی‌پپتیدی تیروزین یُددار از آنجا جدا می‌شوند که می‌توانند از لیزوزوم خارج گردند. دی‌پپتیدهای یُددار که هورمون تیروئیدی فعال را تشکیل می‌دهند به غشاء یاخته‌ای در ناحیه قاعده‌ای یاخته‌ها می‌رسند و از آنجا به جریان خون وارد می‌شوند.

بنابراین دراین مورد تولید مولکول‌های غیرفعال زیادی وجود دارد که به کمک یک سیستم تنظیمی از نوع دگرخواریِ تحت کنترل هورمونی موجب تشکیل یک دی‌پپتید فعال می‌شود.

دگرخواری در موارد زیادی موجب ذخیرهٔ موقت مواد اندوخته‌ای می‌شود. در جانوران این پدیده در یاخته‌های تخم صورت می‌گیرد. مواد اندوخته‌ای (ویتلّوژنین) به کمک پدیده مایع‌خواری به درون یاخته کشیده می‌شوند و در دانه‌های ویتلّوسی به‌صورت فسفوپروتئین‌ها ذخیره می‌گردند. این ذخایر به‌طور مستقیم به وسیلهٔ رویان مورد استفاده قرار نمی‌گیرند بلکه در موقع لزوم در لیزوزوم‌ها تجزیه می‌شوند و اسیدهای امینه فسفات‌دار (فسفاته) را آزاد



شکل ۱۰-۷. زیست آمایی (بیوسنتز) تیروگلوبولین، جذب یاخته‌ای و گوارش لیزوزومی (برگرفته ازکارهای LENTZ، ۱۹۷۱).

می‌کنند که به‌طور مستقیم قابل مصرف هستند.

در گیاهان نیز دانه‌ها به همین نحو مواد اندوخته‌ای را ذخیره می‌کنند، برای مثال در دانه‌های آلورون (واکوئل‌های دارای ذخایر پروتئینی که بخش‌بخش شده و آب را از دست داده‌اند) هنگام رویش دانه، جذب آب به وسیله دانه موجب شروع گوارش لیزوزومیِ این ذخایر می‌شود و مواد قابل استفاده برای رویان به وجود می‌آیند.

۲- گوارش بیرون یاخته‌ای

در برخی موارد لیزوزوم‌ها هیدرولازها را به بیرون از یاخته‌ها رها می‌کنند و موجب گوارش بیرون یاخته‌ای مواد می‌شوند. برای مثال یاخته‌های استخوان‌خوار (استئوکلاست‌ها) که در مغز زرد استخوان‌ها وجود دارند با آزاد کردن هیدرولازهای لیزوزومی موجب تخریب یاخته‌های استخوانی (استئوبلاست‌ها و استئوسیت‌ها) می‌شوند و با این عمل مجرای درونی استخوان‌های طویل را از درون و به‌تدریج وسیع کرده، فضای لازم برای گسترش مغز استخوان را فراهم می‌سازند.

۳- پدیده اتولیز

پس از مرگ یاخته، آنزیم‌های لیزوزومی با تخریب غشاء لیزوزوم به سیتوپلاسم رها می‌شوند و موجب تجزیه و تخریب اندامک‌ها و همه ساختارهای یاخته‌ای می‌گردند. پدیده اتولیز گاهی با اهداف زیستی ویژه انجام می‌شود. برای مثال در گیاهان به منظور مبارزه با عوامل بیماریزا (مثلاً قارچ‌ها)، عده‌ای از یاخته‌ها با پدیده اتولیز و رها کردن

آنزیم‌های لیزوزومی موجب نابودی عامل بیماریزا می‌گردند.

۴- دخالت در ایمنی یاخته‌ها

لیزوزوم‌ها یاخته‌ها را در برابر حمله عوامل بیماریزا حمایت می‌کنند. این پشتیبانی هم با عمل دگرخواری بر روی باکتری‌ها، ویروس‌ها، هم با تخریب آنزیم‌های تجزیه‌کننده یاخته‌ها، با تخریب سموم و ترکیبات دارویی (عمل ضدسمی) و هم با پدیده اتولیز انجام می‌شود.

۵- تشکیل ساختمان‌های میلینی

همان گونه که قبلاً شرح داده شد، ساختمان‌های میلینی نوعی از اجسام باقی مانده هستند که محتویات درونی آنها اساساً از ترکیبات فسفولیپوپروتئینی است. به عبارت دیگر این ساختمان‌ها محصولی از تجزیهٔ ناقص فسفولیپوپروتئین‌ها هستند که از مواد سازنده غشاءهای اندامک‌های مختلف می‌باشند.

پدیدار شدن ساختمان‌های میلینی با توجه به وضع آنزیم‌های لیزوزومی پدیده‌ای عادی است زیرا در لیزوزوم‌ها مقدار قابل توجهی از پروتئازها و مقدار کمی لیپازها وجود دارند، به نحوی که بخش پروتئین فسفولیپوپروتئین‌ها هضم می‌شود اما بخش لیپیدی آنها که کمتر دستخوش تغییر می‌گردد، باقی می‌ماند.

مولکول‌های لیپیدی که دارای یک بخش قطبی آب‌دوست هستند، تمایل به تشکیل لایه‌های تک مولکولی دارند. ساختمان‌های میلینی از لایه‌های تک مولکولی موازی با یکدیگر که به‌صورت حلقه‌ها یا لایه‌های متحدالمرکز قرار دارند تشکیل شده‌اند (شکل ۶-۱۰).

۶- تشکیل اجسام باقی مانده با ترکیبات مختلف

اجسام باقی مانده از پدیده‌های دگرخواری یا خودخواری به وسیله لیزوزوم‌های دارای محتویات متفاوتی ایجاد می‌شوند که مهم‌ترین آنها ترکیبات فسفولیپوپروتئینی در ساختمان‌های میلینی، لیپوفوشین‌ها[1]، فریتین، مواد بیگانه باقی مانده و مقداری از فسفاتازهای اسیدی است.

لیپوفوشین‌ها، رنگدانه‌های قهوه‌ای وابسته به گروه کرومولیپوئیدها هستند که از سوخت‌وساز غیر آنزیمی لیپیدها ایجاد می‌شوند.

در اغلب موارد این رنگدانه‌ها در یاخته‌های آسیب‌دیده یا مسّن ایجاد می‌شود و به همین دلیل آنها را «رنگدانه‌های فرسودگی» نامند. تجزیهٔ شیمیایی این رنگدانه‌ها حضور فسفولیپیدها (کلسترول‌تری‌گلیسریدی) و مقدار کمی از پروتئین‌ها را نشان می‌دهد.

۷- دخالت در تشکیل آکروزوم

در بحث نقش زیستی دیکتیوزوم‌ها و دستگاه گلژی (فصل ۹) چگونگی تشکیل آکروزوم را دیده‌ایم. آکروزوم‌ها که عملاً کیسه‌های آنزیمی سرشار از هیدرولازها و به ویژه پروتئازها هستند، در حقیقت نوعی لیزوزوم حجیم هستند که به کمک آنزیم‌های خود در تخریب و هضم لایه شفاف و غشاء اووتیدها یا یاخته‌های تخمکی در محل ورود اسپرماتوزوئیدها نقش دارند و امکان لقاح را فراهم می‌سازند.

1- Lipofuscines

۸- تجمع مواد سمی

لیزوزوم‌ها اندامک‌هایی هستند که در آنها مواد غیرقابل استفاده و گاهی سمی متفاوتی انباشته می‌شوند. برای مثال ترکیبات مختلف جیوه در لیزوزوم‌های اندام‌ها و بافت‌های جانداران دریایی جمع می‌شوند و به همین دلیل استفاده از غذاهای دریایی که از نواحی آلوده به ترکیبات جیوه به‌دست می‌آیند، توصیه نمی‌شود.

۹- دخالت در ایجاد برخی بیماری‌ها

بیماری‌های زیادی در نتیجه تغییر نفوذپذیری و یا تخریب غشاء لیزوزوم‌ها ایجاد می‌شوند که برای مثال به برخی از آنها اشاره می‌شود.

- ***بیماری‌های ناشی از تخریب غشاء لیزوزومی.*** غشاء لیزوزوم‌ها که به دلیل وجود پوشش گلیکوپروتئینی درونی و یا به احتمال دخالت پمپ‌های هیدروژن وابسته به ATP در برابر آنزیم‌های لیزوزومی مقاوم است، تحت تأثیر عوامل گوناگون محیطی (تنش‌های روانی، کمبود اکسیژن، اکسیژن یونی، مواد پُلی‌آنیونی، سموم درونی، ویروس‌ها، ذرات سیلیس، قلع و روی) آسیب می‌بیند و بیماری‌های متفاوتی را موجب می‌شود:

الف- ناراحتی‌های ریوی - این ناراحتی‌ها از تنفس غبار کربن، سیلیس، قلع، روی و مواد مشابه آنها ایجاد می‌شود. این بیماری‌ها در کارگران معدن‌ها، رفتگران، کارگران ساختمانی و افرادی که در محیط‌های پُر آمدوشد و غبار آلود زندگی می‌کنند فراوان است. علایم آن بسیار شبیه سلّ ریوی است و با سرفه، تنگی تنفس، آسیب‌دیدگی و سخت شدن بافت‌های ریه‌ها و التهاب ریه‌ها همراه است.

مارکروفاژهای موجود در ریه‌ها، این ذرات را که ضمن تنفس به ریه‌ها رسیده‌اند با عمل ریزه‌خواری به درون خود می‌کشند، آنزیم‌های لیزوزومی با واسطه لیزوزوم‌های اولیه به حفره‌های ریزه‌خواری تخلیه می‌شوند. غشاء لیزوزوم‌های ثانویه‌ای که به این ترتیب ایجاد می‌گردند تحت تأثیر ذرات درونی آنها تخریب می‌شود و آنزیم‌های لیزوزومی رها می‌گردند. با مرگ ماکروفاژها و رها شدن آنزیم‌ها در خانه‌های ششی، التهاب بافت‌های ریه صورت می‌گیرد که تولید کلاژن در ریه‌ها را تخریب می‌کند. ریه‌ها به وسیله کلاژن پوشیده می‌شوند و این وضع تبادل گازهای تنفسی را دشوار می‌سازد. سیلیکوز[1] که از تنفس ذرات سیلیسی ایجاد می‌شود و آزبستوز[2] که از تنفس ذرات پشم شیشه به وجود می‌آید دو حالت فراوان از این ناراحتی‌های ریوی هستند.

ب- استرپتوکوکسیس - استرپتوکوک‌ها عامل بیماری‌های متفاوتی هستند. استرپتوکوک‌ها توانایی تجزیه و تخریب غشاء لیزوزوم‌ها را دارند. این تخریب موجب رها شدن آنزیم‌های لیزوزومی و مرگ یاخته‌ها می‌شود. یاخته‌های مرده، عوامل بیماریزا را در بافت‌ها و اندام‌ها رها می‌کنند.

ج- بیماری گوت[3] نقرس - این بیماری که در مردان بالغ و زنان یائسه دیده می‌شود، در نتیجه اختلال در سوخت‌وساز پورین‌ها به وجود می‌آید و موجب رسوب بلورهای اورات سدیم در مایع مفصلی می‌گردد. بلورها در نتیجه عمل ریزه‌خواری به وسیله لکوسیت‌ها بلعیده می‌شوند و در واکوئل‌های ریزه‌خواری جمع می‌گردند. این واکوئل‌ها، آنزیم‌های هیدرولازی را از شبکه دور گلژیی دریافت می‌کنند. بین بلورهای اورات و غشاء لیزوزوم‌ها پیوندهای هیدروژنی برقرار می‌گردند که بلورها را

1- Silicose 2- Asbestose 3- Goutte

به‌طور محکمی به غشاء لیزوزوم‌ها می‌بندند. غشاء لیزوزوم‌ها امکان تغییر شکل آزاد خود را از دست می‌دهد و حرکات لوکوسیت‌ها پاره شدن غشاء لیزوزوم‌ها را تحریک می‌کند. آزاد شدن آنزیم‌های لیزوزومی در سیتوپلاسم تخریب یاخته‌ها را به همراه دارد. آنزیم‌هایی که به این ترتیب در مایع مفصلی آزاد می‌شوند، التهاب‌های ویژه و دردناکی را موجب می‌شوند. درمان این بیماری در دوره‌های شدت استفاده از مواد ضدالتهاب از جمله کورتیکوئیدها است که غشاء لیزوزوم‌ها را پایدار می‌کنند و یا استفاده از کولشی‌سین است که با تخریب ریزلوله‌ها از جابه‌جا شدن فاگوسیت‌ها به طرف محل‌هایی که بلورهای اورات وجود دارند، جلوگیری می‌کند.

د- ***آرتریت روماتوئید*** - این بیماری نیز که در نتیجه تخریب غشاء لیزوزوم‌ها و آزاد شدن آنزیم‌های لیزوزومی بروز می‌کند با تورّم و درد مفصل‌ها و سخت شدن رگ‌ها همراه است.

هـ- برخی حالت‌های سخت شدن بافت‌ها (فیبروز) و تولید برخی کیست‌ها مثل کیست زانو یا مچ در فوتبالیست‌ها یا دوندگان می‌تواند محصول فشار زیاد به لیزوزوم‌ها، تخریب غشاء آنها و آزاد شدن هیدرولازها باشد. در چنین مواردی با التهاب و تحریک یاخته‌ها، تولید کلاژن و حالت سختی بافت‌ها، یا تولید کیست بروز می‌کند.

و - همان گونه که دیده‌ایم زندگی در محیط‌های دارای کمبود اکسیژن یا دارای گازکربنیک زیاد و دیگر آلودگی‌های محیطی، تنش‌های روانی، خستگی‌های شدید و مداوم جسمی، مصرف زیاد مواد پروتئینی موجب اسیدی شدن (اسیدوز) محیط داخلی و در نهایت تغییرات pH و افزایش نفوذپذیری غشاء لیزوزوم‌ها می‌شود. در این موارد آنزیم‌های لیزوزومی به یاخته‌ها و محیط داخلی نفوذ کرده، همراه گردش خون به بافت‌ها و اندام‌های مختلف از جمله ماهیچه قلب می‌رسند و موجب برخی سکته‌های قلبی می‌گردند.

■ ***تغییرات غشاء لیزوزومی که دارای منشأ وراثتی هستند.*** برخی ژن‌ها مسئول تولید مواد تشکیل دهنده غشاء لیزوزوم‌ها هستند. نشانگان[1] شادیاک - سترنبرینک - هیگاشی[2] بیماری شناخته شده غشاء لیزوزومی است که منشأ وراثتی دارد. در این بیماری لوکوسیت‌ها دارای محتویات حجیم درونی می‌شوند. آنزیم‌های لیزوزومی حالت عادی دارند اما، غشاء آنها تمایل به ادغام با غشاء لیزوزوم‌های دیگر را دارد. این تمایل موجب تشکیل لیزوزوم‌های حجیمی (غول پیکری) با کناره‌های ناهموار می‌شود که قطر آنها به ۲ تا ۵ میکرومتر می‌رسد. نفوذپذیری غشاء این لیزوزوم‌ها افزایش زیادی دارد. علایم بالینی این نشانگان عبارتند از کاهش مقاومت در برابر عفونت‌ها، بزرگ شدن طحال، بزرگ شدن کبد، تورم گره‌های لنفاوی، نورگریزی و زالی. کودکان مبتلا به این بیماری خیلی زود می‌میرند.

■ ***بیماری‌های ناشی از انباشته شدن مواد در لیزوزوم‌ها.*** این بیماری‌ها که با انباشته شدن بیش از ظرفیت مواد در لیزوزوم‌ها همراه هستند یا منشأ وراثتی دارند و از کمبود یا فقدان یک یا تعدادی از آنزیم‌های لیزوزومی ایجاد می‌شوند و یا اکتسابی هستند.

الف: انباشتن مواد با منشأ ژنتیکی. در این ناهنجاری‌ها، غشاء لیزوزومی طبیعی است، اما ژن یا ژن‌هایی که مسئول تولید آنزیم یا آنزیم‌های لیزوزومی هستند وجود ندارند یا آسیب‌دیده‌اند و یا جهش یافته‌اند.

این بیماری‌ها به ترتیب مراحل نمایشی زیر قابل شرح هستند:

1- Syndrom 2- Chadiak - Streinbrink - Higashi

فقدان یا جهش یک ژن
↓
فقدان یا تخریب یک یا تعداد زیادی آنزیم
↓
کاهش تجزیه یک یا تعداد زیادی از مولکول‌ها
↓
(گوهر مایهٔ آنزیم یا آنزیم‌هایی که وجود ندارند)
↓
انباشته شدن بیش از ظرفیت مواد
↓
نشانه‌های بالینی

برخی نمونه‌های این بیماری‌ها عبارتند از:

- گلیکوژنز تیپ II کاردیومگال. این بیماری نتیجهٔ فقدان آنزیم ۱-۴ آلفا گلوکوزیداز است. این آنزیم مسئول تجزیه گلیکوژن است. فقدان آن موجب انباشته شدن گلیکوژن در لیزوزوم‌ها و متورم شدن آنها می‌شود. این بیماری، بیماری پُمپ نیز نامیده می‌شود. از دیدگاه بالینی، از بدو تولد بیماری با تنگی نفس و دردهای ماهیچه قلب همراه است و کودکان مبتلا اغلب در پایان اولین سال زندگی می‌میرند. از دیدگاه تشریحی، بزرگ شدن ماهیچه قلب، گاهی بزرگ شدن کبد، پر حجمی ماهیچه‌ها همراه با کاهش تونوس عضلانی، بزرگ شدن زبان از نشانه‌های این بیماری هستند.
- در بیماری‌های نیمن‌پیک[1]، گوشر[2]، تی - ساکس[3]، فابری[4]، ولومن[5] و هورلر[6] همانند حالت قبل، موادی که به درون لیزوزوم‌ها نفوذ می‌کنند و گوارش نهایی آنها حضور آنزیم‌هایی را نیاز دارد که در لیزوزوم‌ها وجود ندارند، در این اندامک‌ها انباشته می‌شوند، اندازه لیزوزوم‌ها و سپس تعدادشان افزایش می‌یابد و بخش قابل توجهی از یاخته را اشغال می‌کنند. ناهنجاری‌های ناشی از این وضع زیاد و در یاخته‌های تخصص یافته شدیدترند. برای مثال در بیماری‌های نیمن‌پیک و تی - ساکس بیوسنتز فسفولیپید طبیعی است اما به دلیل فقدان برخی فسفولیپازها، این مواد در لیزوزوم‌ها و به ویژه در لیزوزوم‌های یاخته‌های عصبی انباشته می‌شوند و اختلال‌های حرکتی و روانی شدیدی را ایجاد می‌کنند. در جدول ۱۰-۲ برخی بیماری‌های وابسته به انباشتن مواد که، منشأ وراثتی دارند آورده شده است.

جدول ۱۰-۲

نام بیماری وراثتی	مواد شیمیایی انباشته شونده	آنزیمی که وجود ندارد
گلیکوژنز تیپ II (بیماری پمپ)	گلیکوژن	۱-۴ آلفا گلوکوزیداز
نیمن‌پیک (اسفنگومیلینوز)	اسفنگومیلین	اسفنگومیلیناز
گوشر (گلوکوزیل - سرامید)	بتاگلوکوسِرِبروزید	بتاگلوکوسرِبروزیداز
تی - ساکس (گانگلیوزیدوز GM_2)	گانگلیوزیداز GM_2	هگزوزآمیداز A
فابری تری‌گلیسرول (سرامیدوز)	سرامیدتری هگزوزید	آلفاگالاکتوزیداز

1- Niemann - Pick 2- Gaucher 3- Tay - Sachs 4- Fabry
5- Wolman 6- Hurler

- ***آسیب‌دیدگی‌های اکتسابی.*** در برخی عفونت‌های کلیه‌ای، یاخته‌های لوله‌های خمیدهٔ نزدیک از قطره‌های درشت شفاف پر می‌شوند که لیزوزوم‌های پر شده از پروتئین‌هایی هستند که به دلیل باز جذب بسیار سریع در لوله‌های خمیده نزدیک، فرصت و امکان هضم آنها فراهم نبوده است. این یاخته‌ها تحلیل می‌روند.

لیزوزوم‌ها در یاخته‌های گیاهی و نقش آنها در رویش دانه‌ها

اندامک‌های تک غشایی و دارای آنزیم‌های گوارشی در یاخته‌های گیاهی نیز شناخته شده‌اند. آنزیم‌های موجود در آنها بیشتر شامل: پروتئازهای اسیدی، نوکلئازها و گلیکوزیدازها هستند. در پایه‌های جوان ذرت، واکوئل‌های بزرگ یاخته‌های پارانشیمی دارای تعداد زیادی آنزیم‌های لیزوزومی ویژه یعنی پروتئازها، کربوکسی پپتیدازها، DNAases، RNAases، بتا - آمیلاز، آلفا - گلوکوزیداز و... هستند. دانه‌های آلورون و ذرات نشاسته از مواد ذخیره‌ای موجود در بسیاری از دانه‌ها هستند که هنگام رویش دانه‌ها تغییرات زیادی را می‌گذرانند. این تغییرات به کمک آزاد شدن آنزیم‌های لیزوزومی (مثل آلفا- آمیلاز) است که می‌توانند مواد ذخیره‌ای را برای استفاده گیاهک در حال رشد هیدرولیز کنند. بنابراین لیزوزوم‌های گیاهی در گوارش درون‌یاخته‌ای، برون‌یاخته‌ای و نیز در فرآیندهای رشد و نمو دخالت دارند.

چگونگی تشکیل لیزوزوم‌ها

همان گونه که شرح داده شد اغلب لیزوزوم‌ها (جز تعدادی از واکوئل‌های خودخواری) از جوانه‌زدن بخش (شبکه) دورِ گلژیی (TGN) ایجاد می‌شوند. این حفره‌ها بایستی پروتئین‌های لیزوزومی را در خود جای دهند. سؤال اساسی این است که هیدرولازهای انباشته شده در لیزوزوم‌ها و نیز پروتئین‌هایی که در ساختمان غشاء لیزوزوم‌ها وجود دارند چگونه ساخته می‌شوند و چگونه به‌طور اختصاصی انتخاب شده و به لیزوزوم‌ها می‌رسند.

ساخت پروتئین‌های آنزیمی یا ساختاری لیزوزوم‌ها همانند پروتئین‌های صادراتی به وسیله ریبوزوم‌ها و با دخالت شبکه آندوپلاسمی خشن انجام می‌شود، به کمک یک ترتیب یا پپتید نشانه، پروتئین‌های لیزوزومی از غشاء شبکه خشن می‌گذرند، به درون شبکه می‌رسند و سپس به دستگاه گلژی می‌رسند (شکل ۱۰-۳) و بعد از آن با دو پدیده به لیزوزوم‌ها می‌رسند.

الف: افزوده شدن گیرندهٔ (پذیرندهٔ) مانوز - ۶ - فسفات

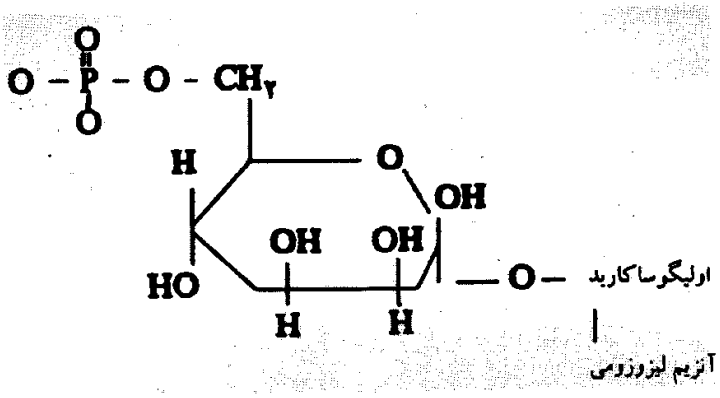
اتصال یک نشانگر به هیدرولازهای لیزوزومی و به عبارت دیگر برچسبی که به این هیدرولازها افزوده می‌شود آدرس دقیق محلی را که بایستی به آن تخلیه شوند برایشان مشخص می‌سازد. این نشانگر (برچسب) ظاهراً برای همه هیدرولازها، مانوز - ۶ - فسفات (M6P) است که، به‌صورت یک مانوز انتهایی است که بر روی آن گروه فسفات متصل شده و به اولیگوساکاریدهای این پروتئین‌ها (هیدرولازها) چسبیده است (شکل ۹-۱۰). اتصال این برچسب خیلی زود و از محل کیسه‌های سطح نزدیک دیکتیوزوم‌ها انجام می‌شود (شکل ۹-۱۰).

پروتئین‌هایی که به این ترتیب برچسب خورده‌اند به وسیله گیرنده‌های مکملی (اختصاصی) که در غشاء دیکتیوزوم‌ها جای دارند و به سوی سطح درونی کیسه‌ها قرار گرفته‌اند، شناسایی می‌شوند. پس از رسیدن پروتئین‌های لیزوزومی به درون کیسه‌های دیکتیوزومی و به دنبال فسفوریلاسیون و انتقال به کیسه‌های سطح دور، گیرنده‌های این پروتئین‌ها در سطح دور گلژیی، در جایگاه‌های جوانه‌زدن و تشکیل حفره‌های پوشش‌دار متراکم

می‌شوند و پروتئین‌های برچسب‌دار لیزوزومی را به خود می‌گیرند (شکل ۹-۱۰)، به این ترتیب حفره‌های پوشش‌دار اختصاصی برای انتقال پروتئین‌های لیزوزومی تشکیل می‌شوند. این حفره‌ها ضمن جابه‌جایی، پوشش خود را از دست می‌دهند و به سوی لیزوزوم‌ها هدایت شده با آنها ادغام می‌شوند. این مرحله نیز با دخالت پروتئین‌های شناساگر ویژه (نشانه‌گذار پایدارکننده + گیرندهٔ نشانه‌گذار و پایدارکننده) انجام می‌شود که امکان می‌دهند غشاءها یکدیگر را بشناسند و با هم ادغام شوند (شکل ۹-۱۰).

ب: شناوری گیرنده‌های مانوز - ۶ - فسفات (M6P)

پس از ادغام حفره‌ها با غشاء لیزوزوم‌ها، هیدرولازها از گیرنده‌های غشایی جدا می‌شوند، در درون لیزوزوم رها می‌گردند و در این محل می‌توانند بر گوهرمایه‌ها (سوبستراها) «حمله کرده» و آنها را هیدرولیز کنند. این جدایی در نتیجه pH درونی لیزوزوم‌ها امکان‌پذیر می‌گردد. تجربه‌های در شیشه نشان داده‌اند که گیرنده‌ها در pH برابر هفت به اولیگوساکاریدهای اختصاصی می‌چسبند و در pH برابر ۶ شروع به تفکیک می‌کنند (به خاطر بیاوریم که pH درونی لیزوزوم‌ها حدود ۵ است). هیدرولازها ممکن است در حفره‌های پیش لیزوزومی که محتوای اسیدی دارند، از گیرنده‌ها جدا شوند (شکل ۸-۱۰).



شکل ۸-۱۰. مانوز - ۶ - فسفات، نشانگر پروتئین‌های لیزوزومی

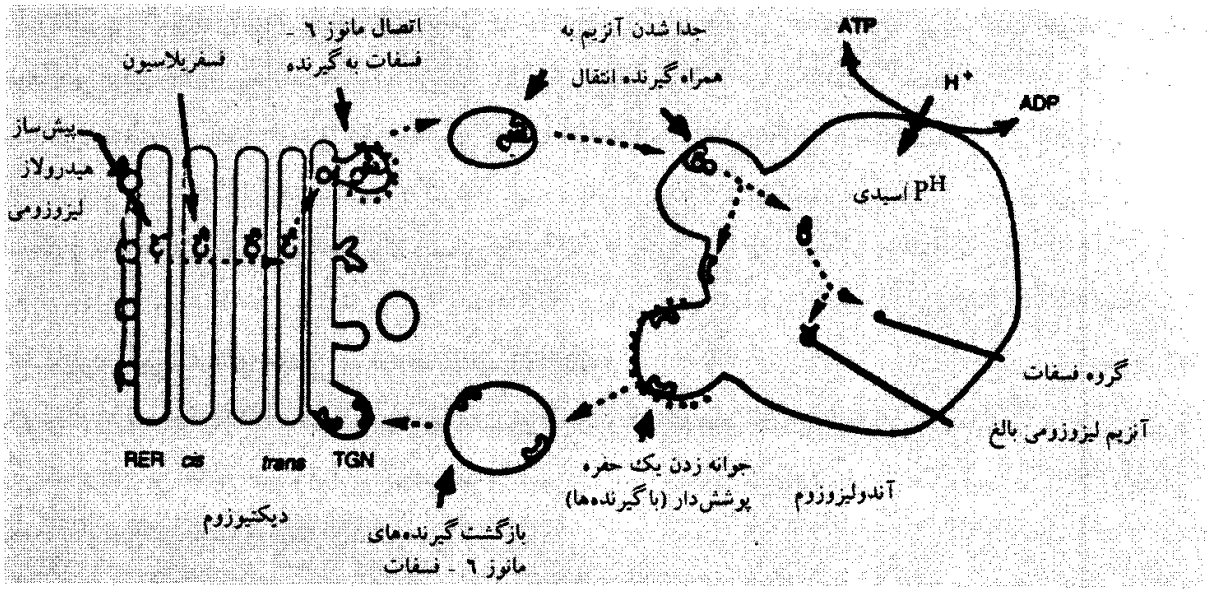
گیرنده‌های مانوز - ۶ - فسفات پس از جدا شدن از هیدرولازها، در بخشی از لیزوزوم‌ها که از کلاترین پوشیده شده است جمع می‌شوند، سپس این بخش جوانه می‌زند و یک حفره پوشش‌دار را به وجود می‌آورد. ضمن جابه‌جایی، حفره‌های پوشش‌دار، پوشش کلاترینی خود را از دست می‌دهند و می‌توانند دوباره با غشاء کیسه‌های دیکتیوزومی در بخش دور گلژی (بخش TGN) ادغام شوند و به این ترتیب چرخهٔ مجدد گیرنده‌ها را امکان‌پذیر سازند.

علاوه بر روندی که برای تشکیل لیزوزوم‌ها شرح داده شد، در بحث واکوئل‌های خودخواری به‌عنوان نوعی از لیزوزوم‌های ثانویه دیدیم که از تجمع و سازمان یافتن قطعاتی از شبکه آندوپلاسمی (شکل ۱۰-۳) و یا از به درون رفتن غشاء برخی حفره‌های سیتوپلاسمی و واکوئل‌ها (شکل ۱۰-۳) نیز لیزوزوم‌ها تشکیل می‌شوند.

ناحیه GERL[1] و تشکیل لیزوزوم‌ها

غشاءهای گلژیی علاوه بر تجمع مواد ترشحی و تأمین یک غشاء محدودکننده برای ذرات زیموژن، عامل تشکیل لیزوزوم‌های اولیه نیز هستند. این عمل ترتیب قبلی مورد بحث یعنی: تولید، آمایش، انتقال و انباشتن آنزیم‌ها را شامل می‌شود. چون بسیاری از آنزیم‌های لیزوزومی از گلیکوپروتئین‌ها هستند، دستگاه گلژی قنددارکردن

1- Golgi Endoplasmic reticulum lysosome.



شکل ۱۰-۹. تولید هیدرولازهای لیزوزومی، راه‌یابی به لیزوزوم‌ها، تخلیه و چرخه مجدد گیرنده‌های مانوز - ۶ - فسفات.

(گلیکوزیلاسیون) این آنزیم‌ها را نیز عهده‌دار است.

ناحیه GERL را اغلب به سطح بلوغ دستگاه گلژی اطلاق می‌کنند که در آن یک فسفاتاز اسید، آنزیم ویژه لیزوزوم‌ها وجود دارد. این ناحیه نقش اساسی را در تشکیل لیزوزوم‌های اولیه به عهده دارد. چگونگی انتقال برای پروتئین‌های ترشحی و پروتئین‌های لیزوزومی مشابه است، بنابراین می‌توان نوعی کنترل را برای هدایت مواد به سوی هدف نهایی آنها در نظر گرفت، برای مثال به سوی ذرات زیموژن و لیزوزوم‌ها. این تنظیم آمدوشد که چگونگی آن هنوز به‌طور کامل شناخته نشده است، در دستگاه گلژی وجود دارد (دیده‌ایم که برچسب مانوز - ۶ - فسفات در انتقال پروتئین‌های آنزیمی و ساختاری لیزوزوم‌ها نقش نشانه‌گذار اساسی دارد).

بنا به نظر نویکوف، ناحیه GERL در دستگاه گلژی می‌تواند نقشی را در تشکیل ذرات ملانین، تولید وانباشتن مواد ترشحی یاخته‌های درون‌ریز و برون‌ریز و سوخت‌وساز لیپیدها بازی کند.

خلاصه

واژه لیزوزوم مجموعه‌ای از اندامک‌ها (لیزوزوم‌های اولیه، ثانویه، اجسام باقی مانده) را شامل می‌شوند که محتوای هیدرولازی آنها، تجزیه مواد متنوعی در درون لیزوزوم‌ها و در مواردی در خارج از آنها را موجب می‌شود. آنزیم‌های لیزوزومی پروتئین‌ها را به دی‌پپتیدها و قندها را به اوزها تجزیه می‌کنند. برخی دی‌ساکاریدها (ساکارز) و پلی‌ساکاریدها (اینولین، دکستران) گوارده نمی‌شوند و در لیزوزوم‌ها باقی می‌مانند. لیزوزوم‌ها با عمل خودخواری، بازسازی ساختارها و اندامک‌های یاخته‌ای را لازم می‌سازند. هنگام نموّ، لیزوزوم‌ها در تغییرات بافت‌ها (برای مثال حذف دم در تراد، تحلیل رفتن مجاری ولف[1] و مولر) دخالت می‌کنند. گوارش مواد برون یاخته‌ای، آزاد شدن لیزوزوم‌های اولیه به وسیله دفع یاخته‌ای (برای مثال مورد استئوکلاست‌ها) را نیاز دارد. تجزیه بافت‌های استخوانی به کمک ویتامین A و هورمون‌های پاراتیروئیدی فعال می‌شود. در آرتریت روماتوئید، آنزیم‌های لیزوزومی غضروف‌ها را تجزیه می‌کنند. کرینوفاژی[2] پدیده‌ای است که حذف ذرات ترشحی را امکان‌پذیر می‌سازد. آکروزوم اسپرماتوزوئید که در منطقه گلژیی گسترش می‌یابد، لیزوزومی ویژه است که در پدیده لقاح دخالت می‌کند.

1- Wolff 2- Crinophagy

غشاء لیزوزوم‌ها در برابر آنزیم‌های درونی لیزوزوم‌ها مقاوم است. این مقاومت به پوشش درونی گلیکوپروتئینی غشاء، و یا به احتمال وجود پمپ‌های پروتون وابسته به ATP که PH مجاور به بخش درونی غشاء را به شدت اسیدی می‌کنند وابسته است.

عوامل متفاوتی بر غشاء لیزوزوم‌ها اثر دارند. عوامل مختلف مکانیکی (ضربه، فشار مکانیکی شدید)، عوامل فیزیکی (سرمای شدید، گرمای شدید و تغییرات شدید دما، پرتوهای فرابنفش، اشعه X)، عوامل شیمیایی (ویتامین‌های محلول در چربی‌هایعنی ویتامین‌های A، D، K، E؛ سموم، سموم درونی، مواد دارویی)، عوامل هورمونی (هورمون‌های جنسی استروئیدی) بر غشاء لیزوزوم‌ها اثر تخریبی دارند و یا نفوذپذیری آن را افزایش داده به رها شدن آنزیم‌های لیزوزوم‌ها اثر تخریبی دارند و یا نفوذپذیری آن را افزایش داده به رها شدن آنزیم‌های لیزوزومی کمک می‌کنند و برخی مواد از جمله الکالوئیدها و هورمون‌هایی مثل کورتیزون و هیدروکورتیزون که اثر ضدالتهابی دارند موجب پایداری غشاء لیزوزوم‌ها می‌گردند.

همهٔ عوامل وراثتی یا محیطی که بتوانند موجب اختلال در عمل لیزوزوم‌ها گردند، موجب بروز ناهنجاریهایی می‌شوند که می‌توانند به بروز نوعی بیماری یا نشانگان شدید منجر شوند.

بررسی لیزوزوم‌ها به‌خصوص در پزشکی اهمیت زیادی دارد. لیزوزوم‌ها در بروز آرتریت روماتوئید، سیلیکوز، آزبستوز و نقرس نقش اساسی دارند. لیزوزوم‌های لوکوسیت‌ها و مونوسیت‌ها در دفاع در برابر باکتری‌ها و ویروس‌ها اهمیت زیادی دارند. حدود ۲۰ بیماری مادرزادی از نوع انباشتن مواد وجود دارد که در آنها مواد (از جمله گلیکوژن، گلیکولیپیدها، فسفولیپیدها و...) در لیزوزوم انباشته می‌شوند. این بیماری‌ها از فقدان برخی آنزیم‌های لیزوزومی ایجاد می‌شوند (جدول ۱۰-۲).

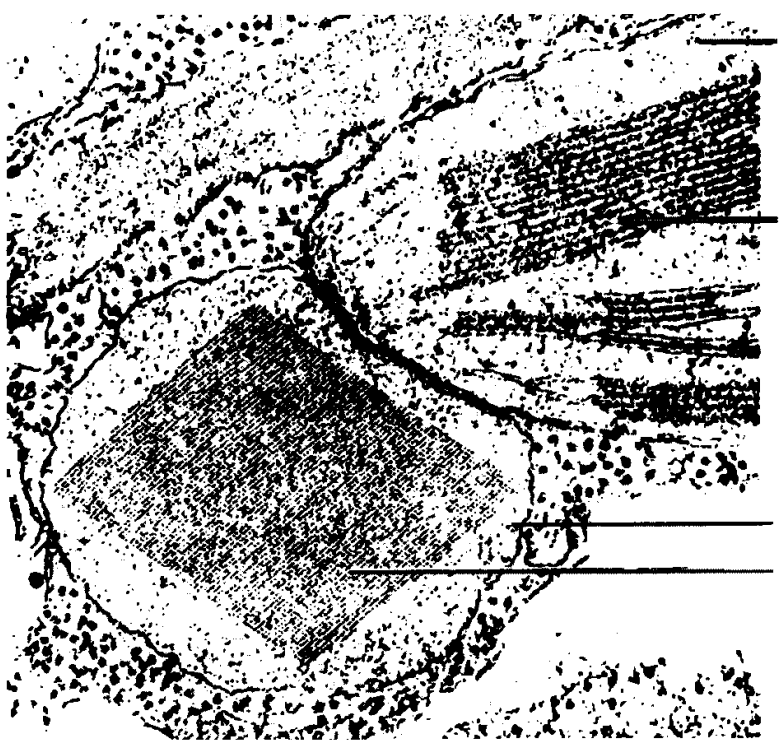
لیزوزوم‌ها در یاخته‌های گیاهی نیز وجود دارند. هنگام رویش دانه، لیزوزوم‌ها برحسب هیدرولیز پروتئین‌های ذخیره‌ای و نشاسته دانه‌ها می‌شوند و امکان رویش دانه‌ها را فراهم می‌سازند.

آنزیم‌های لیزوزومی در پروتئین‌های ساختاری لیزوزوم‌ها با دخالت ریبوزوم‌ها و شبکه آندوپلاسمی خشن ایجاد می‌شوند و پس از گذرانیدن تغییرات لازم و به کمک برچسب مانوز - ۶ - فسفات به سوی منطقه دور گلژیی که محل جوانه‌زدن حفره‌های لیزوزومی است هدایت می‌شوند.

میکروبادی‌ها[1]

واژه "میکروبادی" از سال‌ها قبل برای نامیدن اجزای یاخته‌ای گوناگونی شامل حفره‌های کوچک سیتوپلاسمی، واکوئل‌های کوچک، حفره‌های حاصل از به درون برگشتگی غشاء یاخته و اندامک‌هایی مثل پراکسیزوم‌ها[2] و گلی‌اکسیروزم‌ها[3] به کار برده می‌شد. هم‌اکنون این واژه بیش‌تر در مورد اندامک‌های کوچک تک غشایی به قطر ۰/۵ تا ۱/۵ میکرومتر و دارای آنزیم‌های فلاوین اکسیداز و کاتالاز به کار می‌رود. در مادهٔ زمینه‌ای دانه‌دار این اندامک‌ها گاهی محتویات بلوری یا شبه بلوری دیده می‌شود (شکل ۱۰-۱۰). میکروبادی‌ها از نظر شکل ظاهری، ساختار، ترکیب شیمیایی و عملکرد، در یاخته‌ها، بافت‌ها و گونه‌های متفاوت جانداران، تنوع زیادی دارند. مهم‌ترین انواع میکروبادی‌ها عبارتند از پراکسیزوم‌ها و گلی‌اکسیزوم‌ها.

1- Microbodies 2- Peroxysome 3- Glyoxysome



شکل ۱۰-۱۰. ریزنگار الکترونی از محتوی بلوری پراکسیزوم (میکروبادی) در یاخته برگ گیاه توتون، پراکسیزوم به کلروپلاست چسبیده است.

پراکسیزوم‌ها

در سال ۱۹۵۲ تویکوف[1] اندامک‌های کوچکی با قطر حدود ۰/۱۵ تا ۰/۱۷ میکرومتر را از یاخته جدا کرد که توانایی اکسیدکنندگی شدیدی داشتند و آنها را میکروپراکسیزوم نامید. در سال ۱۹۵۴ رودین[2] ویژگی‌های میکروبادی‌های جدا شده از بافت کلیهٔ موش را شرح داد و در سال ۱۹۶۵ دودوو نشان داد که میکروبادی‌های کبد موش دارای تعدادی اکسیداز هستند که می‌توانند اتم‌های هیدروژن را به اکسیژن مولکولی انتقال دهند و موجب تشکیل پراکسید هیدروژن گردند او واژهٔ پراکسیزوم را برای نامیدن این اندامک‌ها به کار گرفت.

فراساختار و ویژگی‌های پراکسیزوم‌ها

پراکسیزوم‌ها اندامک‌های تک غشایی موجود در یاخته‌های گوناگون جانوری و گیاهی هستند که قطری بین ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ میکرومتر دارند و فعالیت اکسیدازی و پراکسیدازی شدیدی دارند. این اندامک‌ها بسیار کوچک‌تر از میتوکندری‌ها هستند و دارای برخی بخش‌های دائمی (موجود در همه پراکسیزوم‌ها، شامل غشاء و ماده زمینه‌ای) و بخش‌هایی غیردائمی هستند که در همه پراکسیزوم‌ها وجود ندارند مثل نوکلئوئید و صفحه حاشیه‌ای[3].

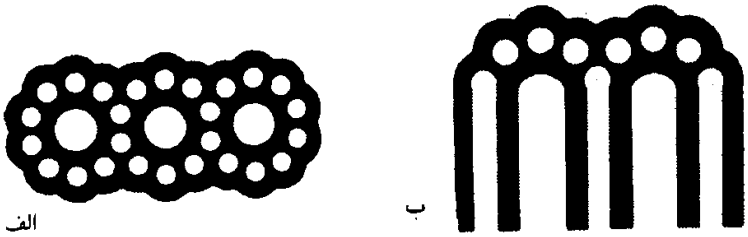
غشاء. در شرایط متعارف تثبیت، غشاء پراکسیزوم‌ها سه لایه‌ای، مشابه با پلاسمالم است که اطراف پراکسیزوم‌ها را می‌پوشاند؛ ضخامت آن ۶ تا ۸ نانومتر است. این غشاء با غشاء شبکه آندوپلاسمی صاف به وسیله بخش‌های لوله‌ای اغلب چین‌خورده‌ای در ارتباط است.

ماده زمینه‌ای. درون پراکسیزوم را پر می‌کند، همگن یا دارای ذرات بسیار ریز است، تا حدی متراکم نسبت به دسته‌های الکترون است و گاهی دارای رشته‌های منشعب به طول ۴ تا ۴/۵ نانومتر می‌باشد.

نوکلئوئید یا کریستالوئید. مرکز بسیاری از پراکسیزوم‌های یاخته‌های جانوری به وسیلهٔ ساختاری متراکم به نام

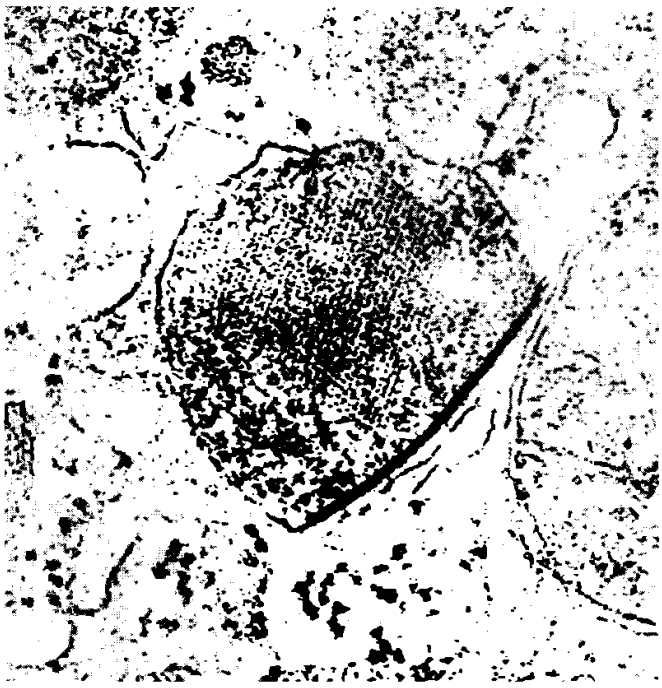
1- Novikoff 2- Rodin 3- Marginal plaque

نوکلئوئید اشغال شده است. این جزء در راسته نخستین‌ها[1] (لمورها، میمون‌ها و انسان‌ها) وجود ندارد. نوکلئوئید ساختاری دارای یک یا چند لوله است (شکل ۱۰-۱۱). واحد ساختاری آن را لوله اولیه نامند. طرز قرارگرفتن لوله‌ها متفاوت است: ممکن است لوله‌ها به شدت متحد شده و ساختاری متراکم را بسازند (همانند یک دسته کوچک چوب کبریت) و یا در اطراف یک لوله مرکزی مجتمع شده و دیواره یک لوله ثانوی را تشکیل دهند. در نوکلئوئیدهای پراکسیزوم‌های کبد موش، هر لوله اولیه قطر داخلی حدود ۳ تا ۴/۵ نانومتر و ضخامت جداره حدود ۴ نانومتر دارد. این لوله‌ها به‌صورت دسته‌های اغلب ده‌تایی در اطراف یک لوله مرکزی مجتمع شده‌اند که قطر آن حدود ۹/۵ تا ۱۱/۵ نانومتر است (شکل ۱۰-۱۱ الف و ب). همهٔ پراکسیزوم‌ها بخش نوکلئوئید را ندارند و گاهی پراکسیزوم‌های فاقد نوکلئوئید را میکروپراکسیزوم می‌نامند.



شکل ۱۰-۱۱. ساختار نوکلئوئید (کریستالوئید) در پراکسیزوم‌های یاخته‌های کبدی موش، این نوکلئوئیدها از دسته‌های استوانه‌ای موازی با دو قطر متفاوت تشکیل شده‌اند. درشت‌نمایی الف: ۶۶۰۰۰۰× و ب: ۸۸۰۰۰۰× (برگرفته از کارهای H.SWIFT , Z.HRUBAN)

صفحه حاشیه‌ای. ساختاری مسطح، ضخیم بدون انشعاب است که با فاصله کم و روشنی (کم‌تراکمی) از سطح درونی غشاء پراکسیزوم قرار گرفته است. صفحه حاشیه‌ای در پراکسیزوم‌های یاخته‌های کبد و کلیهٔ تعداد زیادی از نخستیی‌ها و جانوران دیگر دیده می‌شود ولی وجود آن همیشگی نیست (در همه گونه‌ها وجود ندارد). صفحه حاشیه‌ای نسبت به الکترون‌ها بسیار متراکم است، همگن و تا حدّی ضخیم‌تر از غشاء پراکسیزوم می‌باشد (حدود ۸/۵ نانومتر). شکل ۱۰-۱۲ وضع صفحه حاشیه‌ای را در یک پراکسیزوم نشان می‌دهد.



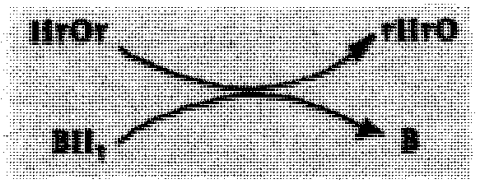
شکل ۱۰-۱۲. پراکسیزوم با مادهٔ زمینه‌ای دارای کریستالوئید و یک صفحه حاشیه‌ای (۸۶۰۰۰×) (برگرفته از کارهای Z.HRUBAN و M.RECIIEIGL).

آنزیم‌های پراکسیزومی. مهم‌ترین آنزیم‌های پراکسیزومی عبارتند از:

۱- کاتالاز که تجزیهٔ پراکسید هیدروژن (آب اکسیژنه) و تبدیل آن به آب را بنا به دو مکانیسم متفاوت موجب می‌شود:

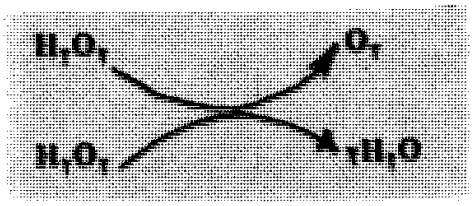
یکی روش پراکسیدازی که نیاز به یک «دهنده هیدروژن» یعنی ماده‌ای احیا شده (BH_2) دارد.

1- Primates



گوهر مایهٔ (سوبسترای) BH2 اکسید می‌شود و به مادهٔ B تبدیل می‌گردد.

دیگری روش کاتالازی که در آن دهنده الکترون مولکول دیگری از پراکسیداز هیدورژن است.



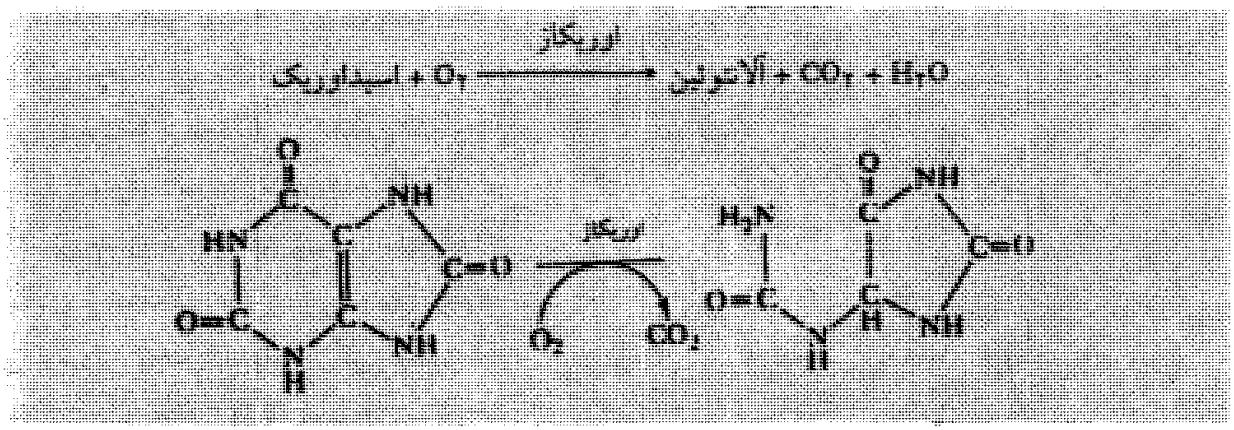
انجام هر یک از این دو نوع واکنش را برخی شرایط وابسته به مقدار کاتالاز، گوهرمایه و H_2O_2 مساعد می‌کند.

۲- L - آلفاهیدروکسی اسید اکسیداز که واکنش زیر را موجب می‌شود:

$$2RCHOH + O_2 \longrightarrow 2RCO - COOH + H_2O$$

۳- D - آمینو اسیداکسیداز، به روشی اختصاصی که هنوز به خوبی شناخته نشده است بر D - آمینو اسیدها عمل می‌کند. این اسیدها در راسته نخستین‌ها وجود ندارند.

۴- اوریکاز[1] (اورات اکسیداز). در نوکلئوئید جای دارد و تجزیه تدریجی اسیداوریکی را که از کاتابولیسم پورین‌ها ایجاد شده است بنا به واکنش زیر موجب می‌شود.



این واکنش تقریباً در تمام پستانداران جز در نخستین‌ها، انجام می‌شود.

۵- گلی‌کولیک (گی کولات) اکسیداز که، به ترتیبی که خواهیم دید، هنگام تنفس نوری، موجب اکسایش اسید گلی‌کولیک حاصل از فتوسنتز می‌شود.

آنزیم‌های دیگری که در پراکسیزوم‌ها شناخته شده‌اند عبارتند از: اسیل‌کوآاکسیداز، پلی‌آمین‌اکسیداز، بتاهیدروکسی‌اسیداکسیداز، NADH - گلی‌اکسیلات‌ردوکتاز، NADP - ایزوسیترات دهیدروژناز.

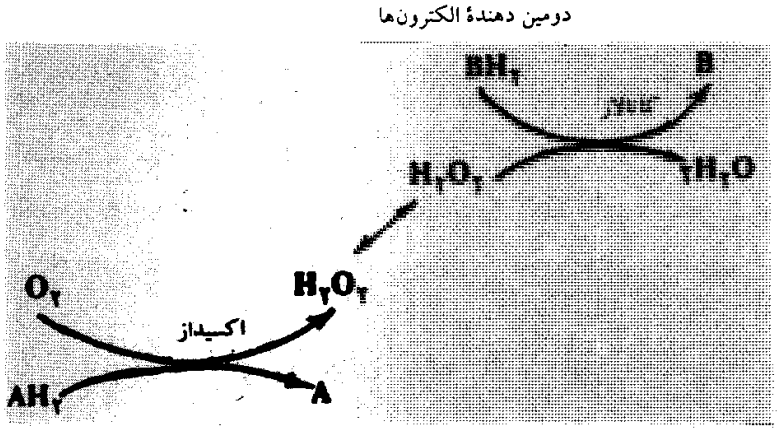
نقش زیستی پراکسیزوم‌ها

۱- ***کاتابولیسم پورین‌ها.*** نوکلئازهای اختصاصی، نوکلئوتیدهای حاصل از هیدرولیز اسیدهای نوکلئیک را به نوکلئوزیدها و سپس به بازهای پورینی و پیریمیدینی تجزیه می‌کنند. این بازها دوباره در تولید اسیدهای نوکلئیک مورد استفاده قرار می‌گیرند، یا تجزیه می‌شوند. این تجزیه وابسته به گروه آنزیمی پراکسیزومی است.

1- Uricase

در انسان این تجزیه‌ها در حدّ اسیداوریک متوقف می‌شوند (به دلیل نبود اوریکاز)، در حالی که در پرندگان و دوزیستان و جاندارانی که دارای اوریکاز هستند، این تجزیه‌ها تا تشکیل اوره پیش می‌روند. تبدیل اسیداوریک به اوره به وسیله اوریکاز نوعی عمل ضدسمی است زیرا سمّیت اوره کمتر از اسیداوریک است.

۲- ***تنظیم کاتابولیسم گلوکز.*** پراکسیزوم‌ها مقدار کمی انرژی ایجاد می‌کنند (به شکل گرما): این انرژی برای اکسایش $NADH_2$ به NAD به کمک انتقال الکترون‌ها به صورتی که در طرح زیر نشان داده شده است مورد استفاده قرار می‌گیرد.



اولین دهندهٔ الکترون‌ها (اورات)
L- آلفاهیدروکسی اسیدها
D- آمینواسیدها
L- آمینواسیدها

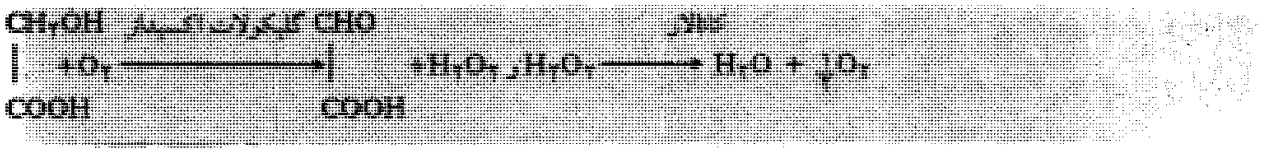
آلوئیدها — الکل
فنل‌ها
کینن‌ها — اسید فرمیک
CO_2
NO_3^-

به این ترتیب با به‌دست آمدن مقداری NAD که تجزیه گلوسیدها به پیرووات را کنترل می‌کند پراکسیزوم‌ها کاتابولیسم گلوسیدها را تنظیم می‌کنند.

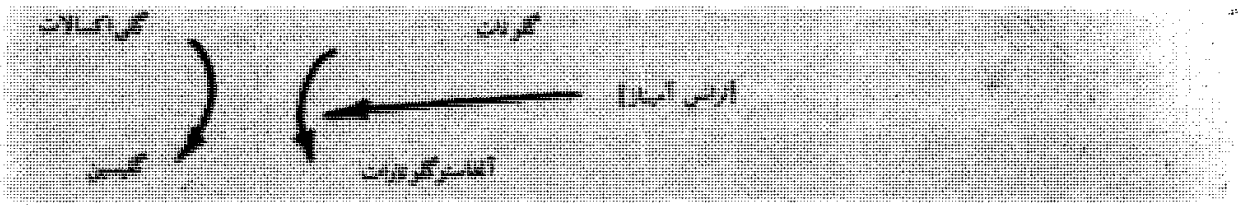
۳- ***متابولیسم لیپیدها.*** پراکسیزوم‌ها همانند میتوکندری‌ها در بتا - اکسیداسیون اسیدهای چرب سهم دارند. پراکسیزوم‌ها ریشه‌های استیل (CH_3CO) ایجاد می‌کنند که باکوآنزیم‌آ به‌هم می‌پیوندند (استیل‌کوآنزیم‌آ). این ترکیب به میتوکندری‌ها انتقال می‌یابد و در مسیرهای متفاوت سوخت‌وسازی مورد استفاده قرار می‌گیرد. پراکسیزوم‌ها مخصوصاً در سوخت‌وساز اسیدهای چرب دارای زنجیره‌های بلند هیدروکربنی و نیز تولید فسفولیپید پلاسمالوژن‌ها نقش دارند. حدود ۵۰ درصد از سوخت‌وسازهای اسیدهای چرب در پراکسیزوم‌ها انجام می‌شود. ترکیب دارویی کلوفیبرات[1] که هنگام کمبود لیپوپروتئین‌های سرم خون تجویز می‌شود، تشکیل پراکسیزوم‌ها را القا می‌کند و توان سوخت‌وساز اسیدهای چرب را افزایش می‌دهد.

۴- ***دخالت در تنفس نوری***[2]. گیاهان سبز در برابر نور علاوه بر فتوسنتز، فرآیند تنفس نوری را انجام می‌دهند که نتیجهٔ همکاری سه اندامک کلروپلاست، پراکسیزوم و میتوکندری است. با تابش نور، در کلروپلاست و در شرایطی که مقدار اکسیژن زیاد باشد آنزیم ریبولوزبیس فسفات کربوکسیلاز - اکسیژناز می‌تواند اکسیژن‌دار کردن ریبولوزبیس فسفات به ۳ - فسفوگلیسرات و ۲ - فسفوگلیکولات را هدایت نماید. در مادهٔ زمینه‌ای کلروپلاست، این فسفوگلیکولات پلاست را به سوی پراکسیزوم ترک می‌کند. در پراکسیزوم، با دخالت آنزیم گلیکولات اکسیداز و با مصرف اکسیژن گلیکولات به گلی‌اکسالات تبدیل می‌شود. ضمن این واکنش پراکسیدهیدروژن تولید می‌شود که بلافاصله به وسیله کاتالاز تجزیه می‌شود.

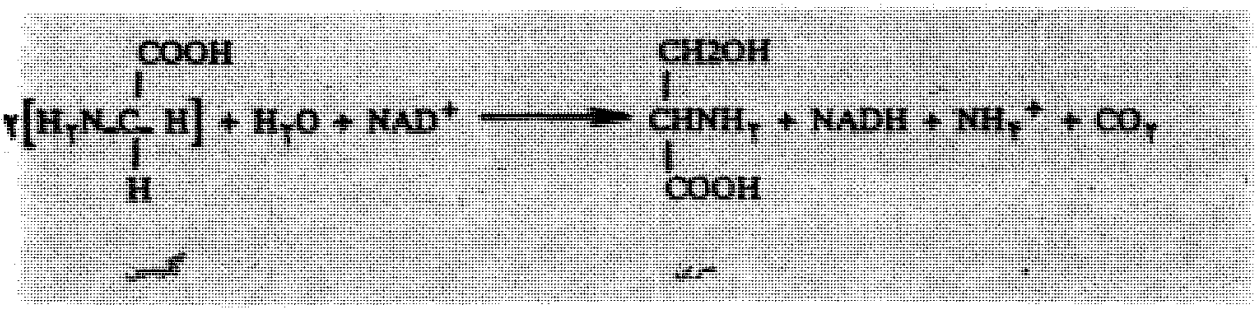
1- Clofibrate 2- Photorespiration



سپس با دخالت ترانس آمینازها، گلی‌اکسالت به گلیسین تبدیل می‌شود:

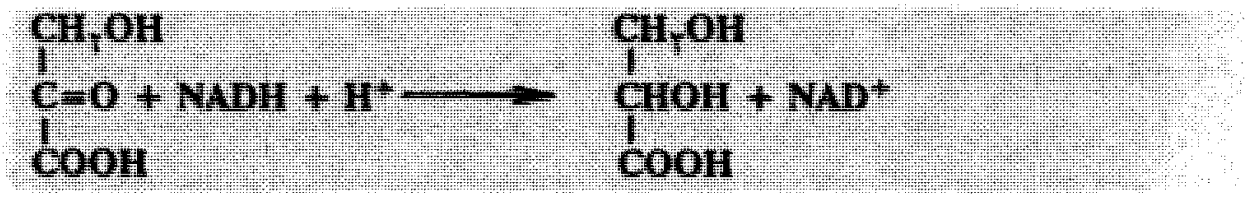


گلیسین به میتوکندری منتقل می‌شود و در میتوکندری دو مولکول گلیسین (C_2) به سرین (C_3) تبدیل می‌شوند و یک مولکول CO_2 و NH_3 تولید می‌نمایند. و NAD^+ نیز احیا می‌شود.



سرین تولید شده به پراکسیزوم برمی‌گردد. در پراکسیزوم یک ترانس‌آمیناسیون جدید با آلفاستوگلوتارات انجام می‌شود که گلوتامات و هیدروکسی پیرووات ایجاد می‌کند.

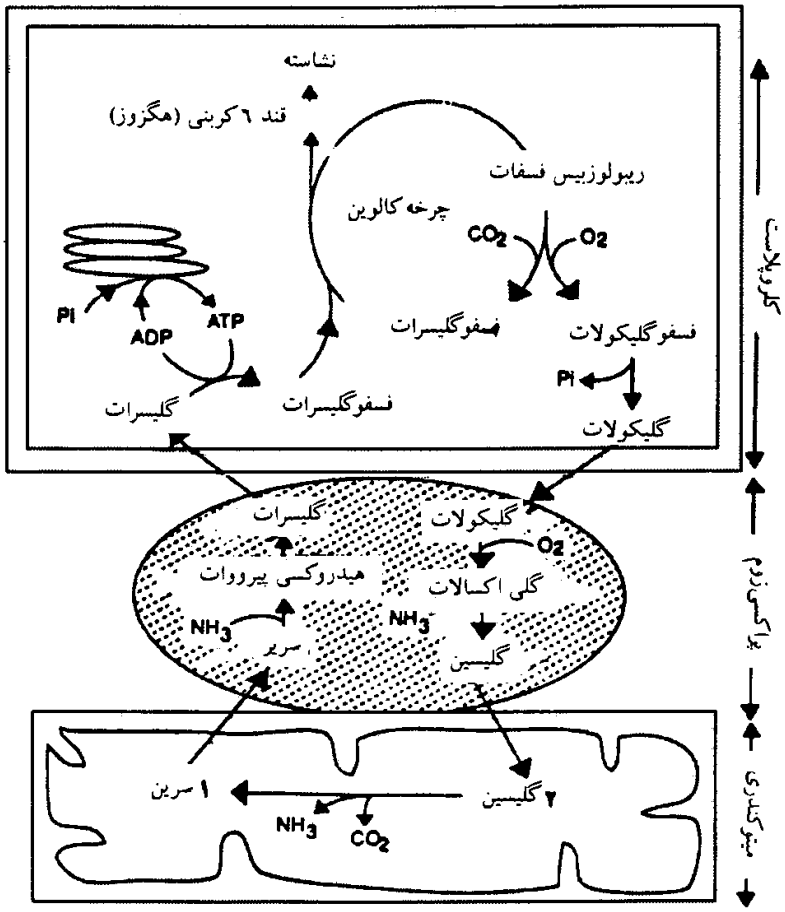
هیدروکسی پیرووات به سرعت به گلیسرات احیا می‌شود که، به کلروپلاست برمی‌گردد.



در کلروپلاست این گلیسرات فسفوریله می‌شود و به فسفوگلیسرات تبدیل می‌گردد که، به چرخه کالوین وارد می‌شود.

در جریان این واکنش‌ها، اکسیژن مصرف می‌شود (ابتدا هنگام شکستن ریبولوزبیس فسفات و سپس هنگام اکسیداسیون گلیکولات به گلی‌اکسالات) و هنگام تشکیل سرین در میتوکندری، دی‌اکسیدکربن تولید می‌گردد. بنابراین تبادلات گازی انجام شده در این واکنش‌ها شبیه تنفس است. شکل ۱۰-۱۳ طرح کلی تنفس نوری را نشان می‌دهد.

چگونگی تشکیل *پراکسیزوم‌ها*. پراکسیزوم‌ها وابستگی زیادی با شبکه آندوپلاسمی دارند و به همین دلیل تصور گذشته این بود که پراکسیزوم‌های یاخته‌های جانوری و گیاهی از شبکه آندوپلاسمی منشأ می‌گیرند و آنزیم‌های آنها به وسیله ریبوزوم‌های متصل به شبکه آندوپلاسمی خشن ساخته می‌شوند.



شکل ۱۰-۱۳. متابولیسم اسیدگلیکولیک، مصرف اکسیژن و تولید CO_2 در تنفس نوری. همکاری بین کلروپلاست، پراکسیزوم و میتوکندری.

بررسی‌های زیادی در یاخته‌های کبدیِ رویانی و نیز در یاخته‌های بالغ با استفاده از ۳، ۳ - دی‌آمینوبنزیدین (DAB) برای پی بردن به منشأ پراکسی‌زوم‌ها و پراکنش آنها در یاخته‌ها انجام شده است. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهند که پراکسیزوم‌ها از جوانه‌زدن شبکه آندوپلاسمی صاف ایجاد می‌شوند. غشاء پراکسیزوم‌ها با دخالت شبکه آندوپلاسمی خشن که هم پروتئین‌ها و هم لیپیدها را می‌سازد، گسترش می‌یابد. پروتئین‌های ماده زمینه‌ای و اغلب آنزیم‌های پراکسیزومی به وسیله ریبوزوم‌های آزاد سیتوپلاسمی تشکیل می‌شوند و به آرامی به پراکسیزوم‌ها می‌رسند. کاتالاز نیز به وسیلهٔ ریبوزوم‌های آزاد سیتوپلاسمی، به‌صورت یک ترکیب پیش‌ساز (آپومونومر) تشکیل می‌شود که پس از ورود به پراکسیزوم‌ها در ماده زمینه‌ای به‌صورت تترامر در می‌آید که آن را آپوکاتالاز نامند. آپوکاتالاز با هِم می‌پیوندد تا کاتالاز را به وجود آورد. اوریکاز نیز از فعالیت ریبوزوم‌های آزاد سیتوپلاسم تشکیل می‌شود.

در عده‌ای از ریزنگارهای الکترونی، پراکسیزوم‌ها به‌صورت دسته‌ها یا خوشه‌هایی دیده می‌شوند که گاهی حالت دمبلی شکل دارند. بر روی پراکسیزوم‌ها در بیش‌تر موارد، زایده‌ای وجود دارد که به احتمال پراکسیزوم‌ها را به همدیگر متصل می‌کند. اتصال دائمی یا موقت بین پراکسیزوم‌ها، ساختاری را ایجاد می‌کند که آن را «شبکه پراکسیزومی[1]» می‌نامند. پراکسیزوم‌های جدید ممکن است از جوانه‌زدن شبکه پراکسیزومی به وجود آیند.

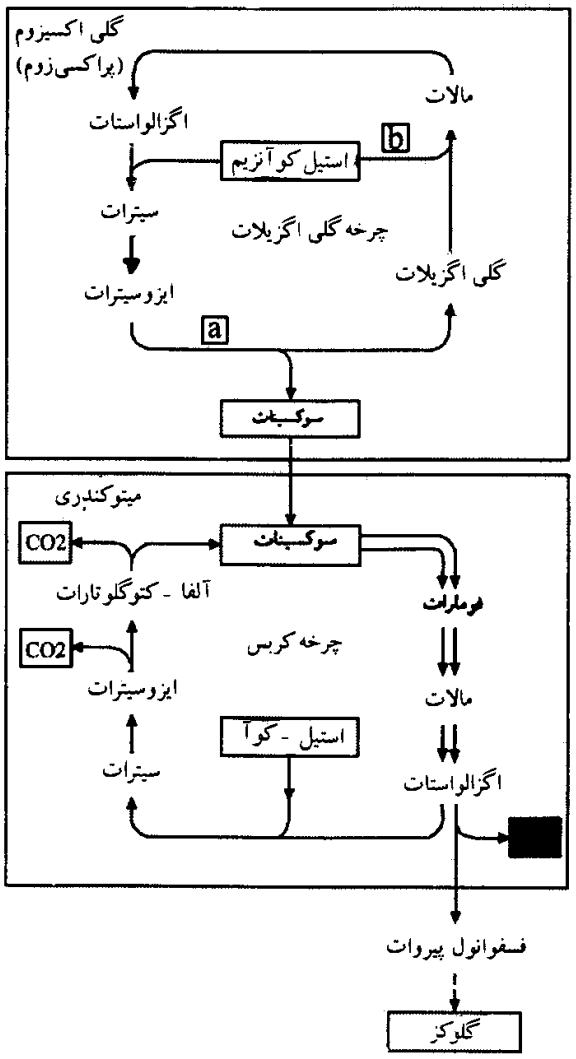
گلی اکسیزوم‌ها[2]

در سال ۱۹۶۷ بریدن باخ و بیورز[3] نشان دادند که میکروبادی‌های یاخته‌های ذخیره‌کننده چربی در دانه‌های چرب (مثل کرچک) در حال جوانه‌زدن علاوه بر آنزیم‌های پراکسیزومی دارای آنزیم‌های چرخه گلی‌اکسیلات[4] نیز می‌باشند و به همین دلیل آنها را گلی‌اکسیزوم نامیدند. بررسی‌های بعدی نشان داد که گلی‌اکسیزوم‌ها علاوه بر آنزیم‌های ویژه چرخه گلی‌اکسیلات (ایزوسیترات‌لیاز و مالات سنتتاز) دارای چند آنزیم لازم در چرخه کربس نیز هستند. بررسی‌های فراساختاری نشان داد که گلی‌اکسیزوم‌ها دارای ماده زمینه‌ای پروتئینی بی‌شکلی هستند که به وسیله

1- Peroxisome reticulum
2- Glyoxysomes
3- R.W.Breiden bach and H.Beveres
4- Glyoxylae cycle

یک غشاء محدود شده است.

وابستگی و نیز تفاوت‌های چرخه گلی‌اکسیلات و چرخه کربس در شکل ۱۰-۱۴ نشان داده شده است. هر دو چرخه با واکنش‌های مشابهی استیل‌کوآنزیم‌آ را به اگزالواستات و ایزوسیترات تبدیل می‌کنند. اما بعد از این مرحله مسیر واکنش‌ها در چرخه‌ها متفاوت می‌باشد. در چرخه کربس از دکربوکسیلاسیون پی‌درپی ایزوسیترات، دو مولکول دی‌اکسیدکربن و سوکسینات تولید می‌شود ولی در چرخه گلی‌اکسیلات، ایزوسیترات به سوکسینات و گلی‌اکسیلات تبدیل می‌گردد. گلی‌اکسیلات که ترکیبی دو کربنی است با یک مولکول استیل کوآنزیم ترکیب می‌شود و اسیددی‌کربوکسیلیک چهار کربنی یعنی مالات را به وجود می‌آورد. بنابراین چهار اتم کربن موجود در دو مولکول استیل کوآنزیم‌آ به‌صورت یک ترکیب چهار کربنی حفظ می‌شود که، پس از تبدیل به سوکسینات به میتوکندری رفته و به اگزالواستات تبدیل می‌گردد. سپس اگزالواستات در تولید گلوکز مورد استفاده قرار می‌گیرد. اگزالواستاتی که از تغییر و تبدیل‌های سوکسیناتِ گلی‌اکسیزومی در میتوکندری تشکیل می‌شود، به‌عنوان پیش‌ساز فسفوانول پیرووات (PEP) عمل می‌کند. تبدیل PEP به گلوکز و قندهای دیگر در مسیری عکس مراحل گلیکولیز انجام می‌شود. بنابراین بافت‌های دارای گلی‌اکسیلات می‌توانند عناصر ساده دو کربنی مانند استات را به قندها تبدیل کنند. در برخی از یاخته‌ها و بافت‌ها مثل یاخته‌ها و بافت‌های ذخیره‌کننده چربی در دانه‌های گیاهان، استات از راه تجزیه اسیدهای چرب ایجاد می‌شود. بنابراین گلی‌اکسیزوم‌ها در تبدیل چربی‌ها به قند نقش دارند.



شکل ۱۰-۱۴. وابستگی گلی‌اکسیلات در گلی‌اکسیزوم‌ها (بالا) و چرخه کربس در میتوکندری‌ها (پایین). سوکسینات که محصول جانبی گلی‌اکسیلات است، می‌تواند به گلوکز و قندهای دیگر تبدیل گردد. آنزیم‌های a و b به ترتیب ایزوسیترات لیاز و مالات سنتتاز هستند.

آنزیم‌های گلی‌اکسیزومی تبدیل ذخایرلیپیدی دانه‌ها به قندها را از مسیر گلی‌اکسیلات موجب می‌شرند. تمام آنزیم‌های چرخه گلی‌اکسیلات از گلی‌اکسیزوم‌های بافت آندوسپرم کرچک جدا شده‌اند. بخش‌بخش کردن آندوسپرم در مراحل مختلف رویش دانه نشان داده است که مالات سنتتاز، آنزیم نشانه گذار، در بخش منطبق بر شبکه آندوپلاسمی وجود دارد و دیگر آنزیم‌های چرخه گلی‌اکسیلات در گلی‌اکسیزوم‌ها یافت می‌شوند. این آگاهی‌ها فرضیه تشکیل گلی‌اکسیزوم‌ها از شبکه آندوپلاسمی را تقویت می‌کند.

چرخه گلی‌اکسیلات برای یاخته‌هایی که منحصراً وابسته به استات یا اسیدهای چرب می‌باشند (بسیاری از جانداران میکروسکوپی) اهمیت زیادی دارد زیرا به‌عنوان منبع تولید اسیدهای دی‌کربوکسیلیکِ چهار کربنی عمل

می‌کند. در برخی جانداران میکروسکوپی مثل اوگلنا[1]، کلرلّا[2]، نوروسپورا[3] و پلی‌توملّا[4]، ذراتی شبیه گلی‌اکسیزوم‌ها وجود دارند اما واژه گلی اکسیزوم‌ها به اندامک‌های دارای آنزیم‌های چرخه گلی اکسیلات که در یاخته‌های ذخیره‌کنندهٔ چربی در دانه‌های روغنی و مخصوصاً هنگام رویش دانه فراوان هستند، اطلاق می‌گردد.

منشأ گلی‌اکسیزوم‌ها: در مورد منشأ گلی‌اکسیزوم‌ها نظریات متفاوتی وجود دارد. برخی پژوهشگران به وجود DNA در گلی‌اکسیزوم‌ها، قابلیت تقسیم آنها و منشأ مستقل آنها اشاره کرده‌اند. این نظریه کمتر مورد تأیید قرار گرفته است. نظر دیگری که بیش‌تر مورد توجه قرار گرفته است، تشکیل گلی‌اکسیزوم‌ها از شبکه آندوپلاسمی است. اکثر آنزیم‌های گلی‌اکسیزومی به وسیله ریبوزوم‌های آزاد در سیتوزول تولید می‌شوند و سپس به گلی‌اکسیزوم‌ها انتقال می‌یابند.

واکوئل‌ها

بررسی انواع مختلفی از بافت‌ها نشان می‌دهد که بخشی از سیتوپلاسم به ویژه در یاخته‌های گیاهی به وسیله اندامک حجیمی که آن را واکوئل نامند پُر شده است. مجموعه واکوئل‌های هر یاخته، دستگاه واکوئلی را تشکیل می‌دهد که آن را در مقایسه با کوندریوم (مجموع میتوکندری‌ها) و پلاستیدوم (مجموع پلاست‌ها) واکوئم[5] می‌نامند. ممکن است واکوئل‌ها ۸۰ تا ۹۰ درصد حجم یاخته‌ای را پُر کنند و سیتوپلاسم را به‌صورت لایه نازکی در کناره‌های یاخته باقی گذارند. اولین گزارش‌ها در مورد واکوئل‌ها بیش‌تر بر روی ویژگی «شفاف بودن» این اندامک‌ها تکیه داشت و نام واکوئل در قرن اخیر از کلمه لاتین واکوئوس (فضای خالی) با این دید ابداع شد که واکوئل، حفرهٔ یاخته‌ای بیش‌وکم غیرفعال است. در سال‌های اخیر، پویایی و اهمیت تبادل‌های واکوئلی به اثبات رسیده و واکوئل‌ها به‌عنوان یکی از اندامک‌های فعال یاخته‌ای منظور شده‌اند.

گرچه واکوئل‌ها به دلیل بزرگی خود خیلی زود توجه پژوهشگران را به خود جلب کرده‌اند، اما استقلال آنها برای مدت زیادی مورد بحث بوده است. عده زیادی از پژوهشگران، واکوئل‌ها را به‌صورت حفره‌های آبکی در نظر گرفته‌اند که از «تورّم برخی بخش‌های کلوئیدی سیتوپلاسم» به وجود آمده‌اند و برخی دیگر آنها را نتیجه آبکی شدن محتوای بخش‌هایی از شبکه آندوپلاسمی دانسته‌اند. پس از پژوهش‌های دووری[6] (۱۸۸۵) مشخص شد که واکوئل‌ها تشکیلات سادهٔ موقتی نیستند، بلکه از بخش‌های مستقل و پایدار یاخته‌ای‌اند. دووری با پلاسمولیز یاخته‌ها در شرایط بیش‌وکم نامناسب موفق به تخریب سیتوپلاسم و حفظ واکوئل‌ها شد. این تجربه که آن را «تفکیک یا جداسازی واکوئلی» می‌نامند، موجب به‌دست آمدن حفره‌هایی شد که برای چند روز ویژگی‌هایی چون قدرت نگهداری رنگدانه‌ها و توان تغییر حجم بازگشت‌پذیر با تغییر شرایط محیط خارجی را حفظ می‌کردند. این ویژگی‌ها موجب این پندار شد که شیرهٔ واکوئلی به وسیلهٔ پوششی چسبنده، ممتد، قابل کشش، قابل ارتجاع، پایدار و دارای تراوایی نسبی (آب را خیلی ساده‌تر از موادّ حل شده عبور می‌دهد) احاطه شده است. دووری به منظور مشخص کردن استقلال واکوئل‌ها، واژهٔ تونوپلاست[7] را ابداع کرد زیرا واکوئل‌ها را به‌صورت پلاست‌هایی ویژه برای تبادل‌های آب می‌پنداشت. این نتایج تا مدت‌ها مورد تردید بود و تنها پس از کاربرد میکروسکوپ‌های الکترونی اختلاف نظرها در مورد واکوئل‌ها کنار گذاشته شد و مشخص گردید که تمام واکوئل‌ها به وسیله غشایی واحد پوشیده شده‌اند (بووا[8] ۱۹۶۰ - ۱۹۶۲). واژه تونوپلاست برای مشخص کردن این غشاء حفظ شد.

برای رنگ‌آمیزی زیستی واکوئل‌ها و بررسی تغییرات و تحولّ‌های آنها در یاخته‌های زنده از محلول‌های کم غلظت

1- Euglena 2- Chlorella 3- Neurospora 4- Polytomella 5- Vacuome
6- De Veries 7- Tonoplaste 8- Buvat

(۰/۱ تا ۰/۰۱ درصد) قرمز خنثی استفاده می‌کنیم که با جذب و انباشتن انتخابی آن، واکوئل‌ها به رنگ قرمز درمی‌آیند.

قابلیت تورژسانس و پلاسمولیز نیز راهی برای شناخت جایگاه، اندازه و تغییرات وضع واکوئل‌ها در یاخته‌های گیاهی است.

واکوئل‌ها اندامک‌هایی دارای قابلیت تغییر و تحول هستند. تعداد، اندازه، نوع و غلظت محتوای درونی آنها به حسب درجه تمایز یاخته‌ای، شرایط محیطی، فصل و شرایط فیزیولوژیکی یاخته‌ها تغییر می‌کند. با افزایش میزان تمایزِ یاخته‌های گیاهی، واکوئل‌های کوچک به‌تدریج به‌هم می‌پیوندند، گسترش می‌یابند و واکوئل حجیمی را می‌سازند که بخش عمده یاخته را پر می‌کند و هسته و سیتوپلاسم را به کناره‌های یاخته می‌راند. هنگام تمایززدایی[1]، واکوئل حجیم، چند بخش می‌شود. حجم این واکوئل‌ها کاهش می‌یابد و موجب بازگشت سیتوپلاسم و هسته به وضعی مشابه یاخته جوان می‌گردد.

واکوئل‌ها اندامک‌هایی دارای تغییرات منظم نیز هستند. در یاخته‌های محافظ روزنه، تغییرات واکوئل‌ها دارای نظم شبانه‌روزی است، هنگام روز، به دنبال افزایش فشار اسمزی که موجب تغییر شکل و حجیم شدن یاخته‌ها می‌شود، روزنه‌ها گشاد می‌شوند و شب هنگام، فشارها و اندازه واکوئل‌ها کاهش می‌یابد و روزنه‌ها تنگ می‌شوند (این وضع در گیاهان کراسولاسه‌ای متفاوت است). جنبش‌های شبانه و حالت خواب اندام‌های گیاهی (بسته شدن گل‌ها، تاشدن برگ‌ها هنگام شب، باز شدن صبحگاهی آنها و نظایر آن) نیز نتیجهٔ تغییرات فشار اسمزی یاخته‌هایی است که در محل‌های حساس قرار دارند.

در یاخته‌های کامبیومی، واکوئل‌ها دارای نظم سالانه‌اند، در زمستان کوچک (خُرد) می‌شوند و بهار دوباره حجیم می‌گردند.

هم‌اکنون واکوئل‌ها را با استفاده از روش‌های متنوعی از یاخته‌ها جدا می‌کنند و مورد بررسی قرار می‌دهند و یا آنها را در یاخته‌ها، در جای خود بررسی می‌کنند.

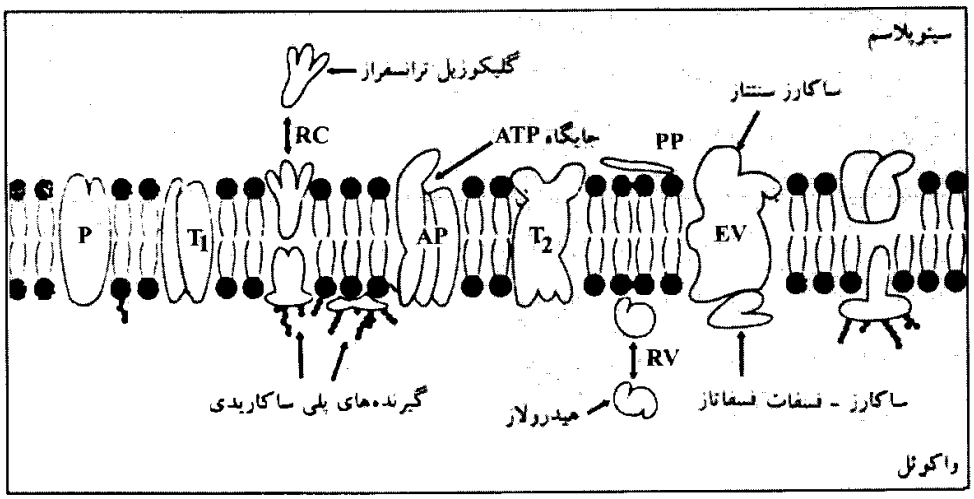
ساختار و فراساختار واکوئل‌ها

در ساختار واکوئل دو بخش اصلی شامل غشاء و محتوای واکوئلی قابل تشخیص است. بررسی‌های انجام شده با میکروسکوپ‌های الکترونی فراساختار غشاء واکوئلی یا تونوپلاست را به‌طور کلی مشابه پلاسمالم و متشکل از دو لایه فسفولیپیدی و پروتئین‌ها نشان داده است با این تفاوت که بخش‌های گلوسیدی (قندی) گلیکولیپیدها یا گلیکولیپیدها در غشاء واکوئل به طرف درون واکوئل قرار دارند (شکل ۱۰-۱۵). بخشی از این ساختارها به‌عنوان گیرنده برخی مواد موجود در واکوئل‌ها عمل می‌کنند.

محتوای واکوئلی

دستگاه واکوئلی دارای ترکیبات بسیار زیاد است که شامل یون‌های کانی، قندهای ساده و اولیگوزیدها، اسیدهای آمینه، اسیدهای آلی دیگر (برای مثال اسید مالیک در شیره واکوئلی سیب، اسیدسیتریک در غوره، اسیداسکوربیک در مرکبات و اسید اکسالیک در شیرهٔ واکوئلی یاخته‌های بسیاری از گیاهان مثل چای، گوجه فرنگی، هندوانه، شمعدانی، عشقه و...)، پلی‌پپتیدها، پروتئین‌ها و گلیکوپروتئین‌ها، موسیلاژهای پلی‌ساکاریدی و

۱- برای آگاهی بیشتر می‌توان به کتاب زیست‌شناسی گیاهی ترجمهٔ دکتر احمد مجد و دکتر مه‌لقاقربانلی، انتشارات فیروزه، فصل ۴ مراجعه کرد.
Dedifferanciation



شکل ۱۰-۱۵. آرایش چند ساختار وابسته به غشاء دو لایه لیپیدی واکوئل (تونوپلاست). AP، آت پ آز؛ گروه آنزیمی عرضی (برداری) (در این جا برای ساکارز)؛ P، منفذ پروتئینی؛ T_1 و T_2، ناقل‌های اختصاصی، P، پروتئین‌های حاشیه‌ای؛ RC، رهایی و جذب سیتوپلاسمی؛ RV، رهایی و جذب واکوئلی.

هتروزیدهای متنوع است. در مورد یون‌های کانی، تمام فنون جدید، ورود انتخابی آنها را تأیید می‌کنند. مخمرها تجمع واکوئلی قابل ملاحظه‌ای از Mg^{2+} و فسفات دارند برعکس سیتوزول آنها دارای یون‌های K^+ و Na^+ است. لوله‌های شیرابه‌ای نیز مقدار زیادی Mg^{2+} دارند (تا ۹۰ برابر بیش‌تر از سیتوپلاسم) در حالی که K^+ به غلظت برابر در واکوئل و سیتوزول آنها وجود دارد. آنیون‌های واکوئلی اغلب یون‌های یک ظرفیتی هستند (مثل Cl^- و NO^-_3).

محتوای واکوئلی مخزنی از ترکیبات پیچیده است که جنس و غلظت آنها برحسب گونه، نوع یاخته‌ای و حالت فیزیولوژیکی جاندار بسیار متغییر است.

برخی مولکول‌ها به‌طور پایدار در واکوئل‌ها ثابت شده‌اند و برخی دیگر با سیتوپلاسم جابه‌جایی دارند. این جنبش‌ها اغلب دارای نظم هستند و در شرایط طبیعی می‌توانند نوسان‌های روزانه یا سالانه داشته باشند. مدت ذخیره مواد در واکوئل‌ها برحسب نوع یاخته متفاوت است و در بافت‌های ذخیره‌ای طولانی است.

برخی مولکول‌ها مانند آنتوسیان‌ها، رنگدانه‌های مختلف، اینولین و غیره تنها در شیره واکوئلی وجود دارند و برخی دیگر مثل ساکارز، مالات، اسیدهای آمینه هم در واکوئل و هم در سیتوزول یافت می‌شوند. بنابراین درجه انتخاب واکوئل متغیر است.

محتوای واکوئل‌ها ممکن است از موادّ حدواسط فعالیت‌های پایه «متابولیسم اولیه» یاخته باشند که ضمن جنبش‌های سیتوپلاسمی کنار گذاشته شده‌اند و یا محصولی از مسیرهای بیوسنتزی بسیار ویژه‌اند «متابولیسم ثانویه». از مهم‌ترین محصولات متابولیسم اوّلیه موجود در واکوئل‌ها عبارتند از:

۱- اسیدهای کربوکسیلیک

این ترکیبات در واکوئل‌ها فراوان هستند و عاملی برای pH اسیدی محتوای واکوئلی می‌باشند. مهم‌ترین آنها عبارتند از اسیدسیتریک، اسیدایزوسیتریک، اسیدمالیک، اسیدتارتریک، اسیداسکوربیک، اسیدمالونیک و اسیداکسالیک. دو اسید آخر بسیار سمی و بازدارندهٔ آنزیم‌ها هستند و بنابراین انتقال به واکوئل برای حذف آنها از سیتوپلاسم و «سم‌زدایی» است. بسیاری از این اسیدها در واکوئل‌ها با مواد قلیایی ترکیب شده و به حالت نمک درمی‌آیند (سیترات‌ها، ایزوسیترات‌ها، مالات‌ها، اکسالات‌ها و نظایر آنها).

۲- گلوسیدها

گلوسیدهای موجود در شیره واکوئل‌ها متنوع هستند. برخی از قندهای ساده هستند مثل گلوکز در شیرهٔ واکوئلی

میوه‌های شیرین، فروکتوز در میوه‌های ترش و شیرین، آیبوز در جعفری. عده‌ای دیگر از دی‌ساکاریدها هستند مثل ساکارز یا قند معمولی که در شیره واکوئلی یاخته‌های چغندرقند و نیشکر زیاد است، مالتوز در جوانه‌ها و لاکتوز که مقدارش در گیاهان کم است. این قندها به حالت محلول در شیره واکوئلی دیده می‌شوند. پلی‌ساکاریدها از جمله اینولین و فروکتوزان‌ها در شیره واکوئلی تیره مرکبان، گل استکانی، تیره سوسن وجود دارند. ذخیره‌سازی آنها بیش‌تر در غده‌های سیب‌زمینی ترشی و ریشه‌های کوکب بررسی شده است.

در شیره واکوئلی گیاهان قندهای ناجور (هتروزیدها) نیز فراوان هستند که در ساختارشان یک بخش قندی و نیز بخشی غیرگلوسیدی وجود دارد. آمیگدالین در شیره واکوئلی هسته‌های تلخ به ویژه بادام، دیژیتالین در گل انگشتانه، سولانین در جوانه‌های سیب‌زمینی و سینگروزیدها در نعناء و سیر از جمله این هتروزیدها هستند.

۳- اسیدهای آمینه و پروتئین‌ها

در شیره واکوئلی اسیدهای آمینه وجود دارند ولی اغلب مقدارشان کم است. محبوس کردن آنها یک ویژگی بسیار انتخابی است. برای مثال یاخته‌های لوله‌های شیرابه‌ای مقداری اسیدهای آمینه بازی مثل آرژینین، لیزین، اورنیتین را نگهداری می‌کنند، در حالی که اسید گلوتامیک و اسیدآسپارتیک عملاً در آنها وجود ندارند. نتایج مشابهی در مخمرها به‌دست آمده است. واکوئل‌های برگ‌های باقلائیان اسیدهای آمینه حلقوی مثل فنیل آلانین و تیروزین را در خود جمع می‌کنند.

پلی‌پپتیدها نیز با تنوع زیادی در شیره واکوئلی وجود دارند. اغلب این مواد پس از ورود به واکوئل پایداری (عمر) کوتاهی دارند (چند ساعت) اما برخی از آنها به پروتئین‌هایی پایدار و ذخیره‌ای تبدیل می‌شوند. بخش مهمی از پروتئین‌های ذخیره‌ای شیره واکوئلی پس از آن که غلظتشان زیاد شد به‌صورت دانه‌های آلورون[1] درمی‌آیند که شکل، اندازه و ساختار آن در گیاهان متفاوت و بیش‌وکم اختصاصی است.

مهم‌ترین محصولات متابولیسم ثانویه که در شیره واکوئلی وجود دارند عبارتند از:

۱- کومارین

ترکیبی از خانواده مواد فنلی رایج در گیاهان است. این موادّ فنلی از نظر فیزیولوژیکی فعال هستند و بر یاخته‌های زنده اثرات سمی دارند که به‌صورت اختلال در تقسیم هسته‌ای و رشد، بازدارندگی آنزیم‌هایی مثل آمیلازها یا ساکارازها (انورتازها) می‌باشد. کومارین در گیاهان علوفه‌ای تیره نخود اهمیت زیادی دارد زیرا به دنبال تغییراتی که به وسیله باکتری‌ها پیدا می‌کند به دی‌کومارول تبدیل می‌شود که ماده‌ای ضد انعقاد است و عامل حوادث خونریزی دام‌ها می‌باشد.

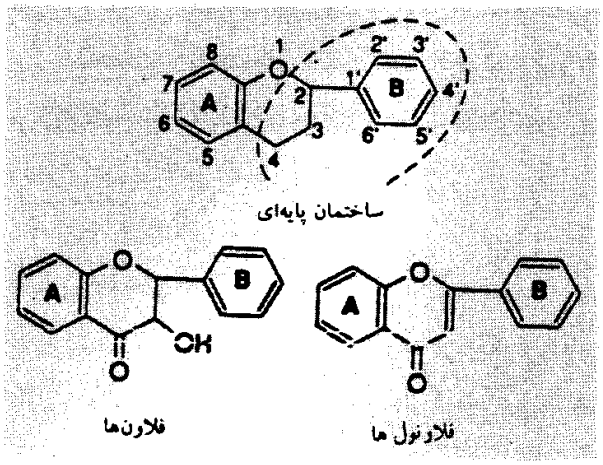
۲- سیانوژن‌ها

تولید اسیدسیانیدریک (HCN) به وسیلهٔ یاخته‌ها سیانوژنز نامیده می‌شود. یاخته‌هایی که این اختصاص را دارند دارای ترکیبات هتروزیدیِ واجد اسیدسیانیدریک هستند. بیش از ۲۰۰۰ گونه شناخته شده که توانایی تولید ترکیبات سیانوژنی را دارند و در تمام گروه‌های گیاهان آوندی پراکنده‌اند. دهورین[2] یک گلوکزید سیانوژنی است که در ذرّت علوفه‌ای زیاد است و تنها در واکوئل‌های یاخته‌ها وجود دارد. این ماده همانند کومارین به وسیله بتاگلوکزیداز تجزیه می‌شود و اسیدسیانیدریک را آزاد می‌نماید. تجمع این ترکیبات در واکوئل‌ها موجب سلامت یاخته‌ها و دفاع مختصری در برابر حمله‌کننده‌ها می‌باشد. همچنین به نظر می‌رسد ترکیبات سیانوژنی نوعی ذخیره ازت باشند؛

1- Aleurone 2- Dhurine

اسیدسیانیدریک می‌تواند به سرین تثبیت شده و آسپاراژین تولید نماید.

۳- فلاونوئیدها



فلاونوئیدها رنگیزه‌هایی هستند که در گیاهان فراوانند. از نظر شیمیایی از یک ناجور حلقه نوع فلاون (دو حلقه بنزنی A و B که یک حلقهٔ ناجور اکسیژن‌دار را احاطه کرده‌اند) تشکیل شده‌اند. حلقه B کم‌وبیش هیدروکسیل‌دار و متیل‌دار است.

آنتوسیان‌ها و فلاونول‌ها از مهم‌ترین فلاونوئیدها هستند که در واکوئل‌های یاخته‌ای روپوست (بشره) میوه‌ها، گل‌ها و برگ‌ها به ویژه در پائیز فراوانند. آنتوسیان‌ها (از antnos به معنای گل و cyanos به معنای آبی) رنگیزه‌هایی هستند که رنگشان بین آبی - بنفش و قرمز تغییر می‌کند. این تغییرات به درجه هیدروکسیلاسیون و متیلاسیون حلقه B وابستگی دارد (هیدروکسیلاسیون بیش‌تر در جهت رنگ آبی و متیلاسیون در جهت رنگ قرمز).

فلاونول‌ها و فلاون‌ها از نظر شیمیایی بسیار نزدیک به آنتوسیان‌ها هستند. این ترکیبات بر روی حلقهٔ ناجور مرکزی، بسیار اکسیژن‌دار شده‌اند. اغلب زرد (گل‌های پامچال، طاووسی) یا بی‌رنگ هستند.

رنگیزه‌های فلاونوئیدی، همانند کومارین و ترکیبات سیانوژنی در ارتباط بین گیاهان - جانوران دخالت می‌کنند ولی در این جا به‌عنوان نشانه‌های جذب‌کنندهٔ اساسی بر روی تولیدمثل جنسی (گرده افشانی) به کارگرفته می‌شوند.

۴- تانن‌ها

تانن‌ها یا نمک‌های اسید آلی حلقوی به اسم اسیدتانیک هستند که در شیره واکوئلی گیاهان متفاوتی از جمله بلوط، خرمالو، چای، به، گل سرخ وجود دارند. تانن‌ها، پروتئین‌ها را رسوب می‌دهند و از این خاصیت آنها در چرم‌سازی استفاده می‌شود؛ با املاح فرّیک ترکیب می‌شوند و تولید رنگ‌هایی می‌کنند که در تهیه جوهرهای نوشتنی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

تانن‌ها به دلیل غیرطبیعی کردن[1] پروتئین‌ها، بازدارنده آنزیم هستند و به نظر می‌رسد تجمع آنها در واکوئل‌ها نوع پشتیبانی یا دفع وامکانی برای دفاع در برابر مهاجمین (عوامل بیماریزا) باشد. آنها در محل زخم‌ها و هنگام حمله انگل‌ها به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد.

۵- الکالوئیدها

مواد ازت‌دار حلقوی هستند که واکنش کم‌وبیش قلیایی دارند (دلیل نامگذاری آنها). چندین هزار الکالوئید شناخته شده و لیست نهایی آنها هنوز تعیین نشده است. الکالوئیدها گروه شیمیایی بسیار ناهمگنی هستند که دارای ساختاری متنوع می‌باشند. تولید و نیز تجمع آنها در واکوئل‌ها بسیار اختصاصی است. این مواد سمی‌اند و خواص دارویی قوی و متنوعی دارند.

نیکوتینِ توتون، مُرفین، پاورین، پاپاورین، کدئینِ خشخاش، تئین چای، کافئینِ قهوه، تئوبرومینِ کاکائو، بربرینِ زرشک و بید نمونه‌هایی از الکالوئیدها هستند.

در برخی گونه‌ها یک واکوئل می‌تواند چند نوع الکالوئید داشته باشد. در مورد بربرین که به‌عنوان مادهٔ ضد

1- Denaturation

مالاریا و برای دفع صفرا مصرف می‌شود، نشان داده شده که مراحل اصلی تولیدش در حفره‌های کوچکی انجام می‌شود که این حفره‌ها به درون واکوئل‌ها تخلیه می‌شوند.

سویه‌های[1] یاخته‌های کشت شده افرا، توتون و به ویژه نواری گُلی[2] برای تولید الکالوئیدها به کارگرفته شده‌اند. نواری گلی الکالوئیدهای زیادی از جمله کاتارانتین[3] و وینبلاستین[4] تولید می‌کند که خواص ضدمیتوزی دارند و در مداوای سرطان به کار می‌روند.

هیدرولازها و فعالیت تجزیه‌ای

کشف انواع زیادی از هیدرولازها در واکوئل‌ها موجب شد که این اندامک‌ها به‌صورت اجزای یاخته‌ای فعال و دارای فعالیت‌های تجزیه‌ای هم در نظر گرفته شوند. هیدرولازهای واکوئلی را می‌توان با استفاده از روش‌های شیمی یاخته‌ای در جای خود[5] شناسایی کرد و یا در آزمایشگاه به وسیله تجزیهٔ واکوئل‌های جداشده مشخص ساخت. این هیدرولازها، واکوئل‌ها را به جایگاه ترجیحی اتولیز یاخته‌ای تبدیل کرده‌اند.

فسفاتازهای اسیدی (فسفواسترازی که بهینه عمل آن در pHهای بین ۴ تا ۶ است)، آلفا- مانّوزیداز، بتافروکتوزیداز، پروتئازها (از جمله آمینوپپتیداز، کربوکسی‌پپتیداز)، ریبونوکلئازها، گلیکوزیدازها (بتافروکتوزیداز، انورتاز، اینولاز و غیره) از هیدرولازهای واکوئلی هستند. برخی از این آنزیم‌ها در شیرهٔ واکوئلی و برخی در غشاء این اندامک‌ها جای دارند. تفکیک مستقل این آنزیم‌ها دشوار است.

اهمیت غشاء واکوئلی در انتقال و به دام انداختن مواد

جنبش‌های مولکولی از خلال غشاء واکوئلی وابسته به دو مجموعه فعالیت مشخص است: از یک سو پدیده‌های گذر مواد از غشاء دو لایه لیپیدی که، در اصل نسبت به مولکول‌های آب‌دوست نفوذناپذیر است و از سوی دیگر پدیده‌هایی که موجب به «دام افتادن» مواد می‌شوند، یعنی پدیده‌هایی که از بازگشت مواد از واکوئل به سیتوپلاسم جلوگیری می‌کنند.

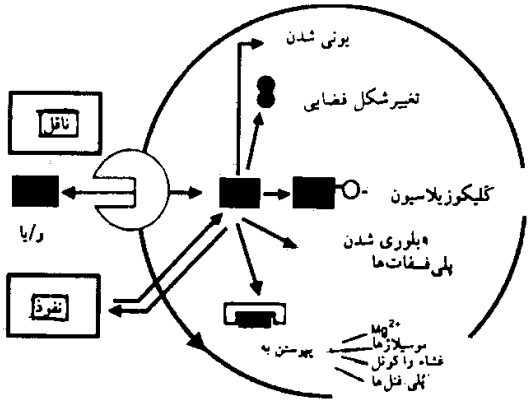
۱- انتقال: تونوپلاست غشایی مناسب برای مبادله مواد است زیرا:

- دارای سطح وسیع تماس است.
- دارای محل‌های عبور ویژه است که با حضور پروتئین‌های ویژه یعنی پرمه‌آزها مشخص می‌شوند. این نواحی، عبور از سدّ چربی‌دوست را همانند مجاری باریک (کانال)، تسهیل می‌کنند.
- قادر به انتقال فعّال حتی در جهتی عکس شیب غلظت است، یعنی قادر به انتقالی، توأم با مصرف انرژی است.
- مواد چربی‌دوست مثل الکالوئیدها می‌توانند از راه انتشار در غشاء دو لایه چربی نفوذ کنند. این پدیده به‌طور تجربی در یاخته‌های کشت شده، بررسی شده است.

تونوپلاست نسبت به مولکول‌های خنثی نفوذپذیر است امّا، برخی مواد در درون واکوئل که حالت اسیدی دارد یونی می‌شوند، توان گذرشان از غشاء واکوئل بسیار کاهش می‌یابد و در واکوئل انباشته می‌شوند. این حالت برای رنگ‌های چربی‌دوستی که به‌طور تجربی به کار گرفته شده‌اند و برای مثال در مورد قرمز خنثی، ۹

1- Souches 2- Cathrantus roseus 3- Catharantine 4- Vinblastine
5- in situ

آمینوآکریدین (مادهٔ فلوئورسانسی که برای محاسبه pH به کارگرفته می‌شود) نیز صادق است. مولکول خنثی به روش انتشار ساده نفوذ می‌کند اما، شکل یونی آن در واکوئل اسیدی انباشته می‌شود. در مورد الکالوئیدها، جذب انتخابی صورت می‌گیرد و به همین دلیل است که واکوئل با سهولت بسیار زیادی اکالوئیدهای مخصوصِ گونهٔ (نوع) خود را جذب می‌کند. برای مثال واکوئل‌های خشخاش برعکس است.



شکل ۱۰-۱۶. انتقال تونوپلاستی وابسته به مکانیسم‌های مختلف به دام افتادن درون واکوئلی (برگرفته از کارهای J.GUERN و همکار).

۲- به دام انداختن: وقتی مولکول‌ها از تونوپلاست می‌گذرند و وارد واکوئل می‌شوند، تغییرات زیادی پیدا می‌کنند که امکان بازگشت آنها را کاهش می‌دهد. راه‌های عمده به دام انداختن مواد به وسیله غشاء واکوئلی در شکل ۱۰-۱۶ مشخص شده است.

همان گونه که شکل ۱۰-۱۶ نشان می‌دهد یکی از راه‌های به دام افتادن مواد یونی شدن آنها است که برای مواد بازیِ چربی‌دوستی است که به محیط اسیدی می‌رسند، مثل وضع الکالوئیدها و قرمز خنثی. تغییر شکل فضایی مولکول‌ها و گلیکوزیلاسیون برای موادی است که ورودشان به واکوئل‌ها با واکنش‌های متابولیکی همراه است (هتروزیدها، اولیگوزیدها). بلوری شدن یکی از تغییرات عمده‌ای است که برای به دام افتادن برخی مواد از جمله اکسالات کلسیم صورت می‌گیرد. بالاخره تثبیت برخی مواد بر جایگاه‌ها یا مولکول‌هایی متفاوت می‌تواند تعادل جذب را در جهت انباشته شدن مواد تغییر دهد. برای مثال در مخمرها آرژینین به وسیله پلی‌فسفات‌ها نگهداری می‌شود یا در عده‌ای از گیاهان سبز سیترات‌ها و اسیدهای آلی به وسیله Mg^{2+} نگهداری می‌شوند. موسیلاژهای آب‌دوست اسیدی موجود در سطح درونی تونوپلاست جایگاهی برای به دام انداختن مواد مختلف هستند. پروتئین‌ها و تانن‌ها نیز جایگاه‌هایی برای نگهداشتن برخی مواد هستند.

در غشاء واکوئل‌ها پمپ‌های پروتون وابسته به آت‌پ‌آز وجود دارند که با انتقال پروتون‌ها از سیتوزول به درون واکوئل‌ها به اسیدی شدن pH درون واکوئل‌ها (pH درون واکوئل‌ها ۱ تا ۳ واحد pH کمتر از سیتوزول است)، تعادل pH سیتوزول و برقراری یک پتانسیل الکتروشیمیایی مثبت بین دو سطح غشاء واکوئل می‌شود ($\Delta\Psi$ حدود ۲۰+ تا ۸۰+ میلی‌ولت است). این اختلاف پتانسیل موجب این فرضیه شده که انتقال مواد از غشاء واکوئل به یک سیستم انرژیی وابسته است.

آت‌پ‌آزهای پمپ‌های پروتونی که در پلاسمالم و تونوپلاست جای دارند، پروتون‌ها را به سوی خارج از سیتوپلاسم می‌رانند. این آت‌پ‌آزها آرایشی عکس هم دارند، یکی به سوی خارج و دیگری به سوی داخل چرخیده و در تنظیم pH سیتوزول به کارگرفته می‌شوند. به‌طور کلی، فعالیت $H^+ - ATPase$ حساس به آنیون‌ها که در غشاء واکوئل‌ها وجود دارد عامل برقراری و پایداری اختلاف پتانسیل و قطبیت (بار) مثبت تونوپلاست است. تجربه‌های زیادی که در شرایط آزمایشگاهی انجام شده‌اند تأیید می‌کنند که انتقال مواد محلول متفاوتی وابسته به شیب الکتریکی غشاء واکوئل است. پدیده‌هایی که موجب افزایش این شیب شوند، ورود مواد محلول را به درون واکوئل تحریک می‌کنند. برعکس مواد یون‌بر[1] که پتانسیل غشایی را زایل می‌کنند، موجب کاهش انتقال می‌شوند. پمپ پروتونی

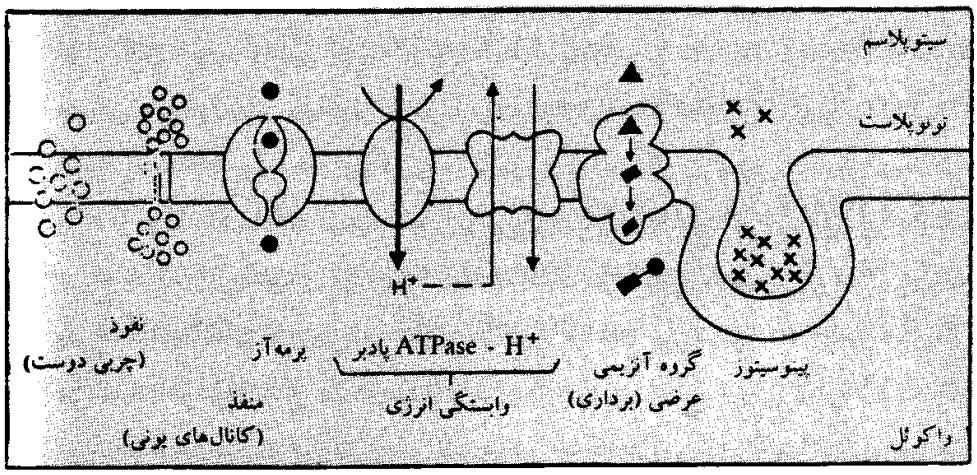
1- Ionophores

دیگری نیز بر روی تونوپلاست شناخته شده است. این پمپ، هیدرولیز پیروفسفات را تسهیل می‌کند. این پیروفسفاتاز به وسیله آنیون‌ها تحریک نمی‌شود. افزایش مصنوعی پتانسیل غشایی، تجمع مواد را در واکوئل افزایش می‌دهد.

پینوسیتوز درون واکوئلی

یکی دیگر از راه‌های ورود مواد به واکوئل‌ها، پینوسیتوز درون واکوئلی است. مشاهدات فراساختاری، چین‌خوردگی‌های زیاد و به درون برگشتگی‌های فراوانی را برای تونوپلاست نشان داده است. تمام مراحل بینابینی مربوط به فرورفتگی تونوپلاست به درون فضای واکوئلی عکسبرداری شده است. نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد که برخی از این حفره‌ها، نشانه‌هایی از گوارش واکوئلی و مربوط به پدیده‌های قطره‌خواری (پینوسیتوز) است. این پدیده‌ها با پدیده‌های مربوط به خودخواری (اتوفاژی) مشابه است.

شکل ۱۰-۱۷ برخی از پدیده‌های اصلی را که موجب نفوذپذیری تونوپلاست و ورود شرطی مواد به کمک توازن عامل شیمیایی، یونی و تنظیم الکتریکی است، نشان می‌دهد. برخی دیگر از این پدیده‌ها قبلاً (در شکل ۱۰-۱۵) مشخص شده است.



شکل ۱۰-۱۷. سیستم و چگونگی انتقال عملی در تونوپلاست

منشأ دستگاه واکوئلی

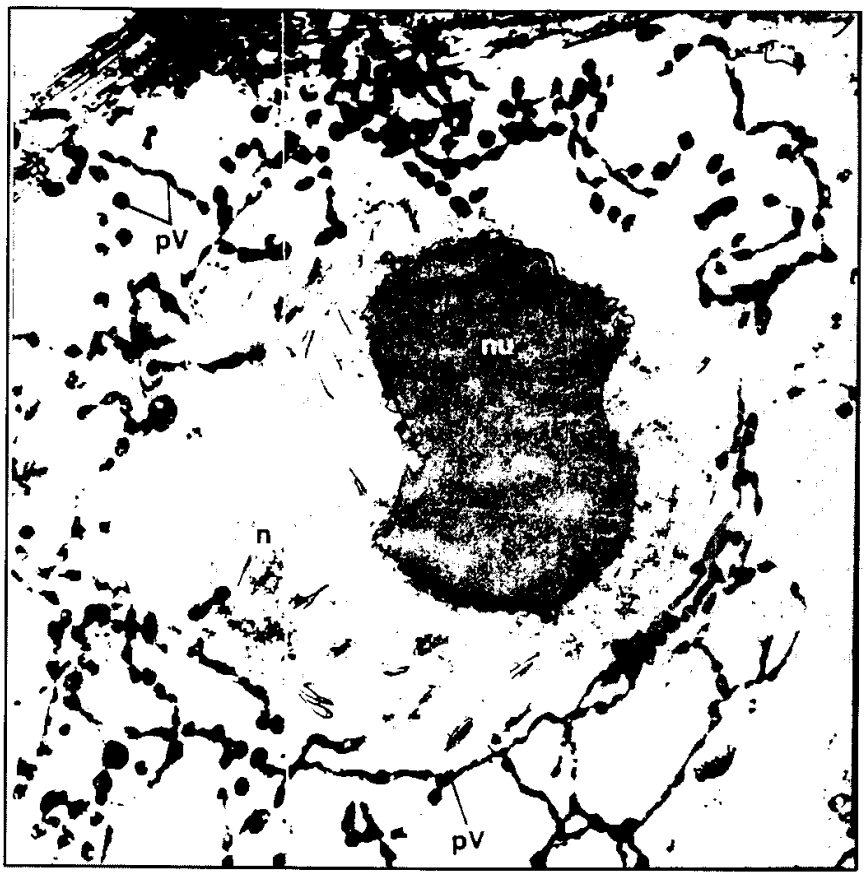
مشاهداتی که بر روی یاخته‌های جوان پس از رنگ‌آمیزی زیستی واکوئل‌ها به کمک قرمز خنثی انجام شده است، دستگاه واکوئلی را به‌صورت بخش‌هایی پراکنده نشان داده است. اما این بخش‌ها نشانه‌ای را در مورد خاستگاهشان به‌دست نمی‌دهند. بررسی‌هایی که به کمک میکروسکوپ‌های الکترونی در یاخته‌های جوان و در شروع رشد آنها انجام شد، در نهایت نشان داد که واکوئل‌های جوان کروی شکل هستند. به دنبال این مشاهدات، شبکه آندوپلاسمی به‌عنوان منشأ تشکیل واکوئل‌ها در نظر گرفته شد که هم مسئول ساختن واحدهای غشایی (پیش‌سازهای تونوپلاست) و هم مسئول تأمین آنزیم‌های واکوئلی است. اما تکوین واکوئل‌ها پیچیده‌تر از آبکی و وسیع شدن سادهٔ شبکه آندوپلاسمی است.

در یاخته‌های جوان مریستمی، سه نوع شبکه غشایی وجود دارد: شبکه آندوپلاسمی صاف یا دانه‌دار، دستگاه گلژی و واکوئل‌های جوان. در برش‌های بسیار نازک این ساختمان‌های غشایی همانند کیسه‌های پخش شده‌ای در سیتوپلاسم‌اند که، وابستگی زمانی و مکانی آنها به‌طور کامل مشخص نیست. پیشرفت‌های جدید در این زمینه پس از به‌کارگیری دو روش نشانه‌گذاری و مشاهدهٔ برش‌های ضخیم با میکروسکوپ الکترونی فشار قوی کسب شده است.

۱) نشانه‌گذاری انتخابی می‌تواند یا به وسیلهٔ مشخص کردن آنزیم‌های هیدرولازی که در آنها وجود دارند (فسفاتازهای مختلف)، یا با افزایش تراکم (کنتراست) غشاء آنها به کمک مخلوطی از تتراکسیداسمیوم - یدور روی بعد از تماسی طولانی، انجام می‌پذیرد. این مخلوط موجب احیا شدن و سپس اشباع شدنی می‌گردد که الکترون‌ها را به صورتی بیش‌وکم شدید و موضعی، به حسب واکنش‌های به کارگرفته شده، پراکنده می‌سازد.

۲) میکروسکوپ الکترونی فشار قوی (دسته‌های الکترونی تحت تأثیر اختلاف پتانسیل شدید ۱ تا ۳ میلیون ولت شتاب بسیار زیادی پیدا می‌کنند) امکان می‌دهد که، برش‌های به نسبت ضخیمی (۱ تا ۴ میکرومتر) از یاخته‌ها را مورد بررسی قرار دهیم و به تصاویر سه بُعدی بخش‌های یاخته‌ای برسیم.

با این وسیله می‌توان دستگاه واکوئلی بسیار جوان را در بین سایر اندامک‌های سیتوپلاسمی جستجو کرد. در اولین مراحل قابل تشخیص دستگاه واکوئلی از مجموعه در هم رفته‌ای از لوله‌های قابل انعطاف و منشعب تشکیل شده است که قطری حدود ۰/۱ میکرومتر دارند. این شبکه در تمام سیتوپلاسم پراکنده است (شکل ۱۰-۱۸).



شکل ۱۰-۱۸. اولین مراحل تکامل دستگاه واکوئلی (شبکه پیش واکوئلی). یاختهٔ مریستمی ریشه نخود. استفاده از روش گومری و مشخص ساختن فعالیت فسفاتازی. مشاهده به کمک میکروسکوپ الکترونی فشار قوی بر روی برش‌هایی به ضخامت ۲ میکرومتر انجام شده است. n: هسته؛ nu: هستک؛pv: پیش واکوئل (×۱۵۰۰۰) (برگرفته‌ای از کارهای N.FAVART و N.POUX).

برخی از این لوله‌ها قطعه‌قطعه می‌شوند و حفره‌های جدا از هم یا پشت سرهمی شبیه تسبیح را به وجود می‌آورند، به این ترتیب یک شبکه غشایی جدید پدیدار می‌شود. این ساختارها از قطعات شبکه آندوپلاسمی که از صفحات پهن و یا لوله‌های نازک‌تری ساخته شده‌اند، قابل تشخیص هستند. لوله‌های دارای آنزیم‌های هیدرولازی «واکوئل‌های ابتدایی» یا «پیش واکوئل‌ها[1]» را می‌سازند.

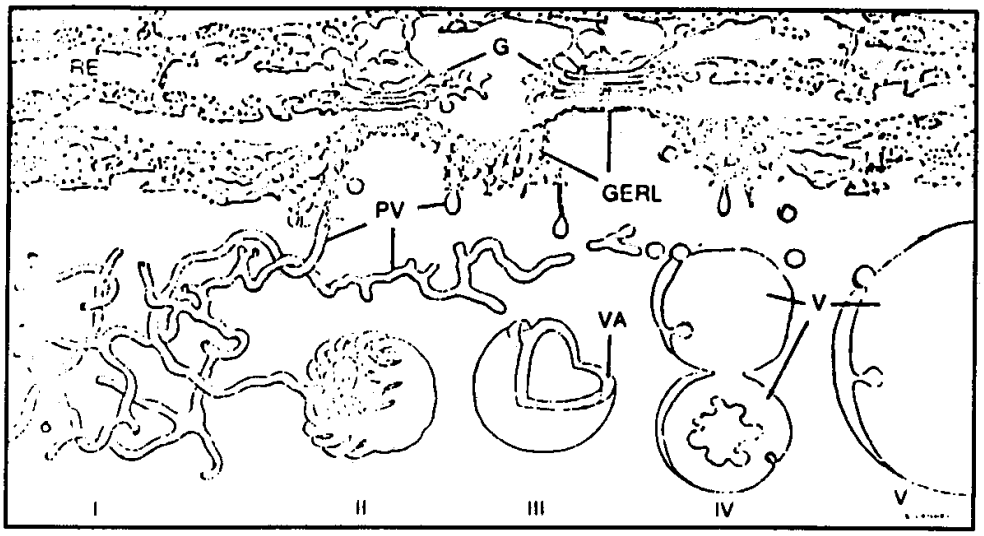
گرچه پژوهشگران در مورد استقلال پیش واکوئلی در یاخته‌های جوان توافق دارند، اما تفسیرهای متفاوتی در

1- Provacuole

مورد وابستگی این شبکه با شبکه آندوپلاسمی از یک سو و نیز چگونگی رسیدن از پیش واکوئل‌ها به واکوئل‌ها از سوی دیگر وجود دارد. تفاوت نظر بیش‌تر در مورد اهمیت فرآیندهای خودخواری (اتوفاژی) است:

پوکس[1] و همکاران (۱۹۷۴ - ۱۹۸۲) تصور می‌کنند که شبکه پیش واکوئلی یکی از ساختارهای ثابت در یاخته‌های تمایز یافته است. قطعه‌قطعه شدن شبکه پیش واکوئلی، حفره‌هایی را ایجاد می‌کند که با ورود آب به آنها رشد می‌کنند؛ این حفره‌ها گویچه‌ای با میکروسکوپ‌های نوری قابل مشاهده هستند. در جریان تحولات، پدیده‌های خودخواری نادر است و به هر حال برای تمایز دستگاه واکوئلی ضرورت ندارد.

مارتی[2] (۱۹۷۴ - ۱۹۸۶) تفسیر دیگری دارد و معتقد است که پدیده‌های خودخواری، پدیده‌های غالب هستند (شکل ۱۰-۱۹). پیش واکوئل‌ها با محتوای هیدرولازی خود همانند لیزوزوم‌های اولیه هستند (یعنی شبیه ساختارهایی هستند که هنوز آنزیم‌های آنها با گوهر مایه‌های (سوبستراهای) خود در تماس قرار نگرفته‌اند). در این دیدگاه، مجموعهٔ پیش واکوئلی، مشتقی از ناحیهٔ خاصی از شبکه آندوپلاسمی فرض شده که با حالت سوراخ‌سوراخ خود و نیز جایگاهش بر روی سطح رسیدگیِ دستگاه گلژی، قابل تشخیص است. چنین تشکیلات شبکه‌ای در یاخته‌های جانوری با نشانه اختصاری GERL (گلژی - شبکه آندوپلاسمی - لیزوزوم) گزارش شده است.



شکل ۱۰-۱۹. مراحل تشکیل پیش واکوئل‌ها در وابستگی با پدیده‌های خودخواری. دیکتیوزوم‌های دستگاه گلژی، شبکه آندوپلاسمی دانه‌دار (RE) و GERL در بخش بالایی طرح مشخص شده‌اند زیرا در تمام مراحل تشکیل واکوئل‌ها، وجود دارند. تشکیل واکوئل‌ها هنگام تمایز یاخته‌ای به ترتیب از چپ به راست (۱ تا ۵) در بخش پائینی طرح مشخص شده است. pv، شبکه پیش واکوئلی؛ VA، واکوئل خودخواری؛ V، واکوئل دارای یک غشاء (تونوپلاست) (برگرفته از کارهای F.MARTY).

پیش واکوئل‌ها یک برنامه خودخواری یاخته‌ای را که با تشکیل چین‌خوردگی‌ها، حفره‌های محبوس‌کننده و روی هم افتاده همراه است را می‌گذرانند و محتوای هیدرولازی خود را روی سیتوپلاسم محبوس شده تخلیه می‌کنند و موجب گوارش آن می‌گردند. غشاء درونی نیز گسسته و تخریب می‌شود و غشاء بیرونی، تونوپلاست را می‌سازد. تصویرهای مشخصی از این دورهٔ خودخواری به کمک میکروسکوپ‌های الکترونی فشار قوی و به حالت سه بُعدی گرفته شده است. چین‌خوردگی‌هایی شبیه به جای انگشتان دستکش که از لوله‌های پیش‌واکوئلی ساخته شده‌اند به‌هم پیوسته و «دام‌های محبوس‌کننده» را تشکیل می‌دهند (شکل ۱۰-۲۰). در چنین حفره‌هایی، آنزیم‌های تجزیه‌کننده و گوهرمایه‌ها (سوبستراها) در تماس با هم قرار می‌گیرند و به این ترتیب لیزوزوم‌های ثانویه تشکیل

1- N.Poux 2- F.MARTY

می‌شوند. این بخش لیزوزومی حالت تبدیلی لازم برای پدیدار شدن واکوئل‌های جوان واقعی است که در نتیجهٔ اسمز و به‌هم پیوستن رشد می‌کنند.

شکل ۱۰-۲۰. دام‌های محبوس‌کننده (مرحله دوم از شکل قبلی) که از شبکه پیش واکوئلی ساخته شده‌اند. یاختهٔ مریستمی گندم. نشانه گذاری انتخابی شبکه به وسیلهٔ اشباع‌سازی از تتراکسیداسمیوم و یدور روی. مشاهده با میکروسکوپ الکترونی فشار قوی (۱۴۰۰۰×) (برگرفته از کارهای F.MARTY).

۱۱ میتوکندری

نام میتوکندری ترکیبی است از دو کلمه یونانی (mito به معنی رشته و Chondrion به معنی دانه). این اندامک که اغلب رشته‌ای یا به‌صورت دانه‌های کوچک است در سیتوپلاسم همهٔ سلول‌های یوکاریوتی وجود دارد.

اولین بررسی‌های انجام شده بر روی میتوکندری‌ها و کشف آنها در سلول، در اواخر قرن گذشته (۱۸۹۴) به وسیلهٔ آلتمن[1] بوده است. او این اندامک‌ها را «بیوپلاست» یا «جایگاه‌های زنده» نامید. آلتمن نظر داد که بایستی بین میتوکندری‌ها و فرآیندهای اکسایش و کاهش درون سلول وابستگی وجود داشته باشد. در سال ۱۸۹۷ بندا بررسی‌های بیشتری را بر روی این اندامک‌ها آغاز کرد و آنها را «میتوکندری» نامید. در سال ۱۹۰۰ میکائیلیس به کمک سبزژانوس میتوکندری‌ها را در سلول‌های زنده مشاهده کرد (این رنگ به حالت اکسیدشده سبز است و اگر احیا شود بی‌رنگ می‌گردد، میتوکندری‌ها با داشتن سیتوکُروم اکسیداز موجب اکسایش این رنگ می‌شوند و در نتیجه در سلول‌های زنده میتوکندری‌ها به کمک این رنگ سبز دیده می‌شوند). در سال ۱۹۱۳ واربورگ نشان داد که آنزیم‌های تنفسی در این اندامک‌های سیتوپلاسمی وجود دارند.

بنسلی و هُر در ۱۹۳۴ گام مهم دیگری در شناسایی میتوکندری‌ها برداشتند و موفق به جداسازی میتوکندری‌ها از سلول‌های کبدی شدند و به این ترتیب امکان بررسی‌های مستقیم میتوکندری‌ها از دیدگاه بیوشیمیایی و زیستی فراهم شد. در سال ۱۹۴۸ هژبوم و همکارانش به‌صورت قطعی نشان دادند که میتوکندری‌ها کانون‌های واقعی تنفس سلولی هستند. در سال‌های اخیر میکروسکوپی الکترونی امکان بررسی سازمان و فراساختار میتوکندری‌ها را فراهم آورده و پیش برده است.

بررسی میتوکندری‌ها به دلیل آن که این اندامک‌ها نمونه بسیار جالبی از پیوستگی ساختمان و عمل در سلول‌ها می‌باشند، اهمیت زیادی دارد. به کمک بررسی‌های انجام شده با میکروسکوپ‌های الکترونی وجود DNA اختصاصی و مستقل از DNA هسته‌ای در میتوکندی‌ها به اثبات رسیده و با بررسی‌های بیوشیمیایی مشخص شده که این DNA اطلاعات لازم برای سنتز پروتئین‌ها را دارد. پروتئین‌های ساخته شده به وسیله میتوکندری‌ها می‌توانند در وراثت و تمایز سهمی را ایفا کنند.

بررسی زیستی

بررسی میتوکندری‌ها در سلول‌های زنده به دلیل ضریب شکست کمی که دارند دشوار است، بنابراین می‌توان آنها را در سلول‌های کشت شده، به ویژه با میکروسکوپ زمینه تاریک یا میکروسکوپ فاز متضاد مورد بررسی قرار داد.

بررسی به حالت زنده یا نزدیک به حالت زنده پس از کاربرد محلول رقیق سبزژانوس آسانتر است. رنگ آبی-سبزی که ایجاد می‌شود نتیجه حضور سیتوکروم اکسیداز در میتوکندری‌هاست. این آنزیم مادهٔ رنگ‌کننده را در حالت اکسید شده (رنگی)اش به خود می‌گیرد. در سیتوپلاسم احاطه‌کننده میتوکندری ماده رنگ‌کننده به حالت احیا شده و بدون رنگ است.

1- Altman

دست‌ورزی‌های میکروسکوپی[1] نشان می‌دهد که میتوکندری‌ها بسیار پایدار هستند و می‌توان آنها را به کمک یک سوزن بسیار کوچک بدون آن که آسیب ببینند جابه‌جا کرد. تراکم آنها را سیتوپلاسم خیلی بیشتر است. ضمن از اولتراسانتریفوگاسیون سلول‌های زنده با میزان ۲۰۰۰۰۰ تا ۴۰۰۰۰۰g میتوکندری‌ها
پس از ته‌نشین شدن، سالم (دست‌نخورده) باقی می‌مانند.

تغییرات حجم و شکل

مشاهده در حال حیات میتوکندری‌ها به‌خصوص وقتی جالب است که عمل با سینماتوگرافی سریع همراه باشد. در کشت فیبروبلاست‌ها، می‌توان تغییرات مداوم و گاه منظمی را در حجم، شکل و پراکنش میتوکندری‌ها مشاهده کرد. دو نوع حرکات اصلی عبارتند از: جنبش، و جابه‌جا شدن از جایی به جای دیگر سلول. این حرکات در انترفاز خیلی شدیدتر از زمان تقسیم هستند. گاهی میتوکندری‌ها چسبیده به غشاء هسته، در محلی نزدیک به هستک باقی می‌مانند. همچنین میتوکندری‌های رشته‌ای می‌توانند قطعه‌قطعه شده، به‌صورت دانه‌های کوچکی درآیند که این دانه‌ها می‌توانند دوباره به‌هم بپیوندند.

برخی حرکات میتوکندری‌ها گذرا (موقتی) و نتیجه جنبش‌های سیتوپلاسمی‌اند. تغییرات فعال در حجم و شکل میتوکندری‌ها ممکن است به دلیل تغییرات شیمیایی، اسمزی و مکانوشیمیایی باشد.

در سلول‌های زنده در ارتباط با فسفوریلاسیون اکسیداتیو، انقباضات کم دامنه‌ای در وضع میتوکندری‌ها دیده می‌شود. مشخص شده که سیانور، دی‌نیتروفنل و سایر بازدارندگان اکسیداسیون موجب تورم میتوکندری‌ها می‌شود و تراکم ATP موجب انقباض (فشردگی) آنهاست. تغییرات فشار اسمزی نیز می‌تواند موجب تورم یا انقباض میتوکندری‌ها باشد. فسفات غیرآلی، گلوتاتیون احیاء شده، Ca^{++} و اسیدهای چرب به تورم میتوکندری کمک کرده و ATP از تورم آن جلوگیری می‌کند.

انقباض میتوکندری وابسته به وجود پروتئین انقباضی است که ویژگی‌هایی شبیه لاکتومیوزین عضله دارد. تغییرات وسیع‌تری در حجم میتوکندری‌ها به وسیله عدهٔ زیادی از عوامل امکان‌پذیر است که بین آنها به‌خصوص Ca^{++} و تیروکسین اثر قابل ملاحظه‌ای دارند. اثر فیزیولوژیکی تیروکسین در پرکاری تیروئید ممکن است در نتیجه تورم میتوکندری‌ها باشد که به دنبال آن اکسیداسیون از فسفوریلاسیون جدا می‌شود.

برخی کُرتیکواستروئیدها می‌توانند موجب تورم میتوکندری‌ها شوند. تورم میتوکندری‌ها ممکن است به دلیل شرایط مرضی مثل شرایطی که به وسیله عوامل سرطان‌زا و سموم ایجاد می‌شود نیز صورت گیرد. در میتوکندری‌های منفک (جداشده) بررسی تورم و انقباض آسان‌تر است. وقتی از فیزیولوژی میتوکندری بحث کنیم باز هم به پدیده‌های تورم و انقباض میتوکندری‌ها توجه خواهیم کرد.

شکل

میتوکندری‌ها در برابر عمل فیکساتورها ساختمان‌های بی‌ثباتی هستند، به همین دلیل برای تثبیتشان بایستی از روش‌هایی استفاده کرد که ساختمان لیپوپروتئینی آنها به وسیله اثر طولانی عوامل اکسیدکننده مثل تتراکسیداسمیوم، اسیدکرومیک، بی‌کرومات پتاسیم به خوبی حفظ گردد. مواد رنگی که به‌طور معمول برای رنگ‌آمیزی میتوکندری‌ها

1- micromanipulation

به کار می‌رود هماتوکسیلین‌فریک‌رُگو[1] و فوشین اسیدآلتمن است.

شکل میتوکندری‌ها متغیّر امّا اغلب رشته‌ای یا دانه‌ای است. میتوکندری‌ها در برخی مراحلِ عمل خود می‌توانند به شکل‌های دیگری درآیند، مثلاً، یک میتوکندری طویل ممکن است در یک انتهای خود متورم شده و به صورتی شبیه گرز درآید، یا میان تهی شده و شکلی شبیه راکت تنیس به خود بگیرد. گاهی میتوکندری‌ها حفره‌مانند[2] شده و دارای بخش مرکزی روشنی می‌شوند، در سلول‌های کبدی ماهی‌ها، چند ساعت پس از ورود غذا به معده، میتوکندری‌های رشته‌ای ممکن است شکل یک گرز یا یک راکت به خود گرفته و یا حتی حفره‌ای شوند بعد از ۴۸ ساعت این تغییر شکل متوقف شده و میتوکندری‌ها دوباره به شکل اصلی خود باز می‌گردند.

اندازه

ابعاد میتوکندری‌ها نیز متغیر است. در بیشتر سلول‌ها ضخامت میتوکندری‌ها به نسبت ثابت (حدود ۰/۵μm) و طول آنها متغیر است و تا ۷μm می‌رسد. در عین حال به تناسب مراحل عملِ سلول، میتوکندری ممکن است به شکل رشته‌ای بسیار باریک (۰/۲μm) یا ضخیم (۲μm) درآید. در میتوکندری‌های تثبیت شده، ابعاد میتوکندری‌ها به فشار اسمزی و pH فیکساتور نیز وابسته است. اگر pH اسیدی باشد میتوکندری‌ها شروع به قطعه‌قطعه شدن کرده، حفره‌دار می‌شوند.

برتری استفاده از فیکساتورهای موازنه شده با pH فیزیولوژیکی مناسب، برای تثبیت میتوکندری‌ها به خوبی مشخص شده است.

جدول ۱۱-۱ مثال‌هایی از اطّلاعات کمّی (مقداری) در زمینه تعداد و ابعاد میتوکندری‌ها در سلول‌های کبدی را نشان می‌دهد که با میکروسکوپی الکترونی مشخص شده است.

اقتباس از لود Loud (۱۹۶۸)

به‌طور خلاصه، شکل میتوکندری‌ها از سلولی به سلول دیگر تغییر می‌کند اما در سلول‌های هم نوع یا در سلول‌هایی که عمل مشترکی دارند شکلشان کم‌وبیش ثابت است.

جدول ۱۱-۱. تعداد و اندازه‌هایی از میتوکندری‌های سلول‌های کبدی موش

	سلول‌های جانبی	سلول‌های میانی	سلول‌های مرکزی
تعداد هر سلول	۱۰۶۰	۱۳۰۰	۱۶۰۰
حجم سیتوپلاسمی که اشغال کرده‌اند (٪)	۱۹/۸	۱۹/۱	۱۲/۹
قطر (میکرون)	۰/۵۶	۰/۴۷	۰/۳۲
درازا (میکرون)	۳/۸۵	۴/۳۲	۵/۰۴
حجم (میکرومتر مکعب)	۰/۹۵	۰/۷۵	۰/۴۱

مکان

میتوکندری‌ها اغلب در سیتوپلاسم پراکنش یکنواختی دارند اما استثنائات زیادی از این قاعده وجود دارد. اغلب، میتوکندری‌ها در اطراف هسته و در بخش‌های کناری سیتوپلاسم پراکندگی بیشتری دارند چنین پراکنشی بیشتر در شرایط مرضی دیده می‌شود. برخی از اشکال پراکنش میتوکندری‌ها نیز به افزایش موادی مثل گلیکوژن و

1- Regaud 2- Vesicular

اسیدهای چرب که موجب جابه‌جایی این اندامک‌ها می‌شوند بستگی دارد. در طول میتوز میتوکندری‌ها در مجاورت دوک جمع می‌شوند. وقتی تقسیم پایان می‌یابد، در دو سلول دختر پراکنش تقریباً یکسانی دارند. پراکنش میتوکندری‌ها در سیتوپلاسم را بایستی در ارتباط با عمل آنها از نظر تأمین انرژی مطرح کرد. در برخی سلول‌ها این اندامک‌ها می‌توانند به‌صورت آزاد حرکت کرده و ATP را به جایی که مناسب باشد انتقال دهند.

در عده دیگری از سلول‌ها، میتوکندری‌ها در نزدیکی محلی که نیاز به انرژی دارد به‌صورت پایدار (ثابتی) باقی می‌مانند. برای مثال در برخی سلول‌های ماهیچه‌ای (مثل دیافراگم) میتوکندری‌ها به صورتی شبیه حلقه یا کمربند در اطراف باند I میوفیبریل‌ها مجتمع هستند. در سلول‌های استوانه‌ای یا مخروطی پرده شبکیّه، همه میتوکندری‌ها در بخشی از قسمت درونی مجتمع هستند. در سلول‌های دارای میکروویلّوزیته‌ها در روده باریک و همچنین در سلول‌های لوله‌های ادراری که سطح پلاسمالم چین‌خوردگی‌هایی دارد، میتوکندری‌ها دقیقاً در مجاورت بخش‌های تغییر شکل یافته و فعال پلاسمالم قرار دارند. این ارتباط نزدیک با غشاء به علت نیاز پلاسمالم به انرژی برای انتقال فعّال آب و مواد محلول است.

میتوکندری‌ها ممکن است آرایش (جهت قرار گرفتن) کم‌وبیش مشخصی داشته باشند. به‌عنوان مثال در سلول‌های استوانه‌ای معمولاً در جهت پایین - بالا به موازات محور اصلی سلول قرار می‌گیرند. در گویچه‌های سفید، میتوکندری‌ها نسبت به سانتریول‌ها به وضع شعاعی قرار دارند. تصور می‌شود که این جهت‌گیری‌ها وابسته به جهت جریان‌های انتشاری در سلول‌هاست که به فراساختار زمینه سیتوپلاسمی و دستگاه واکوئلی بستگی دارد.

تعداد

میتوکندری‌ها در تمام سلول‌های دارای تنفس هوازی، به جز در باکتری‌ها که، آنزیم‌های تنفسی آنها در غشاء سیتوپلاسمی جایگزین شده‌اند، وجود دارند. تشخیص ارزش میتوکندریی یک سلول دشوار است، اما اغلب به حسب نوع سلول و مرحله عمل سلول تغییر می‌کند. تصور می‌شود در کبد، میتوکندری‌ها ۳۰ تا ۳۵٪ و در کلیه ۲۰٪ کل مقدار پروتئین سلول را شامل می‌شوند. در بافت لنفی این مقدار خیلی کمتر است. در هر گرم از عصاره بافت تازه کبد موش تقریباً $۷/۸ \times ۱۰^{۱۰}$ میتوکندری وجود دارد، یک سلول معمولی کبد تقریباً دارای ۱۰۰۰ تا ۱۶۰۰ میتوکندری است، اما این تعداد در طول تحلیل رفتن سلول و همچنین در طول سرطانی شدن کاهش می‌یابد. این کاهش‌ها ممکن است مربوط به کم شدن اکسیداسیون باشند که، با افزایش گلیکولیز بی‌هوازی در حالت سرطان همراه است.

یکی دیگر از موارد قابل توجه و شناخته شده این است که در نتیجه استفاده مکرر از تیروکسین، تعداد میتوکندری‌ها افزایش می‌یابد. بالاترین ارزش میتوکندریی در برخی اووسیت‌هاست که می‌توانند تا ۳۰۰۰۰۰ میتوکندری داشته باشند. در سلول‌های گیاهان سبز، تعداد میتوکندری‌ها خیلی کمتر از سلول‌های جانوری است زیرا بسیاری از اعمال میتوکندری‌ها، به وسیله کلروپلاست‌ها انجام می‌شود.

خلاصه

ریخت‌شناسی میتوکندری‌ها

میتوکندری‌ها از اندامک‌های موجود در سیتوپلاسم همهٔ سلول‌های یوکاریوتی هستند. این اندامک‌ها نوعی دستگاه انتقال انرژی هستند که موجب می‌شوند انرژی شیمیایی موجود در مواد غذایی با عمل فسفوریلاسیون اکسیداتیو در پیوندهای فسفات پرانرژی (ATP) ذخیره شود. میتوکندری‌ها را می‌توان در سلول‌های زنده با استفاده از

سبزژانوس مشاهده کرد. میتوکندری‌ها دارای جنبش‌های فعال و غیرفعال هستند و نیز توانایی تغییر حجم و شکل دارند که این تغییرات با عمل آنها وابستگی دارد. یون‌ها مثل Ca^{++}، هورمون‌های مختلف و برخی مواد مخدّر موجب تورم میتوکندری‌ها می‌شوند.

تثبیت میتوکندری‌ها با فیکساتورهای مناسب امکان بررسی دقیق‌تر آنها را به‌دست می‌دهد. به‌طور معمول قطر آنها حدود ۰/۵ میکرومتر و طولشان متغیّر است و می‌تواند تا ۷ میکرومتر برسد. حدود ۱۰۰۰ تا ۱۶۰۰ میتوکندری در هر سلول کبدی و حدود ۳۰۰۰۰۰ از آنها در برخی اووسیت‌ها وجود دارد.

پراکنش میتوکندری‌ها در سلول با نقش آنها در تأمین انرژی وابسته است. آرایش آنها در سلول با سازمان‌یافتگی زمینه سیتوپلاسم و دستگاه واکوئلی ارتباط دارد.

فراساختار میتوکندری

پس از به کارگیری فیکساتورهای مناسب مثل گلوتارآلدئید - اسمیوم و تهیه برش‌های بسیار نازک و مشاهده برش‌ها با میکروسکوپ‌های الکترونی گذاره بخش‌های مختلف زیر در میتوکندری‌ها قابل تشخیص هستند:

غشاء خارجی: حدود ۶۰ تا ۷۵ A° ضخامت دارد و از نوع غشاءهای زیستی با ساختمان سه لایه‌ای است. این غشاء صاف و بدون چین‌خوردگی است و همانند سدّی بخش‌های درونی میتوکندری را از سیتوزول جدا می‌کند. هیچ ریبوزومی به آن نچسبیده است. گاهی غشاء شبکه درون سیتوپلاسمی به‌صورت کم‌وبیش کاملی میتوکندری را احاطه می‌کند. اما هیچگاه پیوستگی بین غشاء خارجی میتوکندری و غشاء شبکه دیده نشده است. غشاء خارجی می‌تواند تحت تأثیر جریان‌های سیتوپلاسمی تغییر شکل دهد. پس از تثبیت با اسمیوم، به نظر می‌رسد که غشاء خارجی از دو لایه متراکم نسبت به الکترون‌ها که به وسیله یک بخش میانی روشن (کم تراکم) جدا شده‌اند، ساخته شده است. این ساختمان سه بخشی همان ساختمان (غشاء واحد) است که به وسیله رابرتسن مطرح شده و قبلاً نیز به آن اشاره کرده‌ایم.

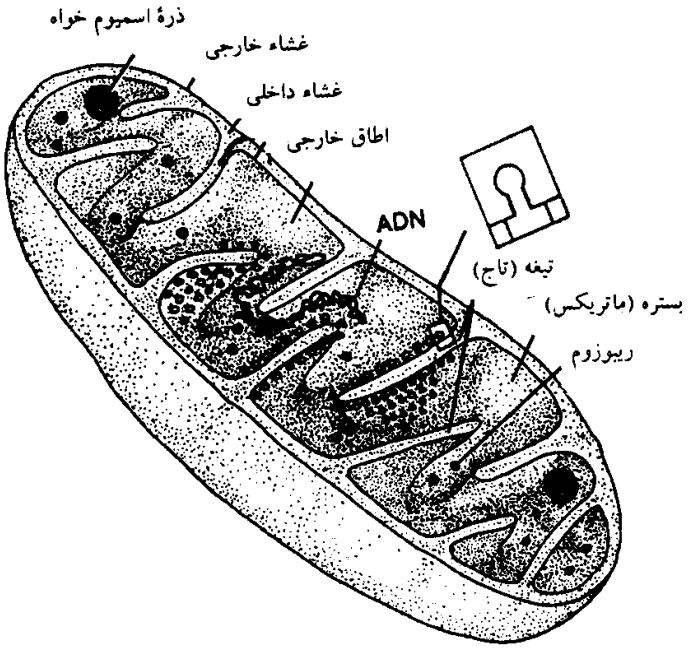
اطاق خارجی[1]: زیر غشاء خارجی و تا رسیدن به غشاء داخلی فضایی با وسعت متوسط حدود ۱۰۰ تا ۲۰۰ A° وجود دارد که آن را اطاق خارجی نامند. این اطاق شامل دو بخش است: یکی فضای بین دو غشاء و دیگری درون (قلب) تاج‌ها (کریستاها یا کِرِت‌ها[2]) (شکل ۱۱-۱).

وسعت اطاق خارجی در همهٔ بخش‌های میتوکندری یکسان نیست. در برخی بخش‌ها دو غشاء به‌هم نزدیک شده وظاهراً به‌هم چسبیده‌اند، در بخش‌های دیگر با دور شدن دو غشاء وسعت اطاق خارجی از A° ۲۰۰ نیز می‌گذرد. در هر میتوکندری تا صد ناحیه مجاورت دو غشاء وجود دارد.

مقابل به نواحی مجاورت دو غشاء در سیتوزول تراکمی از ریبوزوم‌های سیتوپلاسمی دیده می‌شود. برخی محققان با توجه به این وضعیت معتقدند که محل‌های مجاورت دو غشاء، جایگاه‌هایی برای نفوذ بخشی از پروتئین‌های مورد نیاز، از سیتوزول به میتوکندری هستند.

اطاق خارجی از مجموعه مواد مختلفی پر شده است. در ترکیب این مواد آب، نمک‌های کانی، یون‌ها، ADP، ATP، O_2، CO_2، برخی پروتئین‌ها، قندها و چربی‌ها وجود دارد. به دلیل حضور دایمی چربی‌ها، محتویات اطاق خارجی میتوکندری بسیار سیّال است. به‌طوری که خواهیم دید مقدار آب اطاق خارجی بر تغییر وضع غشاء داخلی و کریستاهای (تیغه‌های) آن و در نتیجه بر میزان سنتز ATP به وسیله میتوکندری اثر زیادی دارد.

1- outer chamber 2- Cretes



شکل ۱۱-۱. نمای سه بعدی میتوکندریی که از طول برش داده شده است. بخش‌های اصلی روی شکل مشخص شده است. تیغه‌ها یا تاج‌ها (کرت‌ها) چین‌خوردگی‌های غشاء داخلی هستند که ذرات F_1 (عوامل فسفوریلاسیون اکسیداتیو) روی سطح بشره‌ای آنها قرار گرفته‌اند. بخش درون مربع کوچک یکی از ذرات F_1 را مشخص می‌سازد.

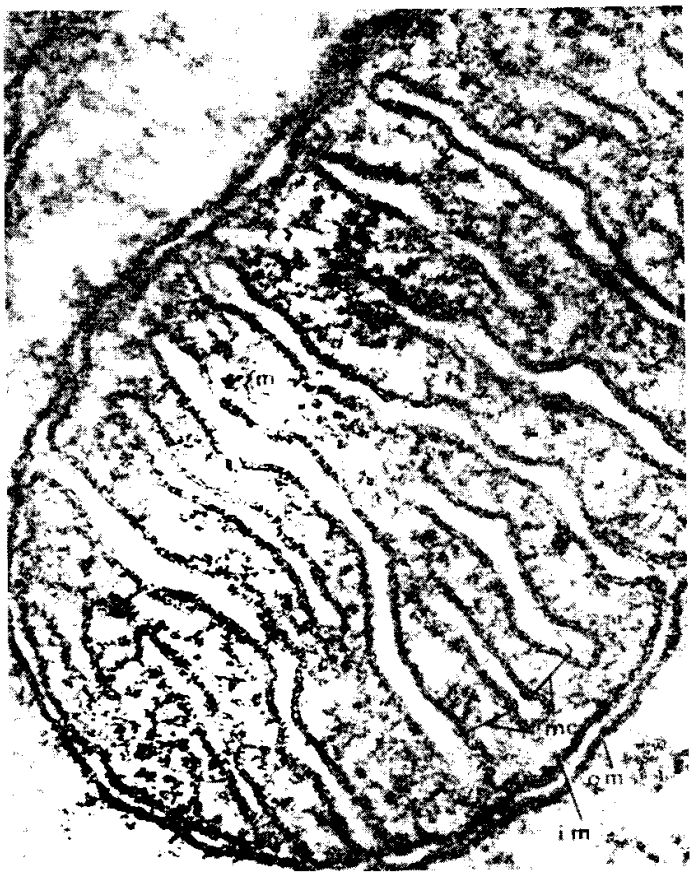
غشاء داخلی[1]: غشاء داخلی ضخامتی همانند غشاء خارجی دارد امّا به‌طوری که خواهیم دید ترکیب شیمیایی آن متفاوت است. غشاء داخلی چین‌خوردگی‌های فراوانی دارد و دنباله‌های چین‌خورده آن به طرف داخل میتوکندری رفته، به‌صورت بخش‌های لوله‌ای، یا چین‌های سطحی که گاه منشعب یا پیچ‌وخم‌دار هستند یعنی تاج‌ها (کریستاها) در می‌آیند. آثار برش‌های تیغه‌ها و لوله‌ها به فراوانی در ماده زمینه‌ای و حتی به صورتی مجزای از غشاء دیده می‌شوند. در بسیاری از سلول‌های گیاهی تیغه‌ها و لوله‌های حفره‌ای شده به شکل نامنظمی درمی‌آیند. طول کلی کرت‌های اندازه‌گیری شده بر روی برش‌ها متفاوت است، در سلول‌های مرکز استراحت در قسمت انتهایی ریشه ذرّت حدود ۱/۳μm، در سلول‌های کلاهک ۲/۳μm و در سلول‌های پوست ریشه حدود ۱/۷μm است. در سلول‌های جانوری تیغه‌ها اغلب منظم‌تر و به موازات یکدیگر قرار دارند. برخی محققین تصور کرده‌اند که تیغه‌ها نتیجه چین‌خوردگی‌های دیوارهٔ داخلی نیستند و از طرفی تیغه‌ها می‌توانند درون میتوکندری‌ها را به بخش‌های مستقل جدا از هم تقسیم کنند. گرچه دشوار است که این دو امکان را به‌طور کلی رد کنیم اما مطالعات انجام شده برای شناخت وضع تیغه‌ها و به‌عنوان مثال بررسی برش‌های پشت سرهم (سری) این نظریات را تأیید نمی‌کند. تحقیقات جدیدی که به‌خصوص روی میتوکندری‌های جدا شده (ایزوله) صورت گرفته است نشان می‌دهد که تیغه‌ها اساساً چین‌خوردگی‌های غشاء داخلی هستند و گرچه گاهی طویلند اما درون میتوکندری را به بخش‌های جدا از هم تقسیم نمی‌کنند (شکل ۱۱-۲).

اطاق داخلی[2]: فضای درونی میتوکندری را که به وسیله غشاء داخلی محدود شده است، اطاق داخلی نامند. اطاق داخلی از ماده زمینه‌ای[3] (بستره) پُر شده است. مادهٔ زمینه‌ای ترکیب و ویژگی‌های فیزیکی کلی شبیه سیتوزول دارد. همانند یک ژل است، تراکم پروتئین‌های محلول در آن زیاد است و دارای آنزیم‌های ویژه از جمله آنزیم‌های چرخه کربس، آنزیم‌های اکسیداسیون اسیدهای چرب بتا (پیچه‌لینن[4])، آنزیم‌های اکسیداسیون اسیدهای آمینه و... است. در ماده زمینه‌ای مولکول‌های کوچک‌تری نیز وجود دارند. ساختمان دوگانه (سخت - مایعی) بستره قابل توجه است و بسیاری از ویژگی‌های مکانیکی میتوکندری‌ها و برای مثال تغییر شکل و تورم آنها در شرایط مختلف فیزیولوژیکی یا تجربی را توجیه می‌کند.

1- inner membrane 2- inner chamber 3- matrix = matrice 4- Lynenne helix

در بستره تعدادی ریبوزوم (میتوریبوزوم) به حالت ریبوزوم‌های منفرد (منوزوم[1]) و یا ریبوزوم‌های چندتایی (پلی‌زوم[2]) وجود دارد. (شکل ۱۱-۱) این ریبوزوم‌ها همانند ریبوزوم‌های سلول‌های پروکاریوتی از نوع ۷۰S هستند و در پستانداران کوچک‌تر و از نوع ۵۵S می‌باشند.

به حسب سن و نوع سلول در بستره میتوکندری یک یا چند مولکول DNA بسته (حلقوی) یافت می‌شود که به حال نوکلئوئید است یعنی در بستره آزاد نیست و اغلب با بخش‌هایی از غشاء داخلی پیوستگی دارد و نیز به دلیل همانندسازی ارزش بیش از یک مولکول DNA را دارد. DNA میتوکندری شبیه مولکول DNA در پروکاریوت‌ها، غنی از سیتوزین و گوانین است. پایداری زیادی در برابر گرما دارد و می‌تواند سنتز بخش مهمی از پروتئین‌های میتوکندری را هدایت کند اما قادر به رمز کردن همه پروتئین‌های میتوکندری نمی‌باشد. DNA میتوکندریی کوچک است (دارای ۱۶۵۰۰ جفت باز در پستانداران)، می‌تواند همانندسازی کند؛ DNA پلیمراز آن از نوع γ (گاما) و با عملکردی شبیه DNA پلیمراز پروکاریوتی است. DNA میتوکندریی امکان دو رگه شدن با DNA هسته سلولی را که در آن قرار گرفته است، ندارد.



شکل ۱۱-۲. میکروگراف الکترونی از بخشی از یک میتوکندری سلول ترشحی لوزالمعده. غشاء خارجی (me)، غشاء داخلی (mi) و تاج‌ها یا تیغه‌های (کرت‌های) میتوکندریی (Cm) و ماده زمینه‌ای (ماتریس) (m)، به خوبی مشخص هستند. عکس از G.E.palad؛ درشت‌نمایی ۲۰۷/۰۰۰ برابر.

در بستره ذرات اسمیوم دوست با درشتی حدود ۲۰۰ تا ۴۰۰ میکرومتر وجود دارند. این ذرات یا از گویچه‌های لیپیدی و یا محل تجمّع کاتیون‌ها به ویژه Ca^{++} هستند.

رنگ‌آمیزی منفی[3] امکان به‌دست آوردن آگاهی‌های بیشتری از فراساختار میتوکندری‌ها را فراهم آورده است. به دنبال تورم و پاره شدن میتوکندری‌ها در محلولی کم‌تراکم و غوطه‌ور ساختن این میتوکندری‌ها در فسفوتنگستات، بخش تاج‌های غشاء داخلی پوشیده از ذراتی به بزرگی ۸۰ تا ۱۱۰ آنگستروم به نظر می‌رسد که آنهارا اکسیزوم[4] یا ذرات حیاتی (ذرات ابتدایی[5]) نامند. این ذرات که گاهی آنها را ATPase ویژه و نیز ATP سنتتاز ویژه می‌نامند، وزن مولکولی حدود ۴۷۰ هزار دالتون دارند و از مجموع حداقل ۱۵ جزء پلی‌پپتیدی ساخته شده‌اند که هر جزء وزن جرم مولکولی بین ۷۵۰۰ و ۵۳۰۰۰ دالتون دارد.

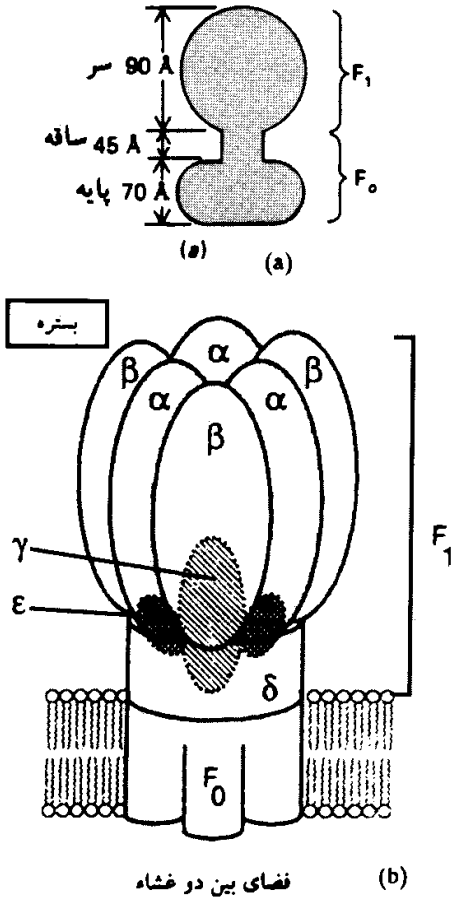
اکسیزوم‌ها با فواصل منظّم حدود ۱۰۰ آنگستروم بر سطح بستره‌ای تاج‌ها قرار گرفته‌اند. با محاسبات انجام شده

1- monosome 2- Polytsome 3- Negative Staining 4- Oxysome
5- Elementary Particles

تعداد این ذرات در هر میتوکندری 10^4 تا 10^5 عدد برآورد شده است. در فراساختار هر اکسیزوم بخش‌های زیر وجود دارد (شکل ۱۱-۳):

۱- **سر**[1]: تقریباً کروی، پروتئینی و متشکل از چندین زیر واحد پلی‌پپتیدی است (شکل ۱۱-۳). رفتار آنزیمی دارد (ATP سنتتاز ویژه) و در شرایط خاصی که در بحث‌های آینده شرح داده می‌شود، با عمل فسفوریلاسیون اکسیداتیو (ترکیب ADP و Pi) موجب بیوسنتز ATP می‌گردد. این بخش حدود ۹۵ آنگستروم بلندی دارد و به احترام راکر[2]، پژوهشگری که اول بار نقش این بخش را شناخت، آن را عامل راکر می‌نامند و با F_1 یا PF_1 مشخص می‌سازند. عمل این بخش در دمای کم (صفر درجه سانتیگراد) متوقف می‌شود ولی اولیگومایسین بر آن اثری ندارد.

۲- **ساقه**[3]: بخشی است پروتئینی، کوچک با اندازه حدود ۴۵ آنگستروم، حساس به اولیگومایسین و آن را با O.S.C.P[4] مشخص می‌سازند. این بخش انرژی حاصل از انتقال الکترون در زنجیر تنفسی را به دام می‌اندازد و در اختیار بخش سر می‌گذارد تا امکان فسفوریلاسیون اکسیداتیو و برقراری پیوند پرانرژی بین ADP و Pi فراهم آید. بنابراین نقش اساسی را در تأمین انرژی مورد نیاز برای سنتز ATP به عهده دارد (شکل ۱۱-۳).



شکل ۱۱-۳. فراساختار اکسیزوم. a) شکل عمومی، b) چگونگی قرار گرفتن اکسیزوم در غشاء داخلی میتوکندری و زیر واحدهای پلی‌پپتیدی بخش سر.

۳- **پایه**[5]: بخشی است پروتئینی متشکل از چند جزء پلی‌پپتیدی که به‌طور کامل در غشاء داخلی میتوکندری و در لابلای مولکول‌های فسفولیپیدی غشایی قرار دارد (مجموعه لیپوپروتئینی، شکل ۱۱-۳) این بخش با اندازه حدود ۷۵ آنگستروم دارای کانال عبور پروتون‌هاست و هنگامی که تراکم پروتون‌ها در اطاق خارجی میتوکندری زیاد شود، پروتون‌ها با عبور از این کانال به طرف بستره جابه‌جا شده و بخش سر را در جهت ATP سنتتازی تحریک می‌کنند. بخش پایه را با علامت F_0 یا PF_0 معرفی می‌کنند (شکل ۱۱-۳). جالب است یادآور شویم که غشاء سلولی باکتری‌ها نیز دارای ذرات اکسیزومی با جایگزینی مشابه (به طرف سیتوپلاسم باکتری) می‌باشد. در کلروپلاست‌ها نیز ذرات مشابه اکسیزوم‌ها اما با آرایشی عکس این ذرات در غشاء داخلی میتوکندری‌ها وجود دارد. جهت قرار گرفتن این ذرات با جهت پمپ پروتون و چگونگی جابه‌جایی پروتون‌ها متناسب است.

تنوع ساختمان

توصیف کلی که در مورد ساختمان میتوکندری داده شد به منظور شناسایی میتوکندری‌ها در اغلب سلول‌ها معتبر است. باین ترتیب به نظر می‌رسد که در مراحل اولیه تکاملی الگوی مشترکی از میتوکندری ایجاد شده و سپس

1- Head 2- Racker 3- Stalk
4- Oligomicine Sensibility Compartment Protein 5- Base Piece

بدون تغییرات عمده از تک‌سلولی‌ها، تا پستانداران و از جلبک‌ها تا گیاهان گلدار انتقال یافته است. در عین حال می‌توان مواردی از تنوع ساختمانی را در ساختمان میتوکندری‌ها مشاهده کرد. برای مثال تیغه‌ها می‌توانند در جهت طولی قرار گیرند (شکل ۱۱-۳) این وضع در اعصاب و ماهیچه‌ای مخطط دیده می‌شود. تیغه‌ها ممکن است ساده یا منشعب بوده، شبکه درهمی را بسازند. در تک‌سلولی‌ها، حشرات و در سلول‌های ناحیه گلومرولی غدد فوق‌کلیوی، چین‌خوردگی‌های غشاء داخلی به جای حالت تیغه‌ای حالت لوله‌ای دارند و معمولاً لوله‌ها موجب ایجاد ساختمان‌هایی دارای تشکیلات منظم می‌شوند.

تعداد تیغه‌ها در واحد حجم یک میتوکندری نیز متغیر است. میتوکندری‌های کبد و سلول‌های زایشی تیغه‌های کمتر و بستره فراوان‌تری دارند، در حالی که میتوکندری‌های سلول‌های عضلانی دارای تیغه‌های فراوان و بسترهٔ کمتری هستند. در برخی موارد تیغه‌ها به حدّی زیادند که منظره بلورهایی را به خود می‌گیرند. بیشترین تراکم تیغه‌ها در میتوکندری‌های عضلات پرواز حشرات مشاهده شده است. به نظر می‌رسد همبستگی‌ای بین تعداد کرت‌ها و میزان فعالیت فسفوریلاسیون اکسیداتیو میتوکندری وجود داشته باشد.

سلول‌های نواحی مختلف منطقه قشری غدد فوق‌کلیوی تغییرات فراساختاری قابل توجهی را نشان می‌دهند. یکی از خصوصیات این میتوکندری‌ها وسعت فضای درون تیغه‌ها یا لوله‌هاست. این فضاها به خوبی قابل مشاهده می‌گردند و به سرپوش‌های لوله‌ای یا حفره‌ای شبیه هستند که نسبت به بستره تراکم خیلی کمتری دارند. تشکیل این ساختمان‌ها با فعالیت ترشحی اختصاصی غده وابسته است. در این حالت، میتوکندری‌ها علاوه بر انجام اکسیداسیون‌های سلولی، به‌طور فعالی در سنتز هورمون‌های استروئیدی درگیر هستند.

حساسیت میتوکندری‌ها نسبت به آسیب‌های سلولی - تحلیل رفتن میتوکندری‌ها

میتوکندری‌ها ساختمان‌های حساسی هستند که به آسانی به وسیله عوامل مختلفی تخریب می‌شوند، این اندامک‌ها یکی از حساس‌ترین اجزای سلولی در برابر آسیب‌های وارد به سلول هستند. این تغییراتِ میتوکندری‌ها تا حدودی بازگشت‌پذیر است و میتوکندری می‌تواند دوباره به وضع عادی خود بازگردد. به هر حال چنانچه تخریب از حدودی بگذرد بازگشت‌ناپذیر خواهد شد و این حالت را اغلب تحلیل رفتن (زوال) میتوکندری نامند (شکل ۱۱-۴ و ۱۱-۵).

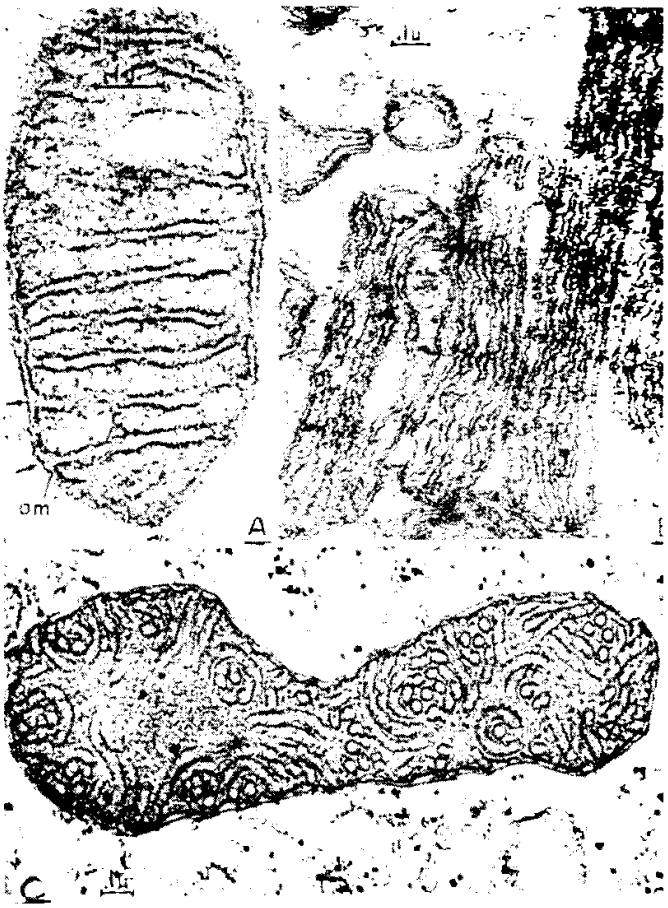
سه نوع تغییر امکان‌پذیر است. (۱) قطعه‌قطعه شدن و تبدیل به دانه‌های کوچک در نتیجه تجزیه و پخش شدن (۲) تورم شدید همراه با تبدیل شدن به واکوئل‌های درشت (۳) تجمع زیاد مواد و تبدیل میتوکندری‌ها به ذرات شفاف. تغییر آخر حالتی است که آن را تورم مبهم و تحلیل شفاف گویند و اغلب منجر به مرگ سلول می‌شود.

از طرف دیگر، اغلب در سلول‌هایی که ظاهراً به وضع عادی‌اند، در لایه‌های اتولیز که نوعی از لیزوزوم‌ها (سیتولیزوزوم) را می‌سازند، میتوکندری‌هایی در حال تحلیل رفتن دیده می‌شوند.

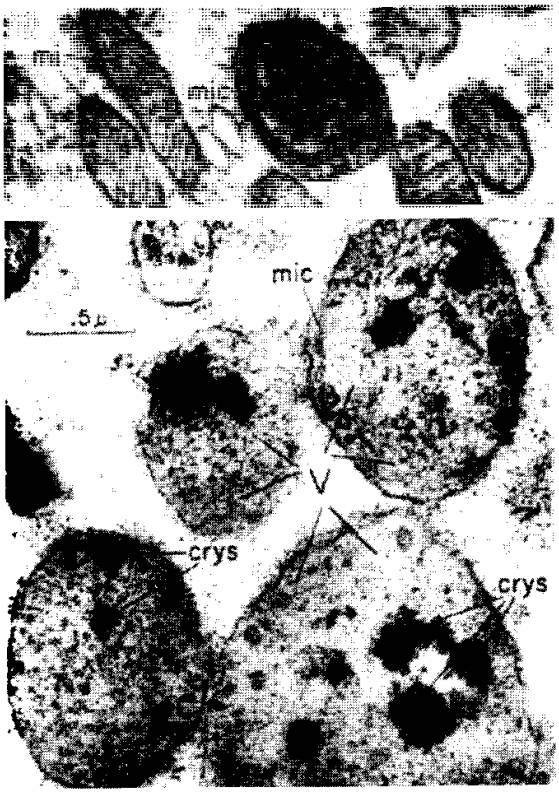
نوع دیگری از تحلیل رفتن میتوکندری‌ها ادغام آنها به منظور تشکیل اجسامی است که آنها را کوندریوسفر نامند. این حالت در مبتلایان به آسکوربوت طولانی دیده می‌شود. در غده فوق‌کلیوی، عده‌ای از میتوکندری‌ها مسطح شده به‌صورت برگه نازک چندلایه‌ای درمی‌آیند. همزمان با این تغییر، عدهٔ زیادی از این قبیل میتوکندری‌ها به صورتی متحدالمرکز قرار گرفته و در نهایت کوندریوسفرهای بزرگ لایه‌لایه را می‌سازند.

ترکیب شیمیایی میتوکندری

اعمال مختلف میتوکندری‌ها آن چنان با ساختمانشان وابسته است که نمی‌توان یکی را جدا از دیگری بررسی



شکل ۱۱-۴. میکروگراف‌های نشان دهنده تنوع ساختمانی میتوکندری‌ها. A) میتوکندری بیضه موش. C، تیغه عرضی،me، غشاء خارجی، فلش‌ها محل تیغه‌ها در غشاء داخلی را مشخص می‌سازد. B)، میتوکندری غده جنسی حلزون. تیغه‌های طولی در میتوکندری‌های اسپرماتوسیت‌ها. C)، میتوکندری در پارامسی، تیغه‌های لوله‌ای ۱۳۰۰۰۰×A، ۶۸۰۰۰× B، ۶۰۰۰۰× C.



شکل ۱۱-۵. میکروگراف الکترونی میتوکندری‌های تخم حلزون. در بالا میتوکندری (mi) معمولی؛ یکی از آنها دارای مولکول‌های پروتئینی است. cmi، تیغه‌های میتوکندری. V ویتلوس. در پایین، همان وضع اما با ویتلوسی خیلی پیشرفته‌تر. میتوکندری‌ها تبدیل به بسته‌های ذخیره‌ای ویتلوسی شده‌اند. مولکول‌های پروتئینی وضعیت متبلور دارند (crys)، 50000×.

کرد به منظور بررسی اعمال میتوکندری‌ها لازم بود به سال ۱۹۴۸ برسیم که کارهای هوژبُم و همکارانش در زمینه جدا کردن میتوکندری‌ها به‌صورت روشی متداول در عدهٔ زیادی از آزمایشگاه‌ها درآید. بعد از این مرحله پیشرفت‌های سریعی در تحقیقات مربوط به اعمال میتوکندری‌ها صورت گرفته است.

از همان اولین نتایج به‌دست آمده مشخص شد که میتوکندری‌ها ساختمان لیپوپروتئینی دارند، ۶۵ تا ۷۰٪ ساختمانشان از پروتئین‌ها و ۲۵ تا ۳۰٪ آنها از لیپیدهاست.

قسمت اعظم این لیپیدها (۹۰٪) از فسفولیپیدها (به‌خصوص لسیتین و سفالین) است، مقدار کمی کلسترول و لیپیدهای دیگر نیز در میتوکندری‌ها وجود دارد.

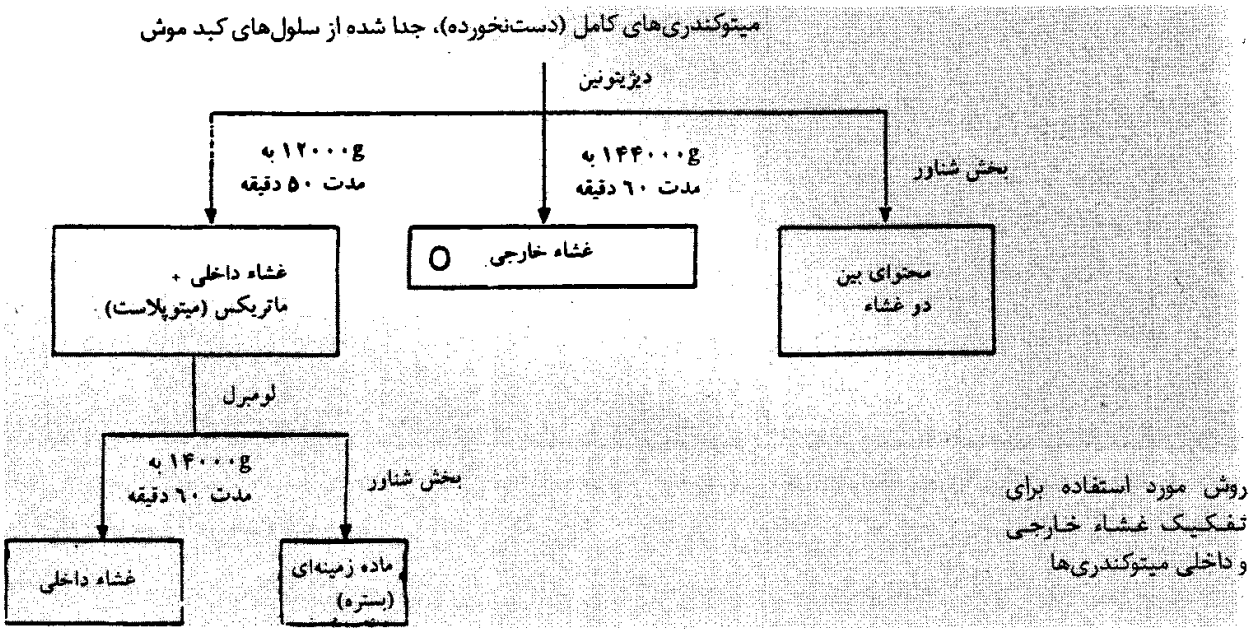
غشاء خارجی ۲ تا ۳ بار فسفولیپید بیشتری دارد. قسمت اعظم این فسفولیپیدها از فسفاتیدیل اینوزیتول است. بخش عمده غشاء داخلی از کاردیولیپین (دی فسفاتیدل - کلسترول) ساخته شده است.

بین یون‌های معدنی، K^+، Mg^{++} از سایر یون‌ها فراوان‌تر هستند. نوکلئوتیدهای آدنین (آدنوزین منوفسفات AMP، دی‌فسفات ADP و تری‌فسفات ATP)، نیکوتین آمیددی نوکئوتید NAD و نیکوتین آمیددی نوکلئوتیدفسفات NADP تقریباً تمامی ترکیبات آلی فسفردار غیرلیپیدی میتوکندری‌ها را می‌سازند. اسیدریبونوکلئیک همیشه در ترکیب میتوکندری‌ها وجود دارد و مقدار آن حدود ۰/۵٪ وزن خشک میتوکندری است. بعد از جداکردن

میتوکندری‌ها، دو روش اصلی نزدیک به‌هم به کارگرفته می‌شود، یا میتوکندری را به‌صورت یک ذرّه دست‌نخورده یا واحد در نظر می‌گیرند و یا آن را به صورتی تفکیک شده به واحدهای کوچک‌تر مجسم می‌سازند که هر جزء قسمت‌هایی از کل فعالیت آنزیمی میتوکندری را شامل می‌شود. هر دو روش اطلاعات جالبی از سازمان مولکولی و اعمال میتوکندری به‌دست داده‌اند (جدول ۱۱-۲).

جداسازی و ویژگی‌های غشاءهای میتوکندری

در سال‌های اخیر با استفاده از اولتراسانتریفوگاسیون بر پایه میزان غلظت، دو غشاء میتوکندری‌ها را جدا کرده‌اند. طرح زیر یکی از روش‌های جداسازی بخش‌های مختلف میتوکندری‌ها را نشان می‌دهد.



روش مورد استفاده برای تفکیک غشاء خارجی و داخلی میتوکندری‌ها

با این روش می‌توان ماده زمینه‌ای را نیز جدا کرد و اطلاعاتی را در مورد فضای بین دو غشاء میتوکندری به‌دست آورد. بین بخش‌های مختلف میتوکندری از جمله بین غشاء خارجی و داخلی از نظر ترکیب شیمیایی، نفوذپذیری و طرز عمل اختلافات اساسی وجود دارد.

جدا کردن میتوپلاست از غشاء خارجی امکان داده است که جایگزینی دقیق سیستم آنزیمی میتوکندری را مشخص کرده، به تفاوت‌های مهمی بین دو غشاء آن پی ببریم.

در مقایسه با بخش غشاء داخلی غشاء خارجی سبک‌تر است و تا ۴۰٪ لیپید دارد (در غشاء داخلی مقدار لیپیدها به ۲۰٪ می‌رسد)، غشاء خارجی کلسترول بیشتری دارد و مقدار فسفاتیدیل اینوزیتول آن بیشتر است، برعکس کاردیولیپین کمتری دارد. این اختصاصات شیمیایی و همچنین حضور NADH سیتوکروم ردوکتاز امکان می‌دهد شباهتی را بین ترکیب غشاء خارجی با غشاء شبکه درون سیتوپلاسمی در نظر بگیریم. NADH - سیتوکروم C ردوکتاز مسئول اکسیداسیون NADH خارج میتوکندری است و از یک فلاووپروتئین و سیتوکروم b5 ساخته شده است.

جدول ۱۱-۲. اختلافات عمدهٔ غشاء داخلی و غشاء خارجی میتوکندری

غشاء خارجی	غشاء داخلی
لیپیدها حدود ۴۰٪ مادهٔ خشک غشاء مقدار کلسترول و فسفاتیدیل اینوزیتول بیشتر کاردیولیپین (ایلی گلیسروفسفات) کمتر نسبت لیپید به پروتئین ۱/۸ = $\frac{L}{P}$	حدود ۲۰٪ مقدار کلسترول و فسفاتیدیل اینوزیتول کمتر کاردیولیپین بیشتر ۳:۱ = $\frac{L}{P}$ مقدار زیادی از پروتئین‌ها در داخل لایه چربی قرار دارند. این وضع با روش (انجماد - شکستگی) تأیید می‌شود
فاقد ذرات حیاتی (اکسیزومها) بصورت پاک (کیسه) باخوده و فاقد تاج (کریستا) دارای سیستم NADH سیتوکروم C ردوکتاز متشکل از یک فلاوپروتئین و سیتوکروم b5	دارای ذرات حیاتی دارای تاج‌ها (کریستاها) دارای تمام ترکیبات زنجیر تنفسی و سیستم فسفوریلاسیون اکسیداتیو
آنزیم تشدید کنندهٔ منوآمین‌اکسیداز آنزیم‌های دیگر: سینورنین هیدروکسیلاز اسید چرب کوآنزیم A لیگاز، یک فسفولیپاز و آنزیم‌های مختلف متابولیسم فسفولیپیدها	آنزیم تشدید کنندهٔ سیتوکروم اکسیداز گلیسرول فسفات دهیدروژناز - گرفتن دهیدروژناز چند حامل (ناقل) برای نفوذ فسفات، گلوتامات، آسپارتات، ADP، ATP
به شدت تراوا است و حتی دی‌ساکاریدها از آن عبور می‌کنند نسبت به H^+ غیرقابل نفوذ است. فاقد عوامل زنجیر تنفسی (یا زنجیر انتقال الکترون‌ها)	حتی مولکول‌های ریز هم نمی‌توانند از آن عبور کنند مگر این که ناقل اختصاصی داشته باشند. به کمک ناقل‌ها مثل پروتئین‌های آهن - گوگرددار و نیز از کانال عبور پروتون موجود در پایه اکسیزومها می‌توانند پروتون‌ها را انتقال دهند. عوامل زنجیر تنفسی بصورت جفت مجموعه (کمپلکس) در این غشاء قرار دارند.

پراکنش آنزیم‌ها در میتوکندری

غشاء خارجی

منوآمین‌اکسیداز

NADH - سیتوکروم C ردوکتاز غیرحساس نسبت به رُته‌نُن[1] (نوعی ترکیب حشره‌کُش).

سینورنین هیدروکسیلاز

اسید چرب COA لیگاز

آنزیم‌های متابولیسم فسفولیپیدها

محتویات اطاق خارجی

آدنیلات کیناز

نوکلئوزیددی‌فسفوکیناز

DNA − ase I و ´5 آندونوکلئاز

غشاء داخلی

آنزیم‌های زنجیر تنفسی (زنجیر انتقال الکترون‌ها)، از جمله سیتوکروم‌اکسیداز

ATP سنتتاز ویژه

سوکسینات دهیدروژناز

1- Rotenone

β هیدروکسی بوتیرات دهیدروژناز
کارنیتین اسید چرب استیل ترانسفراز

ماده زمینه‌ای (بستره یا ماتریس)

مالات و ایزوسیترات دهیدروژناز
فوماراز و آکونیتاز
سیترات سنتتاز
دهیدروژنازهای اسیدهای آلفا - ستو
آنزیم‌های اکسیداسیون اسیدهای چرب بتا

جدول زیر آنزیم‌هایی را نشان می‌دهد که می‌توان آنها را به‌عنوان نشانه گذار (شاخص) هر بخش در نظر گرفت.

مواد متشکله	غشاء خارجی	محتوای اطاق خارجی	غشاء داخلی	ماده زمینه‌ای
آنزیم نشانه گذار	منوآمین اکسیداز	آدنیلات کیناز	سیتوکروم‌اکسیداز	مالات دهیدروژناز
مقدار ٪ پروتئین آنزیمی در مواد متشکله	۴/۰	۶/۳	۲۱/۳	۶۶/۹

نفوذپذیری غشاءهای میتوکندری

اختلافات عمده‌ای از نظر قابلیت نفوذپذیری بین غشاءهای میتوکندری‌ها وجود دارد. از غشاء خارجی، آب، الکترولیت‌ها، ساکارز و بسیاری از پلی‌ساکاریدهای آزاد می‌گذرند. برعکس غشاء داخلی نسبت به یون‌ها (مثل H^+، OH^-، Na^+، Cl^-، K^+ و Mg^{++}) و همچنین ساکارز غیرقابل نفوذ است. عبور ADP و ATP و مواد حدواسط چرخه کربس به وسیله ناقل‌های اختصاصی صورت می‌گیرد. این عمل انتقال بسیار پُر اهمیت است زیرا متابولیت‌های سیتوپلاسمی (مثل پیرووات، اسیدهای چرب و گلیسروفسفات) بایستی قبل از اکسیداسیون به ماتریس میتوکندری نفوذ کنند. همچنین بایستی ADP و فسفات غیرآلی نیز به این بخش نفوذ کرده و ATP از آن خارج شود. این انتشار دهنده‌ها می‌توانند از نظر ژنتیکی اختصاص یافته باشند. به نظر می‌رسد که این انتقال دهنده‌ها به‌صورت فشرده‌ای بین غشاء خارجی و بستره قرار گرفته باشند.

ناقل‌های اختصاصی

غشاء خارجی در مقابل مولکول‌های کوچک نفوذپذیر است ولی غشاء داخلی نسبت به آنها کاملاً نفوذپذیر است. در غشاء داخلی انتقال فعال یا غیرفعال از طریق مجاری و یا به کمک ناقل‌های ویژه‌ای انجام می‌گیرد که ماهیت احتمالاً پروتئینی یا گلیکوپروتئینی دارند. بعضی از این ناقل‌ها، مبادله‌های غیرفعال توازنی مولکولی را به وسیله مبادله - انتشار بین دو طرف غشاء انجام می‌دهند، یکی از این ناقل‌ها، ناقل ADP − ATP است که ADP را وارد بستره کرده ATP را خارج می‌کند و دو منطقه تثبیت برای ATP و ADP دارد، این ناقل به وسیله آلکالوئیدی که از یک خارشتر مدیترانه‌ای استخراج شده و آتراکتیلوزید[1] نام دارد، غیرفعال می‌شود. ناقل‌های دیگر عبارتند از: ناقل

1- Atractyloside

فسفات (مبادله $H_2PO_4^-$ با OH)، ناقل‌های اسیدهای دی‌کربوکسیلیک، ناقل‌های اسیدهای تری‌کربوکسیلیک، ناقل‌های اسیدهای آمینه و غیره. به این گروه از ناقل‌ها که ماهیت پروتئینی دارند می‌توان ماده ۷ کربنی کارنی‌تین[1] را اضافه کرد که به شکل مبادله - انتشار، انتقال غیرفعال اسیدهای چرب را انجام می‌دهد. اتصال ترکیبات اخیر با ناقل به وسیله کارنی‌تین - آسیل ترانسفراز که در غشاء داخلی وجود دارد انجام می‌گیرد. در غشاء داخلی میتوکندری ناقل‌های دیگری نیز وجود دارند که انتقال‌های فعال را در خلاف جهت شیب غلظت ممکن می‌سازند. در این حالت انرژیِ لازم، از زنجیر تنفسی به‌دست می‌آید. از ناقل‌های فعال می‌توان یک ناقل فسفات که بدون شک انتقال غیرفعال فسفات را نیز باعث می‌شود و یک ناقل کاتیون‌ها که به کمک آن یون‌های کلسیم در بستره انباشته می‌شوند را نام برد.

سازمان مولکولی و طرز عمل میتوکندری‌ها

اعمال مختلف میتوکندری‌ها به سازمان مولکولی بخش‌های مختلف آن وابستگی زیادی دارد. نقش اصلی میتوکندری‌ها انجام تنفس هوازی سلول و تأمین ATP مورد نیاز در واکنش‌های سلولی و جنبش‌های مختلف سلول است. عوامل زنجیر تنفسی یا عوامل انتقال الکترون‌ها و عوامل فسفوریلاسیون که در مجموع با فرآیند فسفوریلاسیون اکسیداتیو موجب سنتز ATP می‌شوند، اساساً در ساختمان غشاء داخلی میتوکندری جای دارند. چرخه کربس که به کمک آنزیم‌های موجود در بستره میتوکندری انجام می‌شود با واسطه دهیدروژنازها[2] (NAD^+ و FAD)، هیدروژن‌های جداشده از سوبستراهای چرخه کربس را به زنجیر انتقال الکترون می‌رساند.

یکی از نتایج جالب چرخه کربس آن است که در هر چرخه، چهار جفت اتم هیدروژن توسط دهیدروژناز از سوبستراها جدا می‌شود. این اتم‌های هیدروژن (یا جفت‌های معادل آن از الکترون‌ها) به زنجیر تنفسی می‌رسد و به وسیله NAD^+ و FAD پذیرفته می‌شود. سه جفت هیدروژن به وسیله $3NAD^+$ گرفته شده و آن را به H^+ و $3NADH$ احیاء می‌کند، جفت دیگر به وسیله FAD گرفته شده آن را به $FADH_2$ احیاء می‌کند (این جفت هیدروژن مستقیماً از واکنش انجام شده توسط سوکسینات دهیدروژناز ایجاد می‌شود).

از آنجا که برای متابولیسم دو مولکول اسید پیروویک ایجاد شده از گلیکولیز یک مولکول گلوکز، دوبار چرخهٔ کربس انجام می‌شود بنابراین در مجموع شش $NADH,H^+$ و دو مولکول $FADH_2$ در آغاز هر زنجیر تنفسی تشکیل می‌شود. به منظور برداشت بهتری از طرز عمل میتوکندری پس از معرفی عوامل زنجیر تنفسی یازنجیر انتقال الکترون‌ها و بررسی آرایش این عوامل و عوامل فسفوریلاسیون در غشاء داخلی میتوکندری به چگونگی کار این مجموعه و بیوسنتز ATP که محصول اصلی تنفس هوازی با دخالت میتوکندری‌هاست توجه می‌کنیم.

عوامل زنجیر تنفسی یا عوامل انتقال الکترون

اولین کارهای انجام شده توسط واربورگ[3] و کیلین[4] با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی، موجب این تفکر شد که اکسیداسیون سلولی به وسیله ناقلین الکترون صورت می‌گیرد. ناقلین الکترون‌ها به‌صورت زنجیره‌ای قرار دارند که در آن پتانسیل اکسایش - کاهش رو به افزایش است. کیلین با استفاده از یک طیف‌سنج ساده و تجربیاتی که روی ماهیچه‌های پرواز حشرات انجام داد، نشان داد که در زنجیر تنفسی رنگیزه‌هایی وجود دارند که هنگام تنفس،

1- Carnitine

۲- دهیدروژنازها در چرخه کربس در واقع ایزوسیترات دهیدروژناز، آلفاستوگلوتارات دهیدروژناز، مالات دهیدروژناز و سوکسینات دهیدروژنازها هستند؛ سه گروه دهیدروژناز اول از NAD^+ و گروه آخر از FAD به‌عنوان کوآنزیم استفاده می‌کنند.

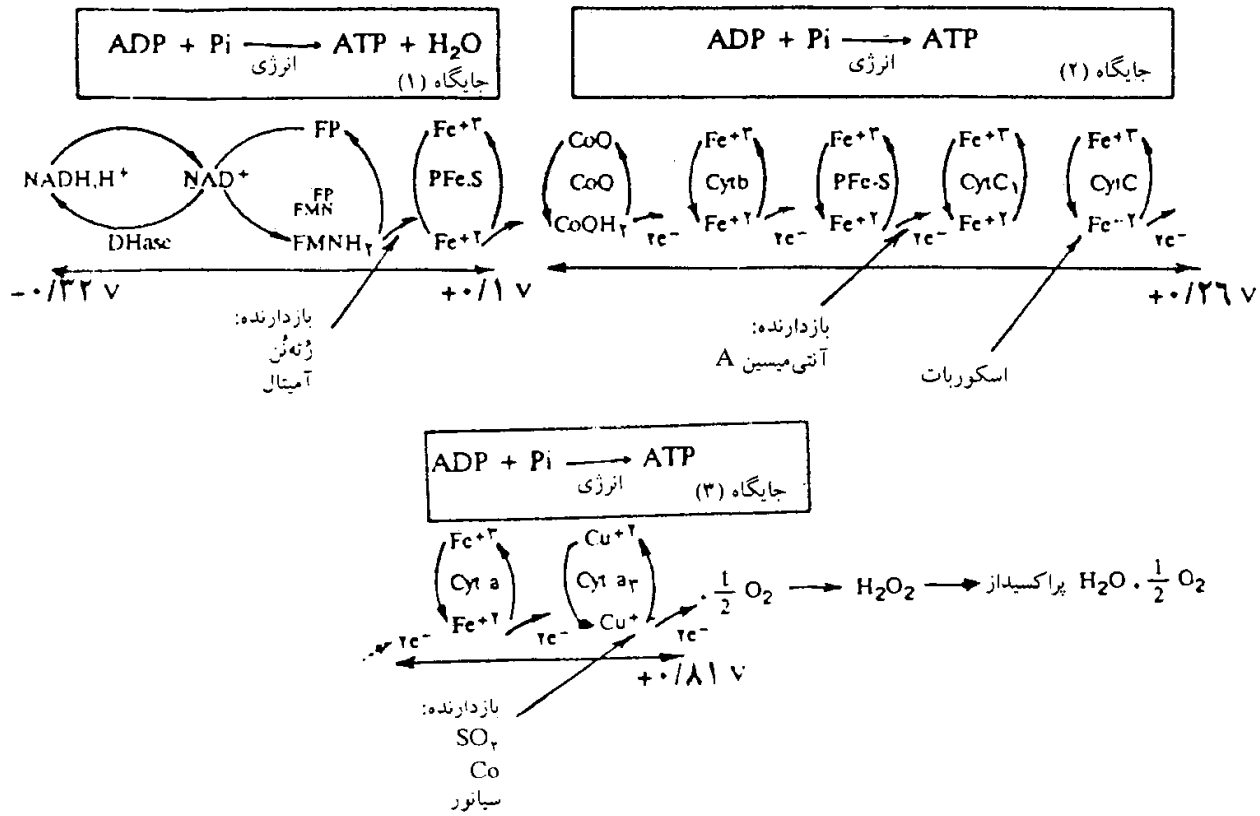
3- Warburg 4- Keilin

تغییرات اکسایشی - کاهشی را می‌گذرانند. این رنگیزه‌ها که به حالت احیا شده باندهای جذب نوری ویژه دارند، سیتوکروم‌ها هستند.

سیتوکروم‌ها از کروموپروتئین‌های دارای آهن یا مس هستند که تاکنون انواع مختلفی از آنها شامل سیتوکروم‌های b، c، c_1، a و a_3 در میتوکندری‌ها شناخته شده است. در میتوکندری‌های برخی گیاهان مثل گل‌شیپوری، سیتوکروم‌های ویژه‌ای ($CytC_V$) کشف شده است.

در شبکه آندوپلاسمی نیز سیتوکروم‌های دیگری ($Cytb_5$ و $Cytp_{450}$) شناخته شده است. در هر سیتوکروم، آهن می‌تواند به حالت اکسیده شده (Fe^{3+}) یا به حالت احیاء شده (Fe^{2+}) باشد و در سیتورکروم a_3 نیز مس می‌تواند به حالت اکسید شده (Cu^{2+}) یا به حالت احیاء شده Cu^{+} باشد. الکترون‌ها در طول زنجیره‌ای از سیتوکروم‌ها جابه‌جا می‌شوند که پتانسیل اکسایش و کاهش آن بیش از پیش مثبت می‌شود و از ۰/۳۲- ولت به ۰/۸+ ولت می‌رسد. با اطلاعات کنونی در بین سیتوکروم‌های تشکیل دهنده زنجیر تنفسی در برخی بخش‌ها، پروتئین‌های دارای آهن - گوگرد (P Fe − S) کشف شده است.

شکل ۱۱-۶ طرح ساده ساختمان زنجیر تنفسی، جایگاه‌های سنتز ATP و بازدارنده‌های مختلفی را که بر هر بخش اثر کرده، موجب توقف انتقال الکترون می‌شوند را مشخص می‌سازد. بازدارنده‌های اختصاصی انتقال الکترون‌ها در هر بخش نیز روی شکل مشخص است.



شکل ۱۱-۶. عوامل اصلی زنجیر تنفسی (زنجیر انتقال الکترون‌ها) و جایگاه‌های بیوسنتز ATP. الکترون‌هایی که تحت اثر دهیدروژنازهای وابسته به NAD^+ از تعدادی از سوبستراها جدا می‌شوند از محل سیستم H^+/NAD^+ و NADH، الکترون‌هایی که تحت اثر دهیدروژنازهای وابسته به FAD از برخی دیگر از سوبستراها جدا می‌شوند از محل مجموعه $FAD - FADH_2$ و الکترون‌هایی که تحت اثر آسکوربات اکسیداز از اسکوربات جدا می‌شوند، از جایگاه مجموعه $Cytcfe^{3+} - Cytcfe^{2+}$ به زنجیر تنفسی می‌رسند.

آشنایی بیشتر با ترکیبات اصلی زنجیر تنفسی

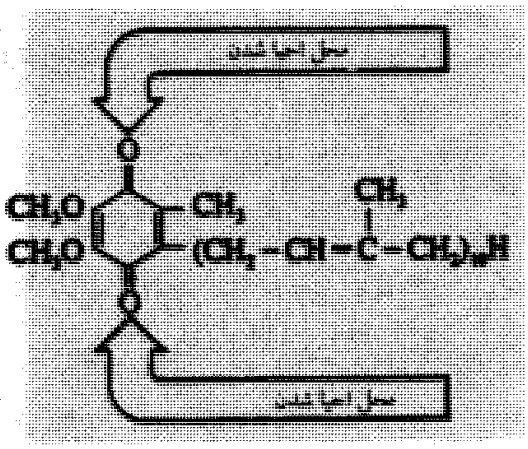
انتقال دهنده‌های پروتون و الکترون در زنجیر تنفسی عبارتند از: NAD، FAD، اوبی‌کینون و سیتوکروم‌ها

۱- NAD (*نیکوتین‌آمید آدنین دی نوکلئوتید*): از اتصال دو نوکلئوتید (توسط یک ریشه پیروفسفات) به یکدیگر به وجود آمده است. این کوآنزیم در شکل اکسیدشده (NAD^+) با دریافت یک الکترون و یک اتم هیدروژن، از یک ماده دهندهٔ هیدروژن (AH_2) که برخی سوبستراهای چرخه کربس از جمله ایزوسیترات، آلفاستوگلوتارات و مالات می‌باشند، احیاء می‌شود و به‌صورت H^+ و NADH در می‌آید. یک هیدروژن در محیط آزاد می‌ماند.

$$NAD^+ + AH_2 \longrightarrow NADH , H^+ + A$$

۲- FAD (*فلاوین آدنین دی نوکلئوتید = فلاوپروتئین*): یک پروتئین آهن‌دار است که می‌توان آن را از مشتقات ویتامین B_2 به حساب آورد. این ماده با دریافت دو اتم هیدروژن از برخی دیگر از سوبستراهای چرخهٔ کربس مثل سوکسینات‌ها احیاء می‌شود و به‌صورت $FADH_2$ در می‌آید.

۳- *اوبی کینون (کوآنزیم Q)*: این ماده هیدروژن را با واسطه پروتئین‌های دارای مراکز آهن - گوگرد از هیدروژنازهای احیاء شده یعنی H^+ و NADH و $FADH_2$ می‌گیرد، الکترون آن را به سیتوکروم b می‌دهد و پروتون را در محیط یعنی به طرف اطاق خارجی میتوکندری آزاد می‌سازد.



شکل ۱۱-۷. ساختمان شیمیایی و جایگاه‌های احیای اوبی‌کینون

۴- *سیتوکروم‌ها*: پروتئین‌های آهن‌داری هستند که ناقل‌های اصلی الکترون‌ها محسوب می‌شوند و در آنها اتم آهن با دریافت الکترون‌ها از حالت اکسید شده Fe^{3+} به حالت احیاء شده Fe^{2+} در می‌آید. حالت احیاء شده ناپایدار است و ضمن بازگشت اتم آهن به وضع اکسید شده، الکترون‌ها به سیتوکروم بعدی که پتانسیل اکسیداسیون و احیای مثبت‌تر و سطح انرژی کمتری دارد، می‌رسند. ضمن انتقال الکترون‌ها مقداری از انرژی آنها آزاد می‌شود که صرف سنتز ATP گردد (شکل ۱۱-۷).

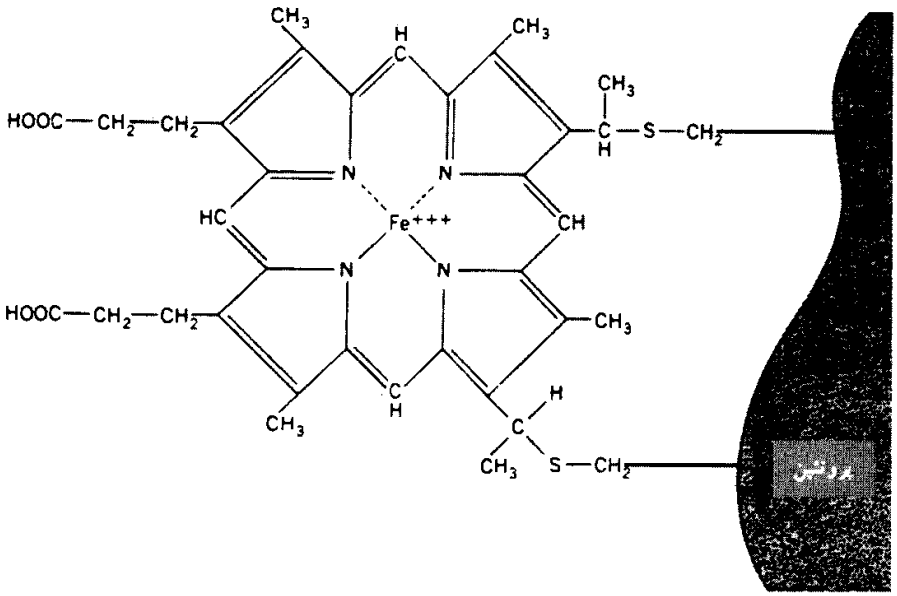
$$Cyt - Fe^{3+} + e^- \rightarrow Cyt - Fe^{2+} + E \text{ (انرژی)}$$

اتم آهن در ساختمان ترکیبی به نام حلقه پورفیرین قرار گرفته است. گروه مشابهی از هِم در مولکول‌های هموگلوبین وجود دارد. شکل ۱۱-۸ ساختاری از سیتوکروم C را نشان می‌دهد (شکل ۱۱-۸).

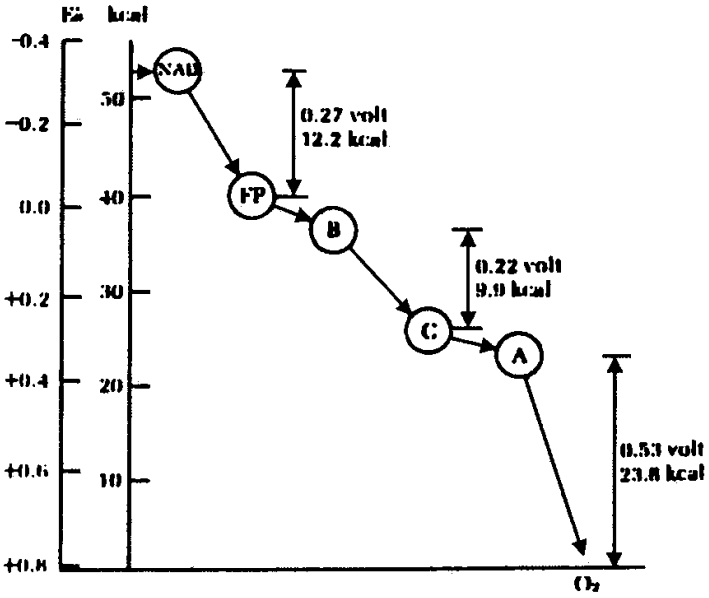
در زنجیر تنفسی سیتوکروم‌های b، c_1، c، a و a_3 به ترتیب افزایش پتانسیل اکسایش و کاهش قرار گرفته‌اند. چگونگی آرایش این سیتوکروم‌ها در غشاء داخلی میتوکندری در شکل ۱۱-۱۱ نشان داده شده است.

سیتوکروم b از پروتئین‌های عرض غشایی است، سیتوکروم c و به ویژه c_1 از پروتئین‌های حاشیه‌ای غشایی هستند که در سمت سیتوزولی غشاء داخلی (لبه مجاور به اطاق خارجی) قرار دارند. سیتوکروم‌های a و a_3 در مجموع، سیتوکروم اکسیداز را می‌سازند که در پایان هر زنجیر تنفسی قرار دارد. سیتوکروم a به طرف سطح سیتوزولی و سیتوکروم a_3 که تنها سیتوکروم دارای مس (به جای آهن) در زنجیر تنفسی است در سطح به طرف بستره قرار دارد.

NAD^+، FAD و کوآنزیم Q با دریافت اتم‌های هیدروژن و سیتوکروم‌ها که دارای آهن یا مس هستند با دریافت الکترون احیاء می‌شوند. اتم هیدروژن در حد کوآنزیم Q یا پروتئین‌های آهن - گوگرد به‌صورت الکترون (e^-) و



شکل ۱۱-۸. ساختمان سیتوکروم C. در این سیتوکروم گروه پروستتیک به‌صورت کووالانسی به پروتئین متصل شده است. در سیتوکروم‌های دیگر (و همچنین در هموگلوبین) گروه هِم به‌صورت غیرکووالانسی به پروتئین متصل است.



شکل ۱۱-۹. دیاگرامی که پایین آمدن سطح انرژی جفت‌های الکترونی را در زنجیر تنفسی از NAD به O_2 نشان می‌دهد. E_0 پتانسیل اکسید و احیاء، KCal، انرژی آزاد. در سه ناحیه مشخص شده، انرژی آزاد شده، برای تولید ATP از ADP و فسفات کافی است.

پروتون (H^+) درمی‌آید. الکترون‌ها به ترتیب از سیتوکروم b تا سیتوکروم اکسیداز جابه‌جا می‌شوند و در این مسیر، بخش فلزی سیتوکروم‌ها با دریافت الکترون احیاء و با از دست دادن آن اکسید می‌شود. بنابراین می‌توان در نظر گرفت که: اتم‌های هیدروژن (یا الکترون‌های معادل) که از چرخه کربس می‌آیند بعد از گرفته شدن توسط کوآنزیم‌های NAD^+ و FAD با واسطه پروتئین‌های آهن - گوگرد و کوآنزیم Q به گروهی از ناقل‌های الکترون به نام سیتوکروم‌ها می‌رسند. سیتوکروم‌ها در شیبی از پتانسیل کاهش و اکسایش متحمل واکنش‌های پی‌درپی کاهش و اکسایش می‌شوند (شکل ۱۱-۹) که ضمن آن الکترون‌ها از یک دهنده الکترون یا (احیاءکننده) به یک گیرنده الکترون (اکسیدکننده) انتقال می‌یابند. در جریان این نقل و انتقال‌ها بخشی از انرژی الکترون‌ها آزاد می‌شود که با دخالت بخش بینابینی اکسیزوم‌ها به دام می‌افتد و برای سنتز ATP توسط سراکسیزوم‌ها به کارگرفته می‌شود.

الکترون‌ها در پایان زنجیر تنفسی از سیتوکروم اکسیداز به اکسیژن مولکولی رسیده آن را به اکسیژن فعال یونی تبدیل می‌کنند (O^{2-}) که با پروتون‌های موجود در بستره ($2H^+$) موجب تشکیل آب می‌شوند.

سوبستراهای دهنده الکترون به هر ترکیب زنجیر تنفسی

گلیسرول، فسفات، سوکسینات، استیل کوآنزیم A، ایزوسیترات، آلفا - ستوگلوتارات، مالات، پیروات،

گلوتامات، هیدروکسی استیل کوآنزیم A از سوبستراهای زنجیر تنفسی هستند.

همان گونه که نمای ۱۱-۶ نشان می‌دهد زنجیر تنفسی با سیتوکروم‌ها آغاز نمی‌شود بلکه با کوآنزیمی که نیکوتین آدنین دی نوکلئوتید (NAD^+) است شروع می‌گردد. این کوآنزیم (کوآنزیم بسیاری از آنزیم‌ها) به H^+ و NADH احیاء می‌شود.

شکل ۱۱-۶ نشان می‌دهد که مجموعه H^+ و $NAD^+/NADH$ دارای بیشترین پتانسیل اکسایش و کاهش منفی در تمام زنجیر است (ولت ۰/۳۲ - = E_0) و در نتیجه، اکسایش آن موجب آزاد شدن بیشترین مقدار انرژی آزاد (ΔQ = -۵۲/۷ KCal/mol) می‌شود. پس از این مجموعه، فلاوپروتئین‌ها، کوآنزیم Q (اوبی‌کینون) و مجموعه‌ای از سیتوکروم‌ها قرار گرفته‌اند که الکترون‌ها را به اکسیژن که دارای بیشترین پتانسیل اکسایش و کاهش مثبت در زنجیره است، انتقال می‌دهند. اکسیژن هیچ انرژی آزاد و قابل استفاده‌ای را ایجاد نمی‌کند (ΔQ = ۰). به‌طوری که در شکل ۱۱-۶ دیده می‌شود ترتیب واکنش‌های انتقال الکترون با پتانسیل اکسایش و کاهش ناقل‌های مختلف الکترون متناسب است. به‌تدریج که الکترون‌ها از سوبسترا به سوی اکسیژن انتقال می‌یابند، ناقل‌ها مثبت‌تر هستند. روش‌های حساس طیف‌سنج که به وسیله شانس[1] گسترش یافته‌اند، وجود چنین ترتیبی را تأیید کرده و نشان داده‌اند که NAD^+ بیشترین میزان احیا شدگی و مجموعه سیتوکروم a و a_3 که سیتوکروم اکسیداز را می‌سازند بیشترین میزان اکسیدشدگی را در زنجیره دارند.

در سال‌های اخیر مشخص شده که زنجیر تنفسی دارای ترکیبات مختلف دیگری نیز می‌باشد. یکی از این ترکیبات قابل توجه کوآنزیم Q(CoQ) یا اوبی‌کینون است که در همه سلول‌ها وجود دارد. این ترکیب یک بنزوکینون محلول در چربی است که دارای یک زنجیر طویل جانبی متشکل از ده واحد ایزوپرونوئیدهاست و به همین دلیل آن را با CoQ_{10} نشان می‌دهند. این کوآنزیم نقش شناور بین فلاوپروتئین‌ها و سیتوکروم b را به عهده دارد.

همچنین زنجیر تنفسی میتوکندری دارای مس است که با آنزیم‌ها و پروتئین‌های آهن - گوگرد وابسته است. به نظر اسلتر[2]، زنجیر تنفسی دارای حدود ۳۰ مرکز واکنش است که می‌توانند پذیرنده الکترون‌ها باشند.

کمپلکس‌های زنجیر تنفسی

تحقیقات گرین[3] بر روی میتوکندری‌های قلب گاو نر با استفاده از دزوکسی کولات یا الکل آمیلیک منجر به جداسازی چهار کمپلکس از زنجیر تنفسی گردید. نظر کنونی این است که برای انتقال الکترون‌ها و امکان بیوسنتز ATP نه تنها حضور این چهار کمپلکس لازم است، بلکه بایستی بخش‌های لیپیدی غشایی وابسته به آنها نیز همراه هر کمپلکس باشد. تخریب هر کمپلکس و یا جداسازی لیپیدهای غشایی وابسته به آنها موجب توقف انتقال الکترون در زنجیر تنفسی می‌گردد. این چهار کمپلکس عبارتند از:

۱-کمپلکس I: NADH , H^+ - CoQreductase: این کمپلکس بزرگ‌ترین کمپلکس زنجیر تنفسی است وزن مولکولی آن ۵۰۰۰۰۰ دالتون است و متشکل از ۱۵ زیرواحد است. گروه پروستیک آن FMN و دارای ۶ مرکز پروتئینی آهن - گوگرد است. این کمپلکس تنها کمپلکس قادر به انتقال پروتون‌ها از عرض غشاء داخلی میتوکندری است و می‌تواند پروتون‌ها را از سطح بستره‌ای (M.Face) به سطح سیتوزولی (C.Face) انتقال دهد.

محل واکنش آن با H^+ و NADH در سطح ماتریسی (سطح M) و با CoQ در بخش آب‌گریز غشاء داخلی میتوکندری می‌باشد.

1- chance 2- Slater 3- Grean

۲-کمپلکس II: Succinate − CoQ reductase: کوچک‌ترین کمپلکس زنجیر تنفسی است که وزن مولکولی آن ۹۷۰۰۰ دالتون است و متشکل از ۲ جزء پلی‌پپتیدی، FAD و سه مرکز پروتئینی آهن - گوگرد است، قادر به انتقال پروتون‌ها از عرض غشاء داخلی میتوکندری نمی‌باشد. محل واکنش این کمپلکس با $FADH_2$ در سطح بستره‌ای غشاء و محل واکنش آن با CoQ در بخش آب‌گریز غشاء داخلی میتوکندری است.

۳-کمپلکس III: $CoQH_2$CytC − reductase: وزن مولکولی این کمپلکس ۲۸۰۰۰۰ دالتون و شامل سیتوکروم‌های b، c_1، c و پروتئین‌های آهن - گوگرد است از جایگاه CoQ تا محل CytC امتداد دارد. محل واکنش آن با CoQ در بخش اب‌گریز غشاء و با سیتوکروم C، در سمت سطح سیتوزولی (سطح C) غشاء داخلی است.

۴-کمپلکس IV: Cyt C − Oxidase: وزن مولکولی آن حدود ۲۰۰۰۰۰ دالتون و دارای چند جزء پلی‌پپتیدی است. دارای سیتوکروم‌های a و a_3 و دو اتم مس می‌باشد. این کمپلکس در عرض غشاء از سطح بستره‌ای تا سطح سیتوزولی کشیده شده است. تنها کمپلکس دارای مس است و الکترون‌ها را در انتهای زنجیر تنفسی به اکسیژن مولکولی انتقال می‌دهد و موجب تبدیل آن به اکسیژن یونی (فعال) می‌شود که در تشکیل آب دخالت می‌کند. تنها کمپلکسی است که می‌تواند الکترون‌ها را از سطح سیتوزولی به سطح بستره‌ای برگرداند و آنها را به اکسیژن مولکولی ($\frac{1}{2}O_2$) انتقال دهد. طرحی از کمپلکس‌های انتقال الکترون‌ها در غشاء داخلی میتوکندری در شکل ۱۱-۱۱ آورده شده است.

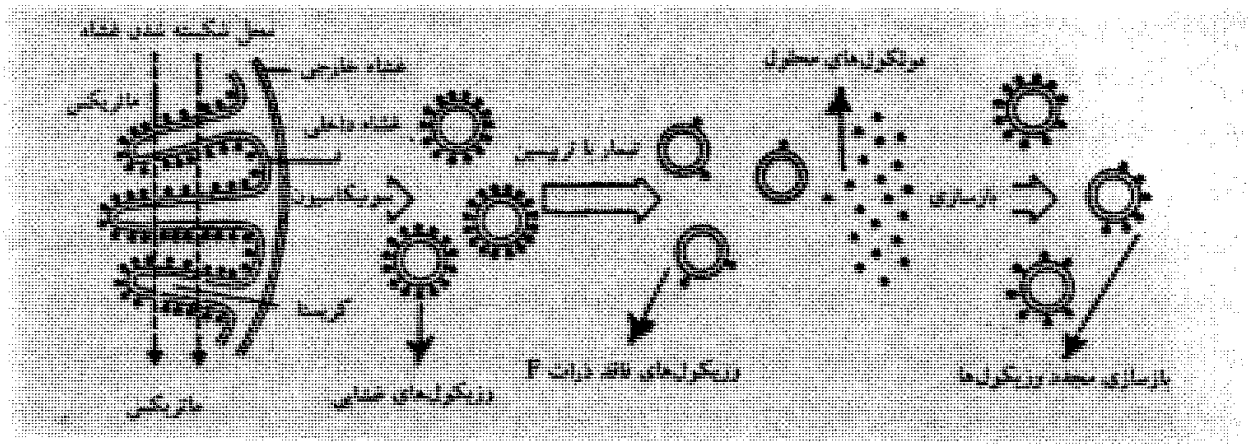
آرایش عوامل زنجیر تنفسی و عوامل فسفوریلاسیون در غشاء داخلی میتوکندری

به منظور آگاهی از چگونگی آرایش عوامل زنجیر تنفسی و عوامل فسفوریلاسیون در غشاء داخلی میتوکندری، نحوهٔ ارتباط و عمل آنها، جداسازی بخش‌هایی از غشاء داخلی لازم است. روش کار همان گونه که در صفحه ۱۶۴ آمده است به این ترتیب است که: از سلول‌های کبدی که میتوکندری زیاد دارند و نیز به سهولت از هم می‌پاشند با روش اولتراسانتریفوگاسیون، میتوکندری‌های سالم را جدا می‌کنیم. سپس با حضور شوینده دیژیتونین[1] و در شرایط ۱۴۴۰۰۰g و مدت یک ساعت اولتراسانتریفوگاسیون بعدی را بر روی میتوکندری‌های جدا شده انجام می‌دهیم در نتیجه سه بخش: غشاء خارجی، محتویات اطاق خارجی و میتوپلاست‌ها[2] جدا می‌شود. محتویات اطاق خارجی در رو شناور می‌ماند. میتوپلاست‌ها را در حضور شوینده لوبرول[3] در شرایط ۱۴۴۰۰۰g و مدت ۶۰ دقیقه به اولتراسانتریفوژ می‌بریم، غشاء داخلی از بستره جدا می‌شود و در ته لوله قرار می‌گیرد.

با اثر امواج فراصوت بر روی غشاء داخلی می‌توان آن را به قطعاتی شکست. تجربیات انجام شده نشان می‌دهد که این قطعات به صورت حفره‌های وارونه شده‌ای درمی‌آیند که، در آنها اکسیزوم‌های موجود بر سطح بخش‌های کریستاییِ غشاء به طرف خارج قرار می‌گیرند و سطح سیتوزولی غشاء به طرف درون حفره‌های ایجاد شده می‌افتد (شکل ۱۱-۱۰). این حفره‌ها در شرایط مناسب آزمایشگاهی و وجود مولکول‌ها و ماکرومولکول‌های لازم می‌توانند هم انتقال الکترون‌ها را انجام دهند و هم با به کارگیری انرژی آزاد شده از انتقال الکترون‌ها، پدیدهٔ فسفوریلاسیون ADP به ATP را انجام دهند (فسفوریلاسیون اکسیداتیو).

راکر (۱۹۶۸) با افزودن اوره بر این حفره‌ها موفق شد ذرات موجود بر سطح آنها را جدا کند. (به کمک تریپسین و یا امواج فراصوت نیز می‌توان این ذرات را جدا کرد) این ذرات که بخش سراکسیزوم‌ها بودند قدرت فسفوریلاسیون را داشتند اما قادر به انتقال الکترون‌ها نبودند. برعکس بخش غشایی باقیمانده قادر به انتقال الکترون‌ها بود اما قدرت

1- Digitonin 2- mitoplasts 3- Lubrol WX



شکل ۱۱-۱۰. طرح آزمونی که در آن با تأثیر امواج فراصوت بر غشاء داخلی میتوکندری، حفره‌های غشایی وارونه شده‌ای به وجود می‌آیند که با تأثیر اوره یا تریپسین بر آنها به دو بخش می‌شوند. بخش غشایی دارای قدرت انتقال الکترون‌ها و بخش ذرات پروتئینی کروی دارای قدرت فسفوریلاسیون است. حذف اوره موجب تشکیل مجدد حفره‌هایی است که هم توانایی انتقال الکترون‌ها و هم توانایی فسفوریلاسیون ADP و Pi به ATP را دارند (فسفوریلاسیون اکسیداتیو).

فسفوریلاسیون را نداشت. اگر اوره از محیط حذف شود، ذرات پروتئینی جدا شده از سطح غشاء، به غشاء می‌چسبند و با بازسازی حفره‌ها، دوباره حفره‌های دارای قدرت انتقال الکترون‌ها و توان فسفوریلاسیون (فسفوریلاسیون اکسیداتیو) را تشکیل می‌دهند (شکل ۱۱-۱۰).

با این تجربیات مشخص گردید که عوامل زنجیر تنفسی و کمپلکس‌های حاصل از تجمع آنها در غشاء داخلی میتوکندری و عوامل فسفوریلاسیون نیز بر سطح درونی (سطح بستره‌ای) این غشاء قرار گرفته‌اند. پژوهش‌های بعدی با استفاده از تترازولی ویژه که به وسیله سوکسینات دهیدروژناز به فورمازون تبدیل می‌شود و نیز به کارگیری ´۳، ´۳، دی‌آمینوبنزیدین (DAB)، که به وسیله سیتوکروم C اکسید می‌شود، نشان داد که مواد متراکم حاصل از این اکسایش‌ها در سطح خارجی غشاءهای کریستایی جمع می‌شوند.

دلایل تجربی نشان می‌دهد که زنجیر انتقال الکترون‌ها در سطح بستره (داخلی) غشاء داخلی، پذیرنده NADH و سوکسینات می‌باشد، در حالی که سیتوکروم C به نحو بسیار سست‌تری به سطح خارجی این غشاء چسبیده است.

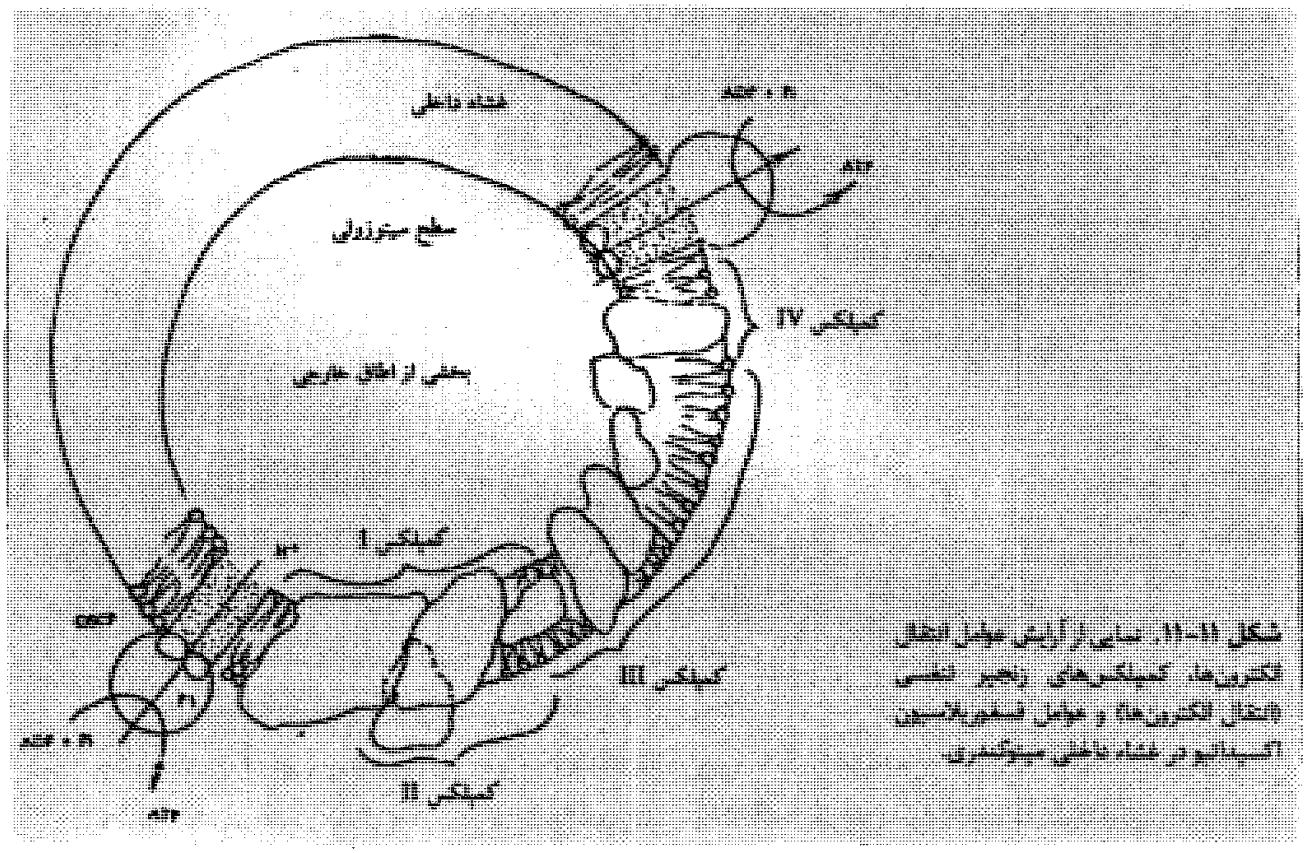
علاوه بر این آرایش عرضی، آرایش جانبی نیز برای عوامل زنجیر تنفسی و فسفوریلاسیون اکسیداتیو در نظر گرفته می‌شود، نظریه متداول کنونی این است که گروه‌های متراکم ماکرومولکولی به‌صورت مجموعه‌ای موزائیکی قرار دارند که در فواصل منظمی در بین آنها، پروتئین‌ها و لیپیدهای دیگری نیز قرار گرفته‌اند.

تعداد این مجموعه‌ها به حسب نوع بافت و چین‌خوردگی‌های غشاء تغییر می‌کند. یک میتوکندری کبدی دارای حدود ۱۵۰۰۰ از این مجموعه‌هایِ ماکرومولکولیِ قادر به فسفوریلاسیون اکسیداتیو است، در حالی که ماهیچه پرواز یک حشره دارای حدود ۱۰۰۰۰۰ از آن می‌باشد. در این مجموعه‌ها یا «واحدهای فسفوریلاسیون» آنزیم‌های اصلی با مقدار مولکولی برابر، موجودند. این نتایج با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی بسیار سریع[1] و نیز مشخص کردن جایگاه‌های اتصال مواد آلی از جمله مواد مخدر که به‌صورت اختصاصی بر ترکیبات ویژه‌ای از مجموعه الکترون‌ها اثر می‌گذارد، تأیید شده است. برای مثال، اورورتین[2] به ATPase می‌چسبد، اولیگومیسین در محل اتصال ATP به غشاء عمل می‌کند، آنتی‌میسین بازدارنده‌ای است که بر QH_2 – سیتوکروم C – رودکتاز اثر می‌گذارد، رتنُن بر NADH – کوآنزیم Q ردوکتاز مؤثر است و سیانور نقش سمی خود را بر سیتوکروم C – اکسیداز اعمال می‌کند.

1- Spectrophotometrique ultra rapid 2- Aurovertine

واحد حداقل فسفوریلاسیون اکسیداتیو دارای پروتئین‌های متعدد با جرم مولکولی کلی حدود 5×10^6 دالتون است. این واحدها در مجموع بایستی سطح قابل توجهی از غشاء را اشغال کنند. بررسی‌های بیوشیمیایی و میکروسکوپی الکترونی امکان داده است تا یک ساختمان موزائیکی را برای غشاء داخلی میتوکندری در نظر بگیریم که در آن هر واحد فسفوریلاسیون اکسیداتیو سطحی حدود ۲۰×۲۰ نانومتر را اشغال کند.

شکل ۱۱-۱۱ چگونگی آرایش عوامل انتقال الکترون و فسفوریلاسیون در غشاء داخلی مینوکندری را مشخص می‌سازد. همان گونه که در شکل مشخص شده است هر یک از اجزای زنجیر تنفسی و نیز عوامل فسفوریلاسیون در غشاء جایگاه ویژه‌ای دارد:



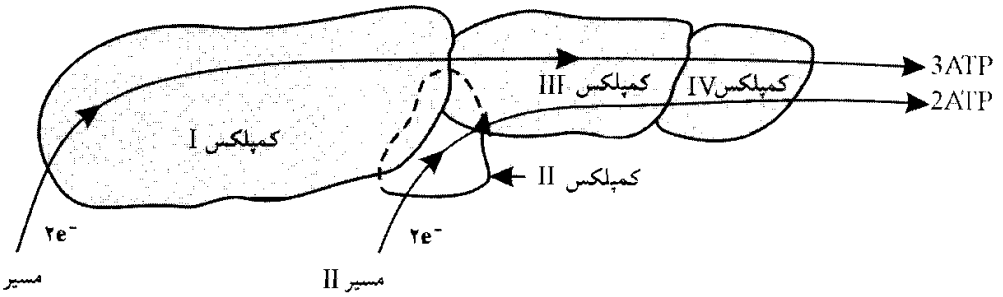
شکل ۱۱-۱۱. نمایی از آرایش عوامل انتقال الکترون‌ها، کمپلکس‌های زنجیر تنفسی، انتقال الکترون‌ها و عوامل فسفوریلاسیون اکسیداتیو در غشاء داخلی میتوکندری.

دهیدروژنازها و فلاوپروتئین‌های وابسته به آنها به‌صورت مجموعهٔ پروتئینی عرض غشایی در غشاء داخلی قرار دارند و با مجموعه پروتئین‌های آهن گوگرد (PFe − S) که خود در تمام ضخامت غشاء کشیده شده‌اند وابسته‌اند. CoQ در لابلای بخش هیدروفوب غشاء است. سیتوکروم‌های b نیز به‌صورت مجموعه پروتئین عرض غشایی هستند که بعد از آنهاپروتئین‌های آهن گوگرد به حالت پروتئین‌های درون غشایی اما نه در تمام ضخامت غشاء قرار دارند. سیتوکروم‌های C_1 و C به طرف سطح سیتوزولی و سیتوکروم‌های a و a_3 (سیتوکروم اکسیداز) به حالت مجموعه‌ای از سطح C تا سطح M کشیده شده‌اند (شکل ۱۱-۱۱).

از کمپلکس‌های زنجیر تنفسی (کمپلکس‌های انتقال الکترون‌ها)، الکترون‌ها در دو مسیر منتقل می‌شوند (شکل ۱۱-۱۲). مسیر I شامل کمپلکس I، III و IV و مسیر II شامل کمپلکس‌های II، III و IV است.

میتوکندری و تنفس سلولی

در متابولیسم هیدارت‌های کربن، اکسیداسیون کامل و نهایی گلوکز که منجر به آزاد شدن بیشترین مقدار انرژی در



شکل ۱۱-۱۲. مسیر عبور الکترون‌ها از کمپلکس‌ها. به ازای عبور هر جفت الکترون از مسیر I در شرایط مناسب برای فسفوریلاسیون، ۳ مولکول ATP سنتز می‌شود و به ازای هر جفت الکترونی که از مسیر II می‌گذرد بازده سنتز ATP دو مولکول است.

بافت‌ها می‌شود با حضور اکسیژن مولکولی، صورت می‌گیرد. این فرآیند را به‌طور کلی تنفس هوازی سلول می‌نامند.

مادهٔ اصلی انرژی‌زا در تنفس سلولی گلوکز است. اکسیداسیون گلوکز در جریان تنفس سلولی شامل مراحل زیر است:

۱- گلیکولیز = تجزیه گلوکز و ایجاد اسیدپیرورویک

۲- اکسیداسیون اسیدپیرورویک و تشکیل استیل کوآنزیم A (دکربوکسیلاسیون اکسیداتیو)

۳- چرخه کربس

۴- انتقال الکترون‌ها و سنتز ATP

۱- *گلیکولیز*

گلیکولیز در همهٔ سلول‌های زنده چه آنهایی که تنفس هوازی دارند و چه آنهایی که تخمیر و تنفس بی‌هوازی، صورت می‌گیرد. آنزیم‌های لازم این مرحله در سیتوزول سلول‌ها موجود است. بنابراین فرآیند گلیکولیز در خارج از میتوکندری‌ها انجام می‌پذیرد. واکنش‌های مرحله گلیکولیز را می‌توان در دو بخش در نظر گرفت:

الف - بخشی که در آن از یک مولکول گلوکز با مصرف دو مولکول ATP (در طی چندین واکنش) مولکول فروکتوز ۱ و ۶ دی‌فسفات به وجود می‌آید.

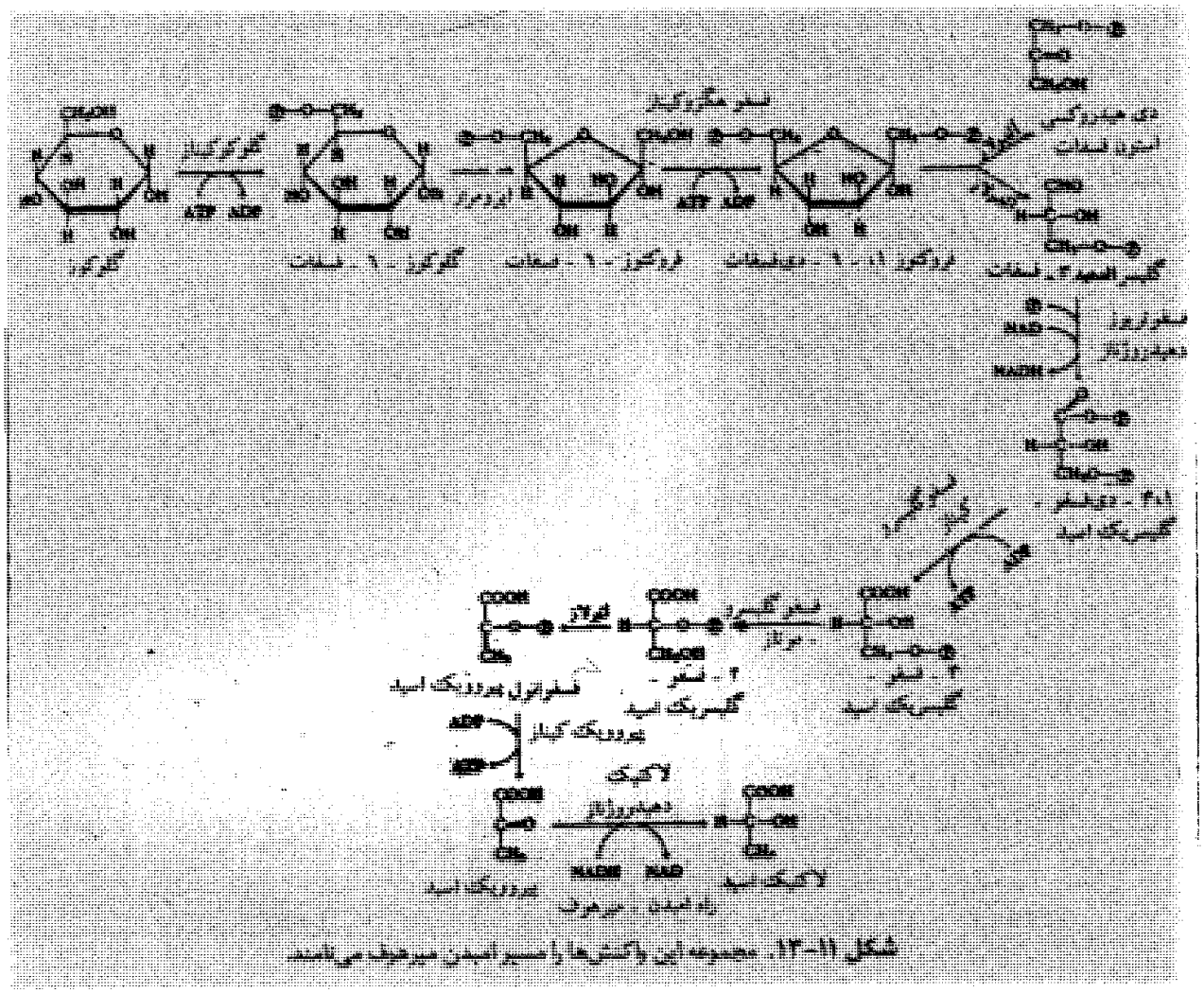
ب - بخشی که در آن طی چند واکنش، اسیدپیرورویک (۳ کربنی) تشکیل می‌شود. در این واکنش‌ها ۴ اتم هیدروژن (به ازای یک مولکول گلوکز) حاصل می‌شود که جذب NAD^+ (نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید) می‌شود و آن را به‌صورت H^+ و NADH درآورد. در این بخش از گلیکولیز، ۴ مولکول ATP (به ازای یک مولکول گلوکز) به وجود می‌آید. با توجه به این که در بخش اول گلیکولیز برای فسفردار کردن گلوکز و در نهایت تشکیل فروکتوز ۱ و ۶ دی‌فسفات، ۲ مولکول ATP مصرف می‌شود و در بخش دوم آن ۴ مولکول ATP ساخته می‌شود، می‌توان گفت که در گلیکولیز ۲ مولکول ATP (به ازای یک مولکول گلوکز) حاصل می‌شود. واکنش‌های مرحله گلیکولیز به‌طور خلاصه در صفحهٔ بعد نشان داده شده است.

در این طرح آنزیم لازم هر واکنش با شماره‌ای نشان داده شده و نام آن آنزیم در کنار طرح نوشته شده است.

سرانجام اسیدپیرورویک

با تشکیل اسیدپیرورویک مرحله گلیکولیز پایان می‌یابد. اسیدپیرورویک یک ماده جالب توجه در مسیر متابولیسم هیدارت‌های کربن است. زیرا نه تنها از تجزیه هیدرات‌های کربن به وجود می‌آید بلکه از تجزیه گلیسرول (حاصل از لیپیدها) و بسیاری از اسیدهای آمینه (حاصل از پروتئین‌ها) نیز ایجاد می‌شود (شکل ۱۱-۱۳).

متابولیسم اسیدپیرورویک برحسب نوع سلول و شرایط فیزیولوژیکی سلول در مسیرهای متفاوت ادامه می‌یابد که عبارتند از:



شکل ۱۱-۱۳. مجموعه این واکنش‌ها را مسیر اسیدن می‌نامند

الف - تشکیل اسیدلاکتیک ب - تشکیل الکل اتیلیک ج - تشکیل گلوکز

د - تشکیل اسیداگزالواستیک هـ- تشکیل استیل کوآنزیم A

گرچه مسیری که منجر به تنفس هوازی با دخالت میتوکندری‌ها می‌شود، تشکیل استیل کوآنزیم A می‌باشد، اما به منظور اشاره‌ای فراگیر به پدیدهٔ تنفس سلولی، سایر مسیرها را نیز به اختصار بررسی می‌کنیم:

الف - تبدیل اسیدپیروویک به اسیدلاکتیک (تخمیر لاکتیک): این عمل در سلول‌های ماهیچه‌ای، زمانی که انقباض در شرایط فاقد اکسیژن صورت گیرد، و نیز در بعضی از باکتری‌های تخمیرکننده انجام می‌شود. در این مسیر اسیدپیروویک با حضور آنزیم لاکتات دهیدروژناز، هیدروژن‌های پیوسته به $NADH , H^+$ را دریافت می‌کند و مولکول NADH را برای دریافت هیدروژن‌های دیگر، مثلاً در جریان گلیکولیز آزاد می‌سازد تا به این ترتیب امکان ایجاد ATP بیشتری را فراهم آورد. در این واکنش اسیدپیروویک خود احیاء شده و تبدیل به اسیدلاکتیک $(CH_3 COOH) - CHOH -$ می‌شود.

یادآوری این نکته بی‌مناسبت نیست که در تخمیرِ یک مولکول گلوکز فقط ۲ مولکول ATP آن هم در فرآیند گلیکولیز حاصل می‌شود و هیدروژن‌هایی که در مرحله گلیکولیز حاصل شده و جذب NAD شده‌اند در تولید ATP به کارگرفته نمی‌شوند بلکه موجب احیاء اسیدپیروویک و ایجاد اسیدلاکتیک می‌گردند (تخمیر لاکتیک)

$$2CH_3CO - COOH + 2NADH, H^+ \xrightarrow{\text{لاکتات دهیدروژناز}} CH_3CHOH - COOH + 2NAD^+$$

ب - تبدیل اسیدپیرورویک به الکل اتیلیک (تخمیر الکلی): این عمل در عدّه‌ای از قارچ‌های تخمیرکننده (مانند مخمر آبجو)، بعضی از باکتری‌های تخمیرکننده و نیز برخی از سلول‌های گیاهان عالی در شرایطی خاص و بی‌هوازی صورت می‌گیرد.

اکثر بافت‌های گیاهان عالی در کمبود اکسیژن، اقدام به تنفس بی‌هوازی می‌کنند. مقاومت بافت‌های مختلف در مقابل کمبود اکسیژن یکسان نیست. به تجربه دریافته‌اند که میوه‌هایی مانند سیب و گلابی در غیاب اکسیژن آزاد و یا در نیتروژن خالص (N_2) مدت‌ها بدون خراب شدن می‌مانند در حالی که دانه‌های ذرت در چنین شرایطی بیش از دو روز زنده نمی‌مانند. رویش اکثر دانه‌ها در شرایط بی‌هوازی صورت می‌گیرد و سپس به‌صورت هوازی ادامه حیات و فعالیت می‌دهند. در اکثر میوه‌های تازه (به ویژه انگور) نیز تنفس بی‌هوازی صورت می‌گیرد. در هر حال بافت‌های اغلب گیاهان عالی در شرایطی که به دلیلی (خارجی و داخلی) دسترسی کمتری به اکسیژن داشته باشند، برای مدت محدودی می‌توانند اقدام به تنفس بی‌هوازی و به دنبال آن نوعی تخمیر کنند. در چنین شرایطی به مجرد این که بافت دسترسی به اکسیژن پیدا کند، تخمیر متوقف شده و تنفس هوازی صورت می‌گیرد. مسلماً ادامه تخمیر برای مدت طولانی، به دلیل تجمع مواد سمی حاصل از تخمیر در بافت‌ها، برای سلول‌های گیاهان قابل تحمل نخواهد بود.

در این نوع تخمیر اسیدپیرورویک با حضور آنزیم پیرووات دکربوکسیلاز تبدیل به استالدئید CH_3CHO و CO_2 می‌شود، و سپس استالدئید توسط $NADH , H^+$ احیاء شده و به‌صورت الکل اتیلیک ($CH_3 - CH_2OH$) درمی آید. دراین نوع تخمیر نیز از یک مولکول گلوکز دو مولکول ATP (آن هم در مرحله گلیکولیز) ایجاد می‌شود.

$$2CH_3CO - COOH \xrightarrow[\text{دکربوکسیلاز و سپس}]{NADH , H^+} 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

ج - تشکیل گلوکز از اسیدپیرورویک: واکنش‌های گلیکولیز (تشکیل اسیدپیرورویک از گلوکز) همگی به جز آخرین واکنش (یعنی تبدیل اسیدانول پیرورویک به اسید پیرورویک) برگشت پذیرند. ولی در شرایطی ممکن است از اسیداگزالواستیک که در چرخه کربس از اسیدپیرورویک به وجود آمده است نیز اسیدانول‌پیرورویک به وجود آید. بنابراین از این طریق امکان بازگشت مراحل گلیکولیز و تشکیل گلوکز از اسیدپیرورویک فراهم می‌شود. مسلماً برای انجام چنین واکنش‌هایی انرژی لازم است که باید از منابع دیگر تأمین شود.

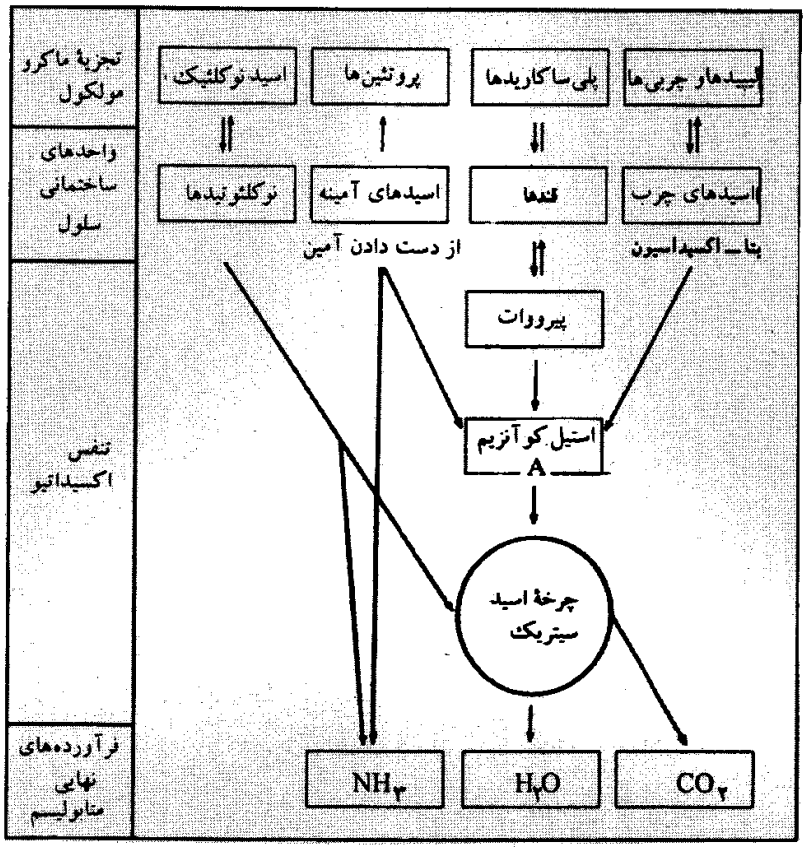
د - تشکیل اسیداگزالواستیک از اسیدپیرورویک با جذب CO_2: اسیداگزالواستیک یک اسید چهارکربنی است که به‌عنوان یک ماده واسط در واکنش‌های چرخه کربس وارد می‌شود (نقش دیگر آن را در تبدیل اسیدپیرورویک به گلوکز دیده‌ایم). در شرایطی ممکن است اسیدپیرورویک با CO_2 ترکیب شده و اسیداگزالواستیک ایجاد کند (این یکی از مواردی است که مفید واقع شدن یک ماده به اصطلاح زاید مانند CO_2 را نشان می‌دهد) آنزیم لازم این واکنش در اغلب سلول‌ها وجود دارد.

$$2CH_3COCOOH + 2CO_2 \longrightarrow \underset{\text{اسید اگزالواستیک}}{COOH - CO - CH_2COOH}$$

۲- *اکسیداسیون اسید پیرورویک و تشکیل استیل کوآنزیم A (دکربوکسیلاسیون اکسیداتیو)*

در این مسیر با پدیده دکربوکسیلاسیون اکسیداتیو که به وسیله آنزیم‌های موجود در میتوکندری صورت می‌گیرد، از اسیدپیرورویک یک مولکول CO_2 جدا می‌شود و ضمن دهیدروژناسیون آن، H^+ و NADH تشکیل می‌شود.

$$2CO_3CO - COOH \xrightarrow[NAD^+]{\text{دکربوکسیلاز میتوکندری}} 2CH_3CO - S - COA + 2NADH, H^+ + 2CO_2$$



شکل ۱۱-۱۴. مسیرهای متابولیسمی تجزیهٔ غذا و ورود به چرخهٔ اسیدسیتریک. انرژی شیمیایی طی این واکنش‌ها در مولکول ATP ذخیره می‌شود.

استیل کوآنزیم A مادهٔ مهمی در مسیر متابولیسم هیدرات‌های کربن و سایر مواد است.

شکل ۱۱-۱۴ رابطه متابولیسم هیدرات‌های کربن، لیپیدها، استروئیدها و بعضی از اسیدهای آمینه را با استیل کوآنزیم A نشان می‌دهد.

۳- چرخه کربس[1]

این مرحله در بسترهٔ میتوکندری‌ها صورت می‌گیرد و با انجام یک سری واکنش‌های چرخه‌ای آنزیمی همراه است. در این واکنش‌ها در مجموع و با دخالت مواد واسطه، دو کربنِ اسیداستیک (بنیان استیل) که در ترکیب با کوآنزیم A و به‌صورت استیل کوآنزیم A بود، به شکل CO_2 آزاد می‌شود. ضمناً هشت اتم هیدروژن (به ازاء یک مولکول استیل کوآنزیم A که وارد چرخه شده است)، ایجاد می‌شود که، شش اتم آن جذب سه مولکول NAD^+ و دو اتم دیگر جذب گیرندهٔ دیگری به نام FAD می‌شود. به این ترتیب می‌توان گفت که به ازاء یک مولکول گلوکز در دوبار چرخه کربس ۶ مولکول H^+ و NADH و ۲ مولکول $FADH_2$ حاصل می‌شود.

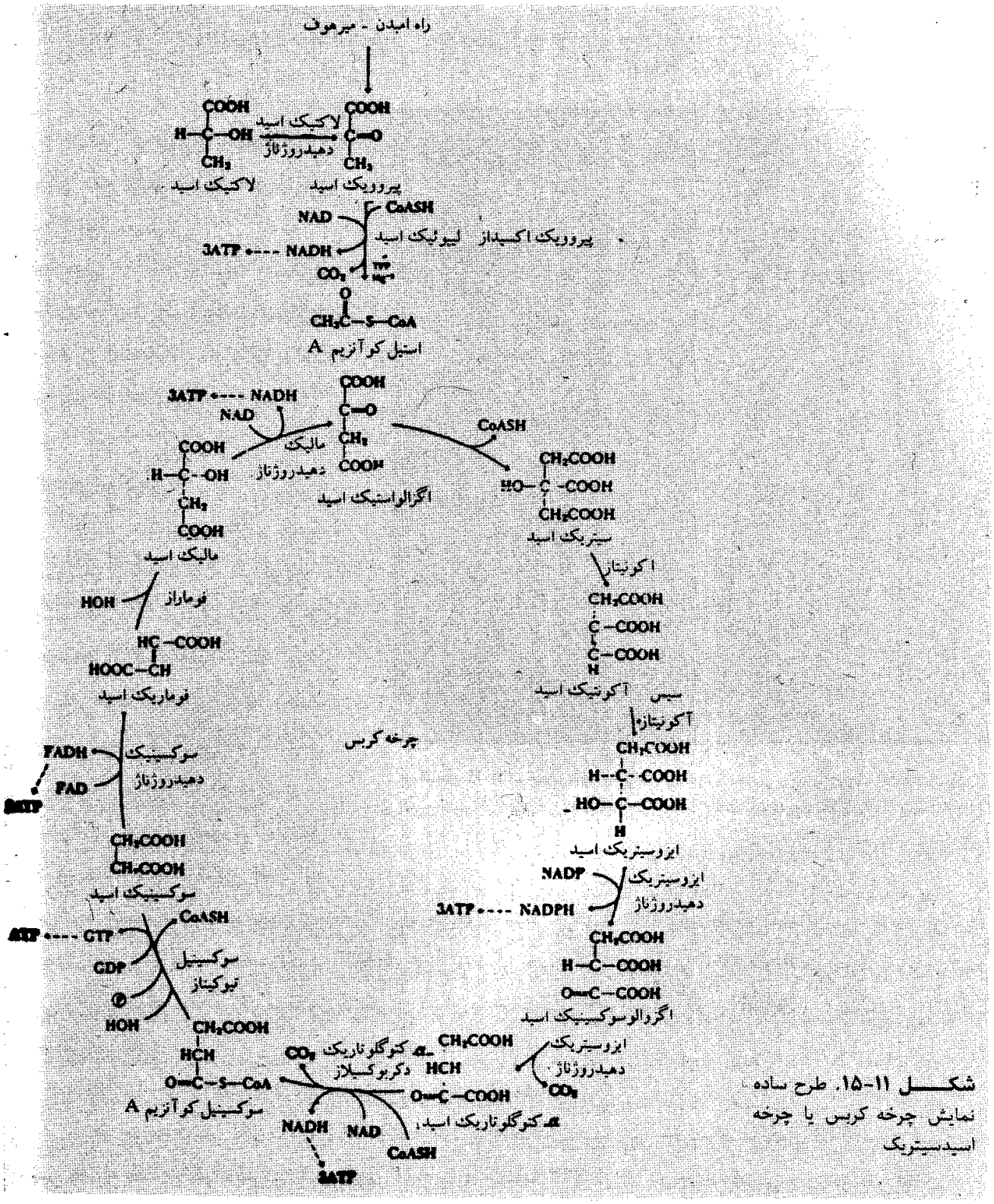
شکل ۱۱-۱۵ واکنش‌های چرخه کربس را نشان می‌دهد.

در هر چرخه کربس یک مولکول GTP نیز ایجاد می‌شود که به‌هم ارزش خود یک مولکول ATP تبدیل می‌گردد. پس به ازاء یک مولکول گلوکز، ۲ مولکول ATP نیز با واسطه GTP در دو بار چرخه کربس به وجود می‌آید.

۴- *انتقال الکترون‌ها و سنتز ATP*

آخرین مرحله متابولیسم هوازی گلوکز را زنجیر تنفسی تشکیل می‌دهد که طی آن هیدروژن‌هایی که در مراحل مختلف متابولیسم گلوکز (گلیکولیز - اکسیداسیون اسید پیرویک «دکربوکسیلاسیون اکسیداتیو اسیدپیرویک» و چرخه کربس) حاصل شده است و توسط ناقل‌های هیدروژن به محل انجام واکنش‌های زنجیر تنفسی در غشاء داخلی میتوکندری آورده شده از ناقلی به ناقل دیگر منتقل می‌شوند و در پایان از ترکیب پروتون‌ها ($2H^+$) و اکسیژن

1- Krebs Cycle

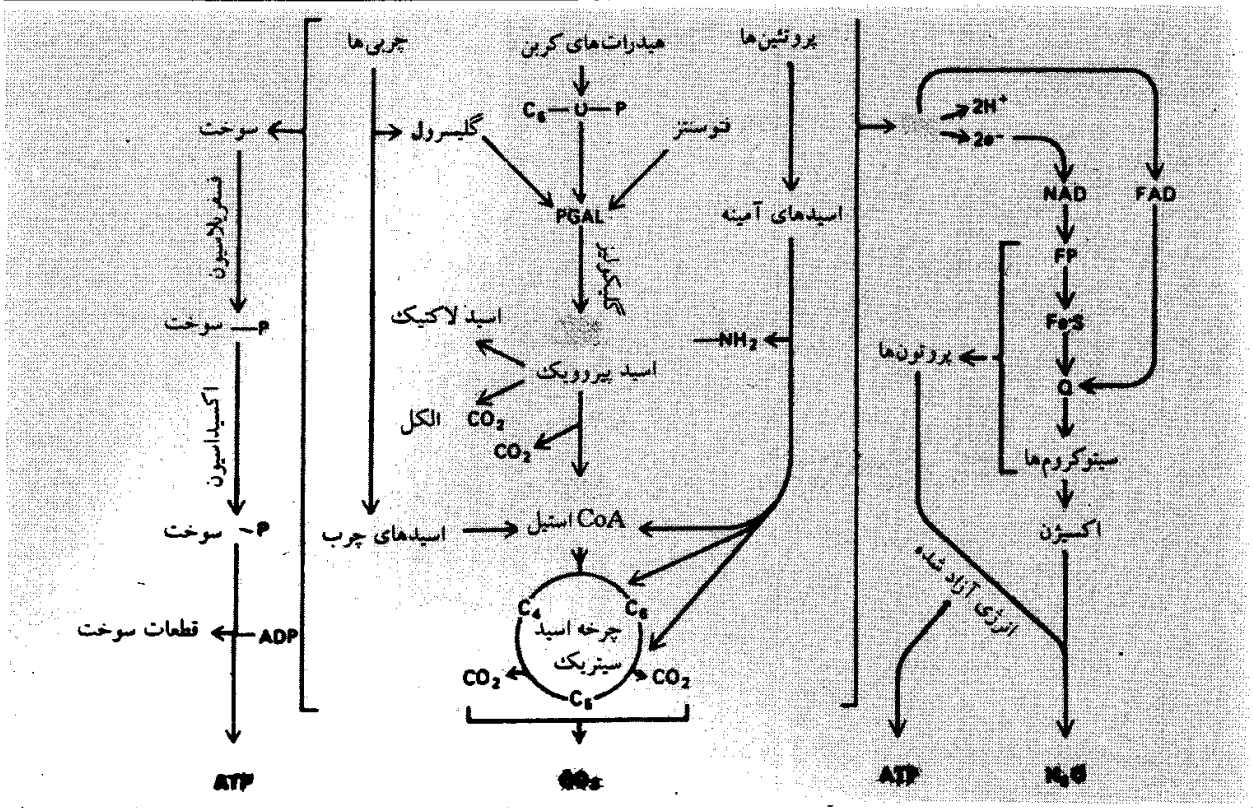


شکل ۱۱-۱۵. طرح ساده نمایش چرخه کربس یا چرخه اسیدسیتریک

(O^{2-}) مولکول آب به وجود می‌آید. در جریان انتقال پروتون‌ها و الکترون‌ها از ناقلی به ناقل دیگر، با استفاده از انرژی حاصل از انتقال الکترون‌ها و دخالت اکسیزوم‌ها بنا به واکنش‌هایی که تحت‌عنوان چگونگی سنتز ATP در زنجیر تنفسی به شرح آن می‌پردازیم (فسفوریلاسیون اکسایشی)، ATP سنتز می‌شود (شکل ۱۱-۱۶).

چگونگی سنتز ATP در زنجیر تنفسی (مکانیسم فسفوریلاسیون اکسایشی)

در مورد چگونگی سنتز ATP با دخالت غشاء درونی میتوکندری نظریات مختلفی به شرح زیر مطرح شده است:



شکل ۱۱-۱۶. تنفس سلولی و خلاصهٔ مراحل آن. قسمت وسطی طرح، مسیرهای اصلی سوختن هیدرات‌های کربن، چربی‌ها و پروتئین‌ها را نشان می‌دهد. بخش سمت چپ نشان می‌دهد که مقداری از ATP حاصل در طول تنفس از طریق تولید پیوندهای پر انرژی فسفات در روی مولکول‌های سوخت تشکیل می‌شود. این فسفات‌های پرانرژی بعداً به ADP انتقال می‌یابند. بخش سمت راست فعالیت‌های الکترون و فسفوریلاسیون‌های اکسیداتیو را نشان می‌دهد. توجه کنید که بعضی از اتم‌های H به FAD منتقل می‌شوند. این کوآنزیم، الکترون‌ها را در نیمه راه زنجیره انتقال جاگذاری می‌کند. در نتیجه وقتی که H از طریق FAD مهار می‌شود. فقط دو مولکول ATP تولید می‌شود. اما اگر الکترون‌های H از طریق NAD در طول زنجیره کامل ناقل‌ها جابه‌جا شوند، سه مولکول ATP تولید خواهد شد.

۱- نظریه میچل[1] (۱۹۶۷) یا نظریه شیمیواسموتیک

میچل معتقد است که غشاء درونی میتوکندری اساساً نسبت به پروتون‌ها غیرقابل نفوذ است و پروتون‌ها تنها با واسطه ناقلین اختصاصی که در بخش‌هایی از این غشاء وجود دارند، می‌توانند از غشاء بگذرند و از سطح بستره‌ای به سطح سیتوزولی و اطاق خارجی میتوکندری برسند. هیدروژن‌هایی که توسط دهیدروژنازها (با کمک NAD^+ و FAD) از سوبستراهای چرخه کربس جدا شده‌اند به فلاوپروتئین‌های غشاء داخلی میتوکندری می‌رسند و آنها را به‌صورت احیاء شده در می‌آورند ($FMN \longrightarrow FMNH_2$)

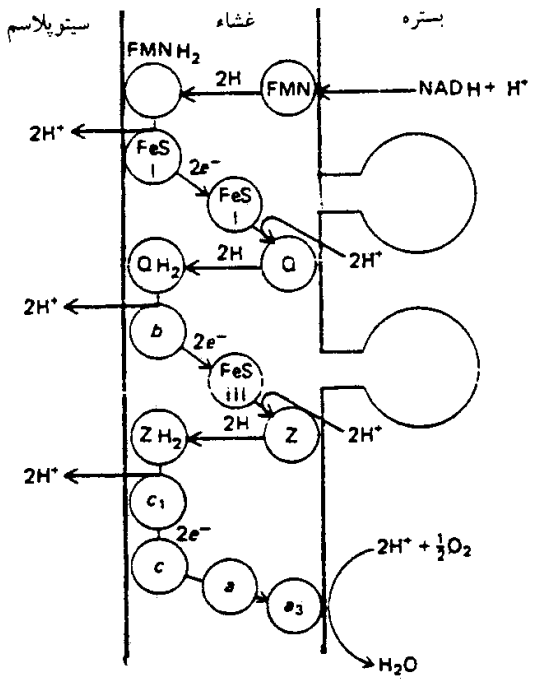
فلاوپروتئین‌ها با واسطه پروتئین‌های آهن - گوگرد، پروتون‌ها را به اطاق خارجی و الکترون‌های باقیمانده را به CoQ هدایت می‌کنند (شکل ۱۱-۱۷).

CoQ با گرفتن $2e^-$ آماده پذیرفتن پروتون‌های جدیدی می‌شود که از واکنش‌های بیوشیمیایی و یا از تفکیک یونی آب در بستره ایجاد شده‌اند و به این ترتیب $CoQH_2$ (حالت احیاشده اوبی‌کینون) ایجاد می‌شود. این ترکیب در سطح سیتوزولی غشاء درونی، با واسطه Cytb، پروتون‌ها را به اطاق خارجی و الکترون‌ها را به پروتئین‌های آهن - گوگرد موجود در زنجیر تنفسی هدایت می‌کند. این الکترون‌ها توسط ماده Z که یک ناقل فرضی است گرفته می‌شود و ناقل را آماده پذیرفتن دو پروتون از پروتون‌های بستره‌ای می‌سازد (شکل ۱۱-۱۷).

ZH_2 به سطح سیتوزولی غشاء درونی میتوکندری منتقل می‌شود و با واسطه $CytC_1$، پروتون‌ها را به اطاق

1- Mitchell

خارجی و الکترون‌ها را به Cyt هدایت می‌کند. این الکترون‌ها با واسطهٔ Cyt_a و سپس Cyt_{a3} به سطح بستره‌ای غشاء و از آنجا به بستره (ماده زمینه‌ای میتوکندری) رسیده، اکسیژن مولکولی را به حالت اکسیژن یونی درمی‌آورند ($\frac{1}{2}O_2 + 2\bar{e} \rightarrow O_2^-$) و آن را آماده ترکیب با پروتون‌ها و تشکیل مولکول آب می‌سازند. با انتقال پروتون‌ها از بستره به اطاق خارجی تراکم پروتون‌ها در اطاق خارجی افزایش می‌یابد و نیز تراکم پروتون‌ها در دو طرف غشاء داخلی میتوکندری نامتعادل می‌گردد. با این اختلاف تراکم، بین دو طرف غشاء اختلاف PH و اختلاف پتانسیل الکتریکی ایجاد می‌شود (شکل ۱۱-۱۸). در نهایت پروتون‌ها راه بازگشتی را جستجو می‌کنند و از کانال عبور پروتون‌ها که در بخش پایه ذرات حیاتی (اکسیزوم‌ها) قرار دارد، از اطاق خارجی به سوی بستره برمی‌گردند. در بازگشت بر شکل و ویژگی‌های بخش سراکسیزوم (F_1 یا عامل راکر) اثر کرده آن را در جهت ATP سنتتازی فعال می‌کنند. در این هنگام با استفاده از انرژی آزاد شده از انتقال الکترون‌ها در طول زنجیر تنفسی که توسط بخش بینابینی اکسیزوم (OSCP یا عامل پیوستگی) قاپیده می‌شود و در اختیار سراکسیزوم قرار می‌گیرد، عمل فسفوریلاسیون ADP به ATP انجام می‌شود (فسفوریلاسیون اکسایشی) بنابراین در غشاء داخلی میتوکندری دو نوع پدیده انتقال صورت می‌گیرد: انتقال عرضی پروتون‌ها از بستره به اطاق خارجی و سپس بازگشت پروتون‌ها از محل کانال عبور پروتون موجود در پایه اکسیزوم‌ها این عمل موجب فعال شدن سراکسیزوم‌ها در جهت ATP سنتتازی می‌شود، دیگری انتقال طولی یعنی انتقال الکترون‌ها توسط عوامل زنجیر تنفسی که موجب آزاد شدن انرژی می‌گردد. هرگاه مقدار انرژی آزاد شده به حدود ۸ کیلوکالری برسد و به عبارت دیگر اختلاف پتانسیل الکتریکی بین عوامل انتقال الکترون به لااقل ۰/۱۶ ولت برسد (شکل ۱۱-۱۸) شرایط انرژیی برای سنتزیک مولکول ATP فراهم می‌گردد.



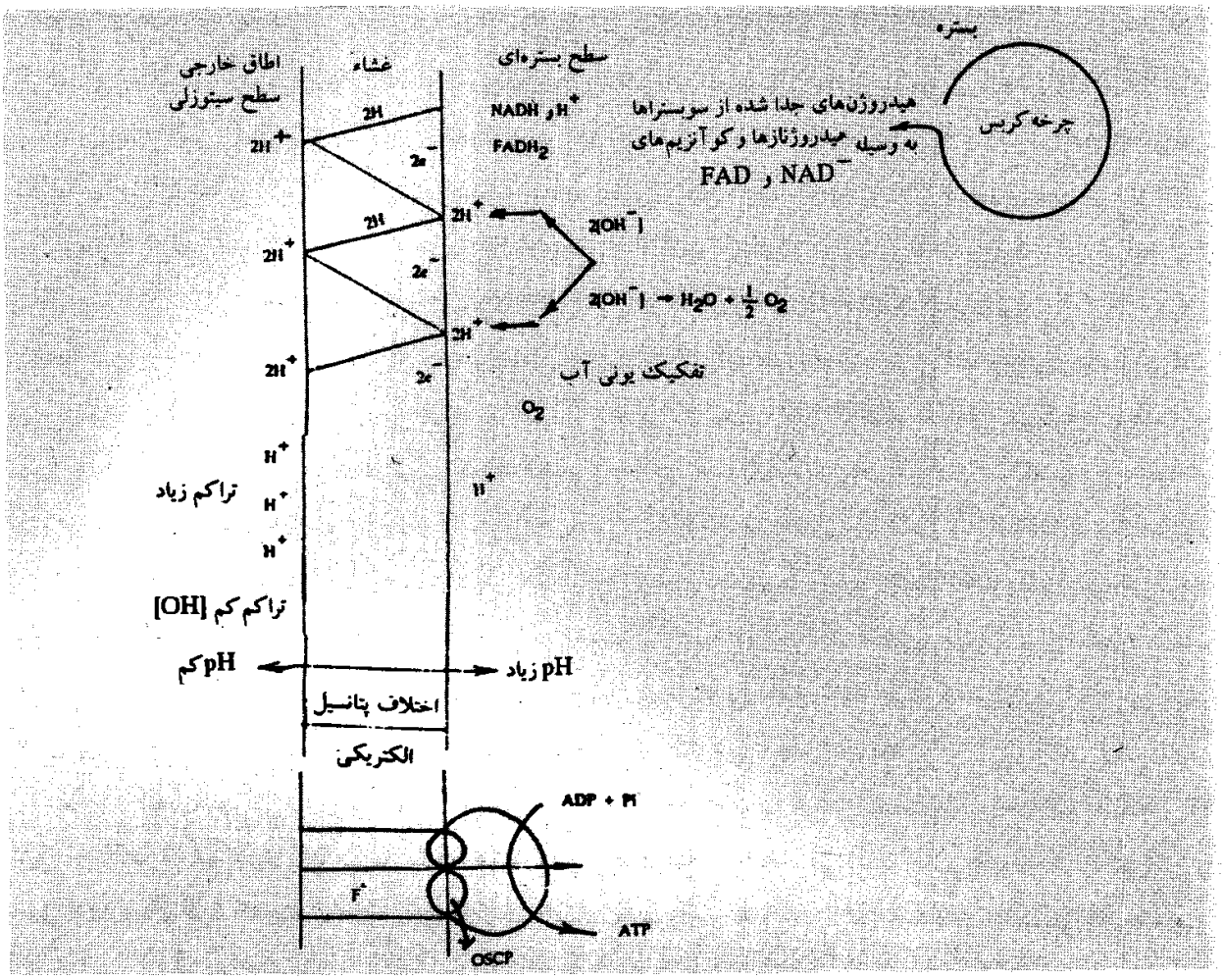
شکل ۱۱-۱۷. طرحی تغییریافته از نظر میچل لازم به یادآوری است که شناسایی پروتئین‌های آهن - گوگرد و دخالت آنها در انتقال الکترون‌ها و پروتون‌ها از آگاهی‌های سال‌های اخیر است و بنابراین در اینجا اساس نظر میچل در انطباق با دیدهای کنونی آورده شده است.

برای نظریه میچل طرح‌های اصلاح شده مختلفی ارائه شده است که نمونه‌ای از آنها که بتواند بهتر با توجیه نظر تناسب داشته باشد آورده شده است.

۲- *نظریه اسلتر*[1] (۱۹۷۳) یا نظریه مکانوشیمیایی

اسلتر معتقد است که دو سیستم انتقال الکترون‌ها و فسفوریلاسیون از نظر مولکولی در ارتباطند و اطلاعات از راه برهم‌کنش‌های مولکولی نزدیک به‌هم که بخشی از آن می‌تواند از نوع برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک باشد، بین دو سیستم برقرار می‌گردد. تصور می‌شود که هر پروتئین سازنده زنجیر انتقال الکترون‌ها هنگام پذیرفتن دو الکترون تغییری را در شکل فضایی خود متحمل می‌شود که در نهایت به اکسیزوم و بخش ATP سنتتازی آن انتقال می‌یابد و

1- Slater



شکل ۱۱-۱۸. دیاگرام پیوند شیمیواسموتیک، طبق نظریه میچل. a) در ضمن انتقال الکترون، یون‌های H^+ به طرف C غشاء داخلی میتوکندری رانده می‌شوند. b) این جریان، یک شیب H^+ (اختلاف PH) و پتانسیل الکتریکی در طول غشاء ایجاد می‌نماید. c) این شیب، موجب می‌شود که با فشار پروتون‌ها، کانال عبور پروتون‌ها در بخش پایه اکسیزوم‌ها باز شود و پروتون‌ها به سوی بستره بازگردند و ضمن بازگشت بخش F_1 را در جهت ATP سنتتازی فعال نمایند.

آن را در جهت سنتز ATP تحریک می‌کند. این انتقال از راه برهم‌کنش‌های مولکول‌ها در فواصل نزدیک صورت می‌گیرد.

با تصورات جدید، نظریه شیمیواسموتیک و نظریهٔ شیمیایی دو نظر متضاد نیستند بلکه دو شکل بیان یک پدیده‌اند (ارنستر[1]، ۱۹۷۷)، هنگام سنتز ATP در میتوکندری، هم تغییرات PH و تغییرات پتانسیل الکتریکی در طرفین غشاء داخلی صورت می‌گیرد و هم به علت ارتباط مولکولی عوامل فسفوریلاسیون و عوامل انتقال الکترون، ضمن انتقال الکترون‌ها تغییراتی در شکل فضایی اکسیزوم‌ها و بخش سر آنها ایجاد می‌شود که آنها را در جهت ATP سنتتازی تحریک می‌کند.

۳- نظریه کنونی

با توجه به آگاهی‌های کنونی و نتایج حاصل از روش‌های اسپکتروفتومتری مشخص شده است که میتوکندری‌ها اندامک‌های دارای امکان تغییر شکل و تغییر حجم‌اند و وضع آنها بین سه حالت: عادی[1]، متراکم و متورم تغییر می‌کند. در حالت عادی وسعت اطاق خارجی حدود ۱۰۰ تا ۲۰۰ آنگستروم است. در حالت متراکم و به ویژه تراکم بدون کاهش حجم، ماده زمینه‌ای مقداری از آب خود را به اطاق خارجی می‌دهد و غلیظ می‌شود. با این وضع در بستره فشار منفی ایجاد می‌گردد که موجب مکش تاج‌ها و اکسیزوم‌های موجود بر سطح آنها به طرف داخل

1- Ernester 2- Orthodox

میتوکندری می‌شود. از طرفی ورود آب به اطاق خارجی موجب وسیع شدن آن و فشار تاج‌ها از خارج به داخل می‌گردد. این فشار نیز اکسیزوم‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد و در مجموع با مکش ناشی از کاهش فشار در ماده زمینه‌ای و رانش ناشی از افزایش فشار در اطاق خارجی، تاج‌ها بلند و کشیده، تعدادشان زیاد و اکسیزوم‌های موجود بر سطح آنها نیز کشیده می‌شوند؛ سراکسیزوم‌ها به حالت بیضی شکل درآمده از بخش پایه تا حدی دور می‌شود. این وضع به‌عنوان حالت فعال اکسیزوم در جهت ATP سنتتازی منظور می‌گردد که مشروط به وجود سایر شرایط و از جمله وجود انرژی کافی، با انجام فسفوریلاسیون اکسایشی، از ADP و Pi، ATP تشکیل می‌شود.

برعکس در حالت متورم میتوکندری و به ویژه تورم بدون افزایش حجم، ماده زمینه‌ای آب زیادی جذب می‌کند، رقیق می‌شود و با فشار به غشاء درونی موجب کشیدگی آن و کم شدن وسعت اطاق خارجی می‌گردد. با فشار به غشاء درونی تاج‌ها کوتاه و تعدادشان کم می‌شود، اکسیزوم‌ها نیز تحت فشار قرار می‌گیرند و سراکسیزوم به پایه آن فشرده می‌شود. این وضع حالت غیرفعال اکسیزوم از نظر سنتز ATP می‌باشد و با فشار به OSCP عملاً امکان فعالیت آن و به دام انداختن انرژی لازم برای سنتز ATP، از انرژی آزاد شده در زنجیر انتقال الکترون، سلب می‌گردد.

روش‌های اسپکتروفتومتری نشان داده‌اند که میتوکندری‌ها در حالت عادی، متراکم و متورم طیف جذبی‌متفاوتی دارند که از هم قابل تشخیص است. با چنین روش‌هایی تأیید شده است که بیشترین بازدهی سنتز ATP وقتی است که میتوکندری‌ها به حالت متراکم (تراکم بدون کاهش حجم) باشند.

بر مبنای آگاهی‌های کنونی وجود سه اکسیزوم به ازای هر زنجیر تنفسی الزامی نیست بلکه اختلاف پتانسیلی که به دلیل اختلاف تراکم پروتون‌ها در دو طرف غشاء داخلی میتوکندری ایجاد می‌شود حکم یک میدان الکتریکی را پیدا می‌کند. همان گونه که میدان‌های الکتریکی در فاصله‌ای دور هم عمل می‌کنند، اختلاف پتانسیلی که به دلیل انتقال عرضی پروتون‌ها در بخشی از غشاء درونی میتوکندری ایجاد می‌شود، نه تنها عوامل فسفوریلاسیون (سراکسیزوم‌ها) مجاور خود را تحت تأثیر قرار می‌دهد به عوامل فسفوریلاسیون بخش‌های دورتری از غشاء نیز مؤثر است و آنها را در جهت ATP سنتتازی تحریک می‌کند.

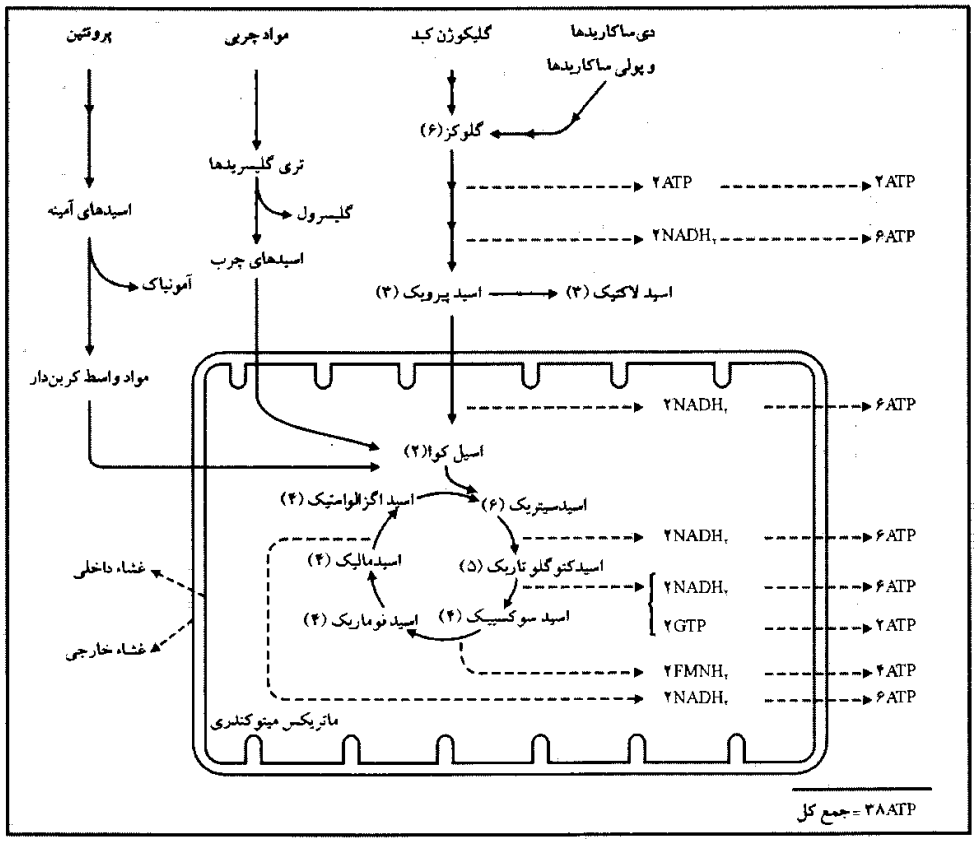
همان‌طور که در شکل ۱۱-۱۱ نشان داده شده است، تصور کنونی این است که، طرفین هر مجموعه عوامل زنجیر تنفسی را اکسیزوم‌ها یا همان ذرات حیاتی (بنیادی) اشغال کرده‌اند. انرژی آزاد شده از انتقال الکترون‌ها در زنجیر انتقال الکترون‌ها در حد چنین فاصله‌های نزدیکی می‌تواند به وسیله بخشی بینابینی (OSCP یا سازه اتصال) به دام بیافتد و در اختیار سر (عامل راکر) قرار گیرد. در این هنگام چنانچه شرایط دیگر هم برای عمل فسفوریلاسیون فراهم باشد، سنتز ATP صورت خواهد گرفت.

نقش زیستی میتوکندری

با توجه به مجموعه ویژگی‌های زیخت‌شناسی، ساختاری، فراساختاری، سازمان مولکولی و ترکیب شیمیایی میتوکندری‌ها می‌توان مهم‌ترین فعالیت‌های زیستی آنها را به شرح زیر مورد توجه قرار داد:

۱ - تنفس هوازی سلول‌ها

همان گونه که شکل ۱۱-۱۹ نشان می‌دهد مواد انرژی‌زای مختلف مثل گلوکز، اسیدهای چرب (حاصل از گوارش لیپیدها) و اسیدهای امینه (حاصل از گوارش پروتئین‌ها) سرانجام ضمن تغییرات متابولیکی درون سیتوپلاسمی با واسطه ناقلین اختصاصی به بستره میتوکندری می‌رسند.



شکـــل ۱۱-۱۹. طرح سادهٔ سوختن مواد آلی و تولید انرژی (ATP)

گلوکز پس از گلیکولیز و دکربوکسیلاسیون اکسایشی به‌صورت استیل کوآنزیم A به بستره میتوکندری می‌رسد و در واکنش‌های چرخه کربس مورد استفاده قرار می‌گیرد. اسیدهای چرب پس از آن که به وسیله کارنی تین از خلال غشاء داخلی گذشتند، در نتیجه ترکیب با کوآنزیم A فعال شده و به وسیله آنزیم‌های ویژه بستره‌ای و متناسب با نوع اسید چرب از مراحل تجزیه تدریجی[1] یا پیچه‌لینن می‌گذرند و در هر مرحله دو اتم کربن را به‌صورت ریشه استیل CH_3CO از دست می‌دهند و در نهایت مقداری استیل کوآنزیم A ایجاد می‌کنند که وارد چرخه کربس می‌شود. نمای عمومی پیچه‌لینن در صفحه ۱۹۸ آمده است.

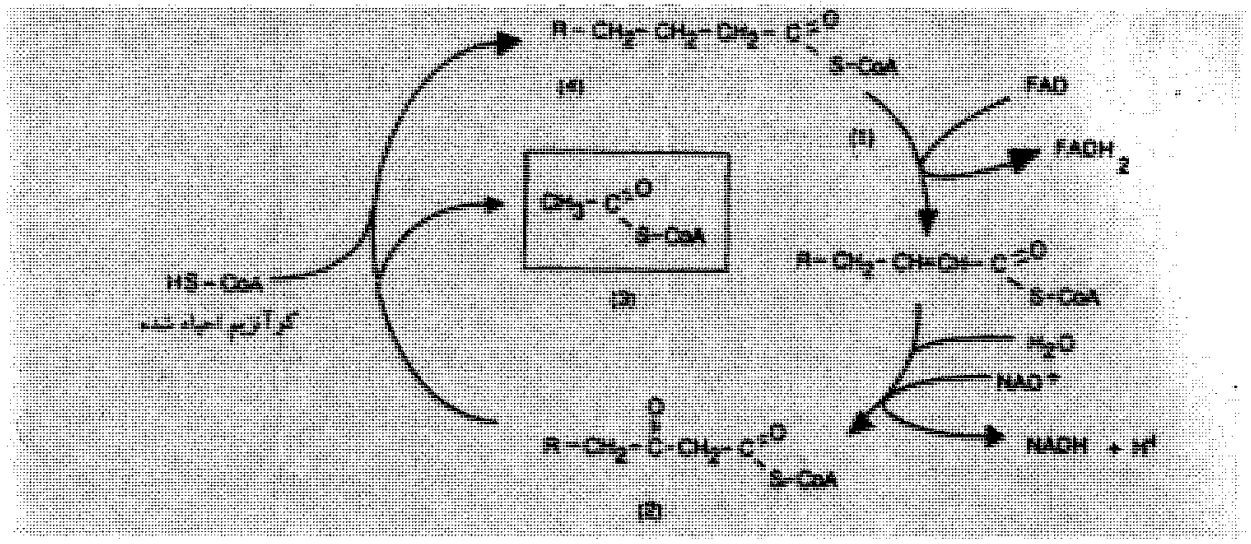
اسیدهای آمینه نیز پس از رسیدن به بستره میتوکندری توسط آنزیم‌های اختصاصی از مراحل متابولیکی ویژه خود گذشته و مقداری استیل کوآنزیم A به وجود می‌آورند که آن نیز در چرخه کربس مورد استفاده قرار می‌گیرد.

با انجام هر چرخه کربس با استفاده از استیل کوآنزیم A در بستره میتوکندری علاوه بر مولکول‌های گاز کربنیک و آب، سه مولکول H^+ و NADH، یک مولکول $FADH_2$ و یک مولکول GTP تشکیل می‌شود.

همان گونه که در صفحات قبل شرح داده شد، GTP بلافاصله به GDP برمی‌گردد و شرایط را برای تشکیل ATP از مجموعه ADP و Pi آزاد شده، فراهم می‌سازد.

H^+ و NADH و $FADH_2$ نیز در زنجیر تنفسی با دادن هیدروژن‌ها و به جریان انداختن انتقال الکترون‌ها و پروتون‌ها موجب بیوسنتز ATP می‌شوند. بیلان بیوسنتز ATP برای متابولیسم کامل هر مولکول گلوکز در مجموعه شرایط مناسب برای تنفس هوازی ۳۸ مولکول (شکل ۱۱-۱۹) و برای اسیدهای چرب و اسیدهای آمینه متناسب با نوع آنها می‌باشد (شکل ۱۱-۲۰).

1- Fatty acid bio degradation



شکل ۱۱-۲۰. اکسیداسیون اسیدهای چرب بتا (پیچه‌لینن)

۲- سنتز اسیدهای چرب

سنتز اسیدهای چرب می‌تواند در میتوکندری‌ها صورت گیرد. این عمل از راه یک سیستم شناخته شده تحت‌عنوان (سیستم میتوکندریایی) انجام می‌شود که راهی عکس اکسیداسیون اسیدهای چرب است. در این سنتزها به‌خصوص اسیداستئاریک تشکیل می‌شود اما مقادیر کمی از اسیدهای پالمیتیک، لُریک، میریستیک، اولئیک و آراشیدونیک نیز تشکیل می‌شود.

۳- دخالت میتوکندری در گوارش چربی‌ها

هنگام روزه‌داری وقتی ذخایر سلول مصرف می‌شود میتوکندری‌ها به طرف ذرات چربی حرکت کرده و روی ذرات چرب خم می‌شوند. محل تماس میتوکندری با ذره چربی رنگ روشن پیدا می‌کند که به دلیل تجزیه تدریجی چربی تحت تأثیر آنزیم‌های میتوکندری می‌باشد. بنابراین هنگام روزه‌داری میتوکندری‌ها با حرکات فعال به طرف چربی‌ها می‌روند و موجب گوارش آنها می‌شوند.

۴- ذخیره، انباشتن و تجمع مواد در میتوکندری‌ها

میتوکندری‌ها می‌توانند مواد را در اطاق داخلی خود انباشته کنند. مثال بارز این مورد رنگ‌آمیزی زیستی میتوکندری با سبزژانوس است (میکائلیس ۱۸۹۹). هم‌اکنون می‌دانیم که سبزژانوس در سلول زنده نفوذ می‌کند و در آنجا به یک ماده بی‌رنگ احیا می‌شود. پس از انباشته شدن در میتوکندری و اکسیداسیون مجدد به وسیله سیتوکروم اکسیداز دوباره به رنگ اول برمی‌گردد. میتوکندری‌ها می‌توانند پروتئین‌ها، لیپیدها، فلزات (Ca،Fe،Ag)، رنگ‌ها، مواد تخمیرکننده (مایه‌ها) و ذرات مشابه ویروس‌ها را در خود جمع کنند. کلسیم متراکم شده به وسیله میتوکندری‌ها به‌صورت ذراتی به درشتی ۵۰ نانومتر دیده می‌شود.

بخش عمده کلسیم با جذب یون‌های فسفات به‌صورت فسفات کلسیم درمی‌آید که تجمع آن در میتوکندری موجب سخت شدن میتوکندری و کاهش بازدهی سنتز ATP در آن می‌گردد. مهم‌ترین موادی که در میتوکندری‌ها جمع می‌شوند عبارتند از:

الف - رسوب ترکیبات آهن‌دار در میتوکندری‌ها: سلول‌های شبکه‌ای، گویچه‌های سرخ پیر و فرسوده را تجزیه می‌کنند.

مولکول‌های فرّیتین در سیتوپلاسم آنها پایدار می‌شود این مولکول‌ها به اریتروبلاست‌ها (سلول‌های خاستگاه گلبول‌های قرمز) انتقال می‌یابند و به میتوکندری‌ها نفوذ کرده در آنها به مولکول‌های کوچک تجزیه می‌شوند سپس این میتوکندری‌ها پاره می‌شوند و ذرات حاصل را آزاد می‌کنند که در سنتزهموگلوبین به کار گرفته می‌شود.

ب - **رسوبی چربی‌ها:** بعد از زمان کوتاه روزه‌داری در سلول‌های کبدی می‌توان ارتباطی را بین ذرات لیپیدی سیتوپلاسم و میتوکندری‌ها مشاهده کرد، میتوکندری‌ها به گویچه‌های لیپیدی می‌چسبند. در سطح این گویچه‌های لیپیدی بخش‌هایی که تراکم کمتری دارند پدیدار می‌شوند. این نواحی، استفاده میتوکندری‌ها از ذرّات چربی را نشان می‌دهند. هنگام روزه‌داری، چربی‌ها در سیتوزول کاهش می‌یابند و میتوکندری‌ها می‌توانند به‌طور فعالی از چربی‌هااستفاده کنند. گاهی بخشی از چربی‌ها به‌صورت ذراتی در بستره می‌مانند که درشتی آنها تا ۴۰۰ میکرومتر نیز می‌رسد.

ج - **پروتئین‌ها:** در اووسیت‌های حلزون‌ها ذخیره پروتئین‌ها به حالت بلورنما (کریستالین) در میتوکندری‌ها گزارش شده است. بزرگی این بخش‌های بلور مانند پروتئینی به حدود ۶ نانومتر می‌رسد و به وسیله فضاهای حدود ۲ نانومتر از هم جدا شده‌اند.

د - **تجمع کاتیون‌ها:** علاوه بر تنفس و فسفوریلاسیون اکسایشی که دو عمل اصلی میتوکندری‌ها هستند، تجمع کاتیون‌ها یکی دیگر از نقش‌های شناخته شده این اندامک است. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که در میتوکندری‌های منفرد، یون‌های Ca^{++} می‌توانند تا چند صد برابر بیشتر از وضع عادی وجود داشته باشند. همچنین مشخص شده که همزمان با ورود Ca^{++}، فسفات نیز به میتوکندری‌ها وارد می‌شود، نسبت Ca:P برابر با ۱/۷:۱ است (تقریباً معادل نسبت هیدروکسی آپاتیت در استخوان). مقدار Ca^{++} و فسفاتی که در میتوکندری جمع می‌شود ممکن است به آن حد باشد که موجب افزایش وزن خشک تا میزان ۲۵٪ گردد و توده‌های بسیار کوچک بلورینی را به وجود آورد که نسبت به الکترون‌ها متراکم بوده و در میتوکندری‌ها قابل رؤیت باشند.

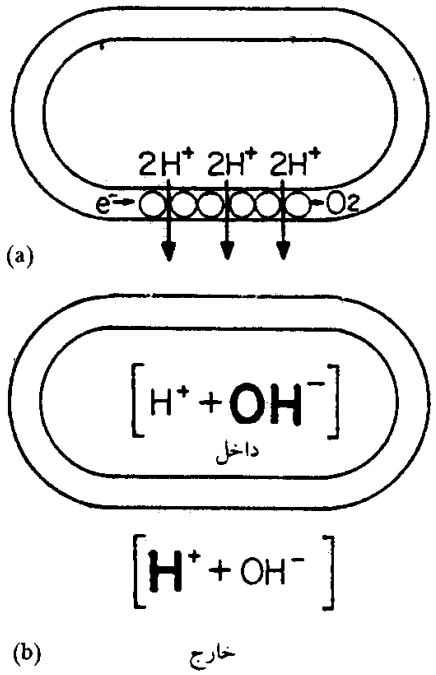
تجمع این مواد اغلب در استئوبلاست‌های بافت‌هایی که کلسیم‌دار[1] می‌شوند دیده می‌شود. تجمع Ca^{++} و کاتیون‌های دو ظرفیتی دیگر مثل Mn^{++}، جایگزین سیستم انتقال الکترون می‌شود، به نحوی که میتوکندری با حضور Ca^{++}، هیچ ADPای را به ATP تبدیل نمی‌کند ولی Ca^{++} و فسفات جمع می‌کند. در عین حال، فسفوریلاسیون اکسایشی و نیز تجمع Ca^{++} مشروط به انجام تنفس سلولی (و همچنین چرخه کربس) است. تجمع Ca^{++} و کاتیون‌های دیگر در میتوکندری با از دست دادن H^+، برای حفظ توازن الکتریکی همراه است. بستره با تجمع یون‌های OH^- حالت قلیایی پیدا می‌کند و این در حالی است که گروه‌های اسیدی به خارج رانده می‌شوند. جالب است خاطر نشان سازیم که در کلروپلاست‌ها این پدیده برعکس است و کلروپلاست‌ها یون‌های OH^- را از خود خارج کرده و H^+ را انباشته می‌کنند.

آنتی بیوتیک‌ها، مثل والینومیسین، ورود کاتیون‌ها به میتوکندری‌ها را تسهیل کرده و در انجام این عمل، همانند نوعی ناقل متحرّک عمل می‌کنند، به دلیل همین ویژگی این مواد را یون‌بر[2] نامند. عمل این آنتی‌بیوتیک‌ها وابسته به این خاصیت است که می‌توانند مجموعه‌های کاتیونی باردار (مثل عمل والینومیسین)، یا بدون بار (مثل عمل نیژه‌ریسین[3]) تشکیل دهند.

به نظر میچل، حرکات یونی در میتوکندری‌ها دقیقاً با ساختمان مولکولی غشاء داخلی در ارتباط است.

1- Calicifie 2- ionophores 3- nigericine

آنزیم‌های سیستم انتقال الکترون‌ها، به‌خصوص ATP سنتتاز یا سیستم رابط F_1، به‌طور اتفاقی (بی‌نظم) توزیع نشده‌اند بلکه در امتداد بُرداری در طول غشاء جای دارند، یعنی بین دو سطحِ دارای قطبیت (پلاریزه) قرار گرفته‌اند و مثل این است که غشاءها در جهت‌های مختلف، ناهمگن (آنیزوتروپ) باشند. همان‌طور که قسمت فوقانی شکل ۱۱-۲۱ نشان می‌دهد الکترون‌ها می‌توانند از طول غشاء بگذرند و به وسیله سیتوکروم اکسیداز به اکسیژن برسند و این در حالی است که یون‌های H^+ در یک سطح و یون‌های OH^- در طرف دیگر قرار می‌گیرند.



شکل ۱۱-۲۱. a) سیستم انتقال الکترون یون‌های H^+ را به خارج پمپ می‌کند. b) نتیجه نهایی: افزایش یون‌های OH^- در داخل میتوکندری و آزادشدن H^+ است.

هـ- تغییرات ساختمانی ضمن ذخیره مواد: مثال‌های بالا مشخص می‌سازد که، میتوکندری‌ها می‌توانند مواد مختلفی را جمع کرده و در خود ذخیره نمایند که بعداً مورد استفاده قرار خواهند گرفت. هنگام ذخیره مواد، میتوکندری‌ها اغلب به حالت یک غشایی و شبیه باکتری‌های کوچک دیده می‌شوند و به‌تدریج تیغه‌هایشان محو می‌گردند. بعد از حذف مواد ذخیره‌ای میتوکندری‌ها دوباره به حالت عادی خود برمی‌گردد.

و - آب: هرگاه در سیتوزول آب زیاد شود واکنش‌های سیتوزولی به خطر می‌افتند در این حالت میتوکندری‌ها می‌توانند مقداری از آب سیتوزول را در خود ذخیره نمایند. این حالت موجب تورم میتوکندری و کاهش قدرت بیوسنتز ATP می‌گردد.

۵- تورم و فشردگی (انقباض)

در غیاب ADP، تورم طولی و عرضی شدید ممکن است حجم میتوکندری را ۳ تا ۵ برابر افزایش دهد. تجمع ATP با برقراری تنفس به میتوکندری امکان بازگشت به اندازه طبیعی خود را می‌دهد. در طول چنین تورّمی، نفوذپذیری غشاءها می‌تواند افزایش یابد. در مجموع، این تحقیقات نشان می‌دهند که میتوکندری‌ها در ورود یا خروج مایع درون سلولی نقش قابل توجهی دارند. یک میتوکندری جدا شده شبیه یک اسمزسنج عمل می‌کند. در عین حال، همان‌طور که قبلاً یادآور شدیم عوامل مهم دیگری نیز موجب تغییرات مشابهی در میتوکندری‌ها می‌شوند.

از عوامل متورم‌کننده، فسفات، Ca^{++}، گلوتاتیون (احیاء شده) و به‌خصوص هورمون تیروکسین را نام می‌بریم. تیروکسین مناسب‌ترین عامل تورم است و می‌تواند انقباضات فیزیولوژیکی میتوکندری‌ها را در جهت تورم آنها تغییر دهد. از آنجا که میتوکندری‌ها دارای دو غشاء و دو حفره (بخش)اند، می‌توانند به دو شکل عمومی متورم شوند. آب، K^+، Na^+ به سرعت از دو غشاء میتوکندری نفوذ می‌کند و با رقیق کردن بستره موجب تغییرات ساختمانی می‌گردند.

از طرف دیگر ساکارز به غشاء خارجی خیلی سریع‌تر از غشاء داخلی نفوذ کرده و می‌تواند بدون رقیق کردن بستره موجب «تورّمی» در فضای خارجی یعنی در فضای بین تیغه‌ها شود. میتوکندری‌ها می‌توانند پیکره خود را بین دو حد نهایی تغییر دهند. یکی از این حالت‌ها که آن را حالت طبیعی یا عادی نامند معمولاً در بافت‌های سالم (دست نخورده) مشاهده می‌شود؛ حالت دیگر حالت متراکم (منقبض شده) است که در آن غلیظ شدن محتویات اطاق

درونی میتوکندری و تجمع مایع در محتوای اطاق خارجی (بین دو غشاء) دیده می‌شود. در حالت عادی غشاء داخلی دارای تیغه‌های طویلی (به وضع عادی) است و بستره که حالت شبکه‌ای یا دانه‌دانه‌ای دارد، تقریباً تمام حجم درونی میتوکندری را پر می‌کند. در وضعیت متراکم شده غشاء داخلی چین‌خوردگی‌های بی‌نظم اتفاقی دارد و بستره که در این حالت همگن‌تر است تنها حدود ۵۰٪ حجم میتوکندری را اشغال می‌کند. در حالت اخیر جالب است به وجود اتصال‌هایی که بین غشاء خارجی و داخلی در برخی نواحی وجود دارند، توجه کنیم. بیش از صد ناحیه اتصال فشرده در هر میتوکندری قابل رؤیت است.

تبدیل و ضعیت متراکم شده به وضع عادی نیاز به حضور سیستم انتقال الکترون‌ها دارد. متوقف کردن زنجیر تنفسی به وسیله سیانور، آنتی‌میسین A، یا آمیلات مانع این تبدیل می‌شود. وقتی مقدار ADP خارجی کاهش می‌یابد به‌طوری که از آن چیزی برای فسفوریلاسیون باقی نمی‌ماند، حالت عادی ایجاد می‌شود. اگر در این حالت ADP به محیط افزوده شود، تنفس دوباره و سریعاً شروع شده و غشاء داخلی منقبض می‌گردد. تصور می‌شود که در زمان گذر از حالت عادی به وضع متراکم شده، تغییر در غشاء داخلی و در بستره صورت می‌گیرد. غشاء داخلی دارای عوامل انقباضی یا (مکانوآنزیم‌ها) است، اما نقش بستره در این انقباض را نیز بایستی در نظر داشت.

۶- سنتز پروتئین‌ها و ریبوزوم‌ها در میتوکندری

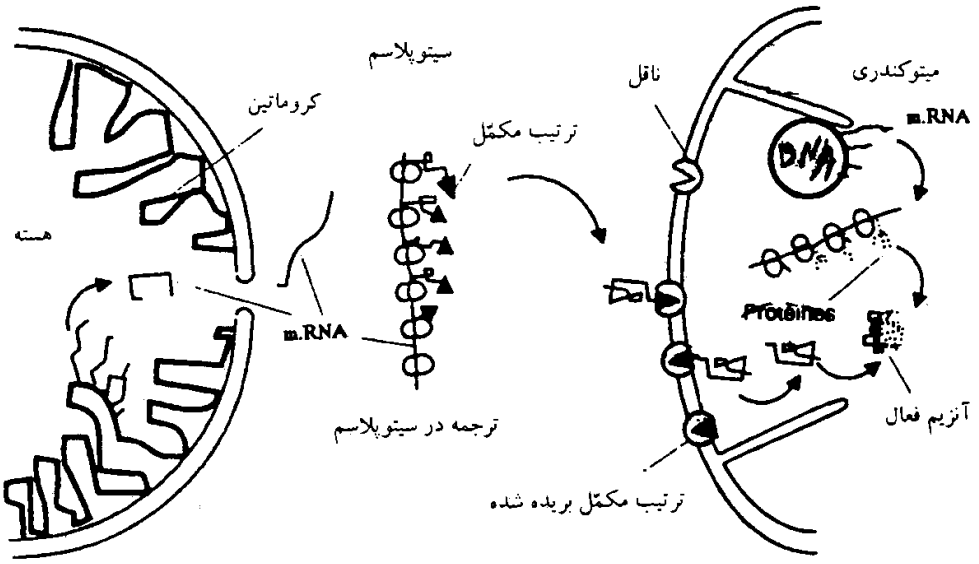
در سال‌های اخیر دلایل بدون تردیدی مبنی بر سنتز پروتئین‌ها از اسیدهای آمینه در میتوکندری‌ها به‌دست آمده است. ظاهراً این اندامک‌ها دارای تمام دستگاه‌های لازم برای سنتز پروتئین‌ها، همانند آنچه در سیتوپلاسم موجود است، می‌باشند. یکی از دلایل مربوط به این مطلب، شناسایی ریبوزوم‌های حقیقی در میتوکندری‌هاست. در بیشتر موارد ریبوزوم‌ها را به کمک میکروسکوپ الکترونی می‌توان نشان داد. یکی از مسائل جالب شناخته شده این است که این ریبوزوم‌ها کوچک‌تر از ریبوزوم‌های سیتوپلاسمی و همانند ریبوزوم‌های باکتری‌ها از نوع ۷۰S هستند. در پستانداران این ریبوزوم‌ها کوچک‌تر و از نوع ۵۵S می‌باشند. سنتز پروتئین در میتوکندری‌ها به وسیله کلرامفنیکول متوقف می‌شود (مانند باکتری‌ها) در حالی که سنتز پروتئین سیتوپلاسمی به وسیله این ماده متوقف نمی‌گردد. از میتوکندری‌ها، RNA پلیمرازها، mRNAها و tRNAها جدا شده‌اند که از نوع باکتریی هستند و می‌توانند در سیستمی خارج از سلول یوکاریوتی عمل کنند. رمزهای ژنتیکی که برای سنتز پروتئین‌ها در میتوکندری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند از رمزهای مورد استفاده در سنتز پروتئین‌های سیتوپلاسمی متفاوتند. این رمزها برای میتوکندری‌های سلول‌های گیاهی و جانوری نیز تفاوت دارند. ۴ رمز از ۶۴ رمز ممکن، دارای نشانه (مفهوم) متفاوتند؛ برای مثال UGA که رمز پایانی در رمزهای معمولی (و نیز در میتوکندری سلول‌های گیاهی است) در میتوکندری‌های پستانداران و مگس سرکه با تریپتوفان مطابقت دارد، AGA که به‌طور معمول آرژینین را مشخص می‌سازد، رمز پایانی در میتوکندری‌های پستانداران و رمز سرین در میتوکندری‌های مگس سرکه است.

تعداد پروتئین‌های موجود در میتوکندری خیلی بیشتر از پروتئین‌هایی است که می‌توانند به وسیله DNA میتوکندری رمزدار شوند؛ تعدادی از پروتئین‌های میتوکندریی از ماده ژنتیکی هسته سلول رمزدار می‌شوند.

با استفاده همزمان از کلرامفنیکول و اسیدهای امینه نشاندار می‌توان پروتئین‌های میتوکندریی را که به وسیلهٔ رمزهای هسته‌ای سنتز می‌شوند، مشخص ساخت. سیکلوهگزیمید سنتز پروتئین به وسیله ریبوزوم‌های سیتوپلاسم سلول یوکاریوتی را متوقف می‌سازد؛ به کارگیری همزمان سیکلوهگزیمید و اسیدهای امینه نشاندار، پروتئین‌هایی را که به وسیله ریبوزوم‌های میتوکندریی سنتز می‌شوند، مشخص می‌سازد.

برای سنتز برخی پروتئین‌ها همکاری دقیقی بین ماده ژنتیکی هسته‌ای و میتوکندریی وجود دارد. برای مثال مجموعه آنزیمی ATP سنتتاز را نام می‌بریم که از پلی‌پپتیدهایی ساخته شده است که با دخالت هر دو نوع از این اطلاعات ژنتیکی تشکیل شده‌اند.

پروتئین‌هایی که برای ورود به میتوکندری، در سیتوزول تشکیل می‌شوند دارای ترتیب مکمّلی هستند که شناسایی آنها به وسیلهٔ غشاءهای میتوکندریی را امکان‌پذیر می‌سازد (شکل ۱۱-۲۲). این مولکول‌های پروتئینی به‌طور کامل سنتز می‌شوند و بعد به میتوکندری نفوذ می‌کنند، بنابراین از چگونگی سنتز و نفوذ پروتئین‌ها به شبکه آندوپلاسمی کاملاً متفاوتند.

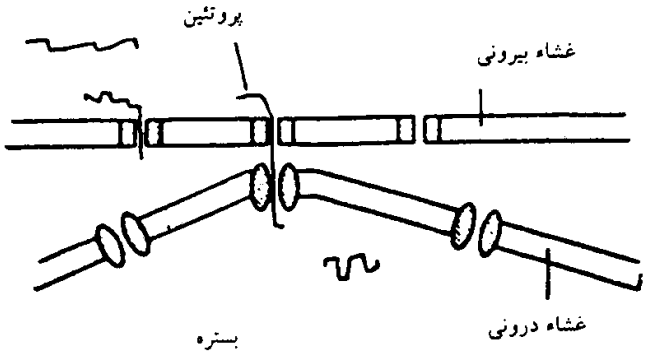


شکل ۱۱-۲۲. اشتراک عمل ماده ژنتیکی هسته‌ای و میتوکندریی

هم‌اکنون تصور می‌شود که برای عبور پروتئین‌ها از غشاءهای میتوکندری دو نوع کانال پروتئینی وجود دارد، یک نوع در غشاء بیرونی و نوع دیگر در غشاء درونی (شکل ۱۱-۲۳). این کانال‌ها به‌طور دایمی به‌هم اتصال ندارند و تنها زمانی که دو غشاء به اندازه کافی به‌هم نزدیک می‌شوند، اتصال بین کانال‌ها برقرار می‌شود. ترتیب تکمیلی نشانه هنگام ورود پروتئین به میتوکندری بریده می‌شود.

گرچه این انتقال پروتئین در جهت سیتوزول به بستره میتوکندری زیاد است، اما به نظر می‌رسد انتقال پروتئین‌هایی در جهت عکس آن نیز وجود دارد.

به دلیل پروتئین‌های زیادی که از سیتوزول به بستره میتوکندری می‌رسند، این اندامک در خارج از قلمرو سلولی قادر به پایداری نیست و به بیانی دیگر، میتوکندری وابستگی زیادی به اطلاعات (رمزهای) هسته‌ای دارد. به همین دلیل میتوکندری‌ها اندامک‌های مستقلی نیستند و آنها



شکل ۱۱-۲۳. انتقال پروتئین از سیتوپلاسم به سوی بستره میتوکندری. انتقال تنها وقتی انجام‌پذیر است که دو غشاء به اندازهٔ کافی به‌هم نزدیک شوند (اقتباس از B.Glick و همکاران، ۱۹۹۱).

را «نیمه مستقل[1]» می‌نامند.

میتوکندری‌ها به ویژه در سنتز پروتئین‌های آب‌گریز فعالند. در عین حال قادر به بیوسنتز همه نوع پروتئین‌های مورد نیاز خود نیستند و برای حدود ۴۰٪ از پروتئین‌های خود به کُدهای هسته‌ای نیاز دارند.

شباهت میتوکندری‌ها با باکتری‌ها

۱- هر دو آنزیم‌های تنفسی و عوامل فسفوریلاسیون را در ساختمان غشاء خود دارند، از این دیدگاه پلاسمالم باکتری‌ها که محل وجود آنزیم‌های تنفسی است با غشاء داخلی میتوکندری‌ها قابل مقایسه است و مزوزوم (چین‌خوردگی پلاسمالم) که در باکتری‌ها محل تراکم آنزیم‌های تنفسی است قابل مقایسه با تیغه‌ها در میتوکندری است.

۲- ریبوزوم هر دو از نوع ۷۰ S است (در پستانداران ۵۵ S).

۳- هر دو دارای قدرت سنتز پروتئین هستند که به وسیله کلرامفنیکول مهار می‌شود. این وضع نشانهٔ تشابه زیاد فرآیندهای سنتز پروتئین در میتوکندری و باکتری است.

۴- هر دو دارای DNA دو زنجیره‌ای حلقوی با وضع نوکلئوئیدی و مقاومت بالای حرارتی هستند. وزن مخصوص نسبی DNA در میتوکندری و در باکتری بالاتر از DNA هسته است.

۵- همانندسازی DNAی هر دو از یک[2] ناحیهٔ آغازی شروع می‌شود و اغلب با روش دو جهتی در دو جهت مختلف ادامه می‌یابد. شروع همانندسازی در DNA هسته از یک نقطه نیست و نقاط متعدد آغازی و مناطق متعدد همانندسازی (رپلیکون‌ها) وجود دارند.

۶- هر دو قدرت تقسیم دارند و با تقسیم ساده (مستقیم) تکثیر می‌شوند.

به دلیل این شباهت‌ها برخی محققین برای میتوکندری‌ها اجداد باکتریی در نظر گرفته‌اند و معتقدند که میتوکندری‌ها در دوران‌های گذشته زمین‌شناسی انواعی از باکتری‌ها بوده‌اند.

میتوکندری‌ها در حکم اندامک‌های نیمه مستقل

در سال‌های اخیر، مشخص شدن این مطلب که میتوکندری‌ها و اندامک‌های دیگر سلول می‌توانند درجاتی از استقلال را داشته باشند، موجب آغاز مرحله کاملاً جدیدی در مطالعه این اندامک‌ها شده است. میتوکندری‌ها دارای DNA و ریبوزوم‌ها هستند و می‌توانند از اسیدهای آمینه پروتئین‌ها را بسازند علاوه بر این میتوکندری‌ها تقسیم می‌شوند و دارای اطلاعات زیستی‌اند، که نوعی از وراثت سیتوپلاسمی است. نخستین سلول‌شناسان فرضیه‌هایی در مورد عمل این اندامک‌ها به‌دست داده‌اند، در سال ۱۸۹۰، آلتمن و چیمپر[3] اصرار داشته‌اند که میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها انگل‌های درون سلولی بوده‌اند که وقتی وارد سیتوپلاسم شده‌اند، با سلول همزیستی برقرار کرده‌اند، با این دید برخی باکتری‌ها را منشأ میتوکندری‌ها دانسته‌اند. آلتمن نام بیوبلاست[4] را به میتوکندری‌ها داده است.

در بسیاری از گونه‌های بررسی شده DNA میتوکندری طول ثابتی حدود ۵μm دارد. در مخمرها و نوروسپورا[5] ابعاد مولکولی بزرگترند، این مطلب موجب این تفکر است که در این جانداران، DNA میتوکندری ممکن است اطلاعات ژنتیکی بیشتری داشته باشد.

تفاوت‌های زیادی DNA میتوکندری را از DNA هسته مشخص می‌سازد. مقدار نسبی GC در DNA میتوکندری بیشتر

1- Semi - autonome

۲- با آگاهی‌های کنونی همانندسازی DNA میتوکندری در ناحیهٔ آغازی دارد.

3- Schimper 4- Bioblast 5- Neurospora

است و در نتیجه، غلظت شناوری آن نیز بیشتر است (رابینوویتز[1] ۱۹۶۸).

اختلاف دیگر این است که گرمایی که موجب تخریب DNA میتوکندری می‌شود بیشتر است و سهولت بازگشت به وضع طبیعی بیشتر خواهد بود. اطلاعات ژنتیکی موجود در DNA میتوکندری برای سنتز تمام پروتئین‌ها و آنزیم‌های موجود این اندامک کافی نیست.

فرضیه‌ای که بیشتر محتمل است، این است که DNA میتوکندری سنتز تعدادی از پروتئین‌های ساختمانی را موجب می‌شود، در حالی که برای سنتز سیتوکروم C و آنزیم‌های دیگر، اطلاعات ژنتیکی هسته ضروری است (ناس Nass ۱۹۶۹).

DNA میتوکندری قدرت همانندسازی دارد و می‌توان آن را کروموزوم میتوکندری در نظر گرفت. تمام میتوکندری‌ها در زمان مضاعف شدن تعدادشان، از تیمیدین تریسیوم‌داری که در اختیارشان باشد استفاده می‌کنند و آن را در ساختمان DNA به کار می‌گیرند به‌علاوه میتوکندری‌ها دارای DNA سنتتازی هستند که از DNA پلی‌مراز هسته‌ای متفاوت است.

منشأ میتوکندری

دو مکانیسم اصلی در مورد ایجاد میتوکندری‌ها مطرح شده است: یکی این که میتوکندری‌ها ممکن است از قالب‌های ساده‌تری ساخته شوند (تشکیل De Novo) و دیگر این که میتوکندری‌های جدید از تقسیم میتوکندری‌های قبلی به وجود می‌آیند. تعداد میتوکندری‌ها در طول میتوز و نیز در انترفاز افزایش می‌یابد. با روش میکروسینماتوگرافی سریع مشخص شده که میتوکندری به‌تدریج طویل شده و بعد به میتوکندری‌های کوچک‌تری تقسیم می‌شود.

چنین تجربه‌ای در نوروسپورا نیز صورت گرفته است. بعد از نشاندار کردن نوروسپورا به وسیله کولین رادیواکتیو، رادیواکتیویته در میتوکندری‌ها در دومین و سومین نسل ردیابی شده است. به وسیله اتورادیوگرافی، مشخص شده که تمام میتوکندری‌های اصلی (اولیه) نشاندار شده‌اند. میتوکندری‌های هر سلول جدید نیز نشاندار بوده است، اما تقریباً نیمی از رادیواکتیویته را داشته‌اند. این نتیجه را به این شکل تفسیر کرده‌اند که میتوکندری‌های تقسیم شده و سپس با افزایش مولکول‌های جدید پروتئین رشد کرده‌اند.

سلول‌های مخمری که در بی‌هوازی رشد کرده‌اند زنجیر تنفسی کاملی ندارند (سیتوکروم b و a را ندارند) در میکروسکوپی الکترونی به‌صورت میتوکندری‌های عادی دیده نمی‌شوند و تنها چند غشایی دارای دو دهیدروژناز اولیه تنفسی می‌باشند. در شرایط هوازی این غشاءها با هم ادغام شده، گسترش یافته و میتوکندری‌های حقیقی‌ای را که دارای سیتوکروم هستند، به وجود می‌آورند.

تاکنون از ساختار غشاءهای داخلی و خارجی میتوکندری‌ها بحث کرده و به شباهت بین غشاء خارجی و شبکه درون سیتوپلاسمی نیز اشاره کرده‌ایم. تجربیات دیگری که به کمک کولین و لوسین رادیواکتیو صورت گرفته است نشان می‌دهد که در غشاء خارجی سنتز فسفولیپیدها فعال‌تر است در حالی که در غشاء داخلی، مقدار پروتئین بارز است. از آنجا که غشاء خارجی میتوکندری‌ها می‌تواند ارتباطی با غشاءهای دیگر درون سلولی داشته باشد عده زیادی از محققین پیوستگی‌هایی را بین میتوکندری‌ها، پوشش هسته و شبکه درون سیتوپلاسمی در نظر گرفته‌اند.

به هر حال هم اکنون در مورد تقسیم دوتایی میتوکندری‌ها و تشکیل میتوکندری‌های جدید توافق عمومی وجود

1- Rabinovitz

دارد و برخی میکروگراف‌های الکترونی نیز این نظر را تأیید می‌کنند.

خاستگاه پروکاریوتی میتوکندری‌ها

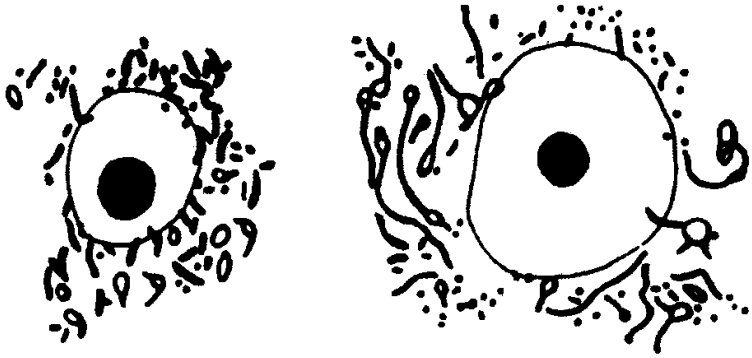
مطالعات بیوشیمیایی سال‌های اخیر و مشخص شدن شباهت‌های بین میتوکندری‌ها و باکتری‌ها، فرضیه‌ای را که سال‌ها قبل به وسیله سلول شناسان مطرح شده وبه موجب آن میتوکندری دارای منشأ باکتریی فرض شده بود را تقویت کرده است. بر بنای این نظر برخی محققان معتقدند که در گذشته بسیار دور، جوّ زمین فاقد اکسیژن بوده و جاندارانی که می‌زیسته‌اند بی‌هوازی بوده‌اند. با گذشت زمان و ضمن واکنش‌های شیمیایی، جوّ زمین دارای اکسیژن شده و به‌تدریج برخی جانداران و به ویژه پروکاریوت‌ها که ساختمانی ساده‌تر داشته‌اند با استفاده از اکسیژن و حالت هوازی سازگار شده‌اند. برخی از سلول‌های یوکاریوتی برای امکان بقای خود، برخی از سلول‌های پروکاریوتیِ هوازی شده را به خدمت گرفته و از این همزیستی سلول‌های یوکاریوتیِ هوازی به وجود آمده‌اند. بنابراین نتیجه می‌گیرند که میتوکندری‌ها اجداد باکتریی داشته‌اند. وجود شباهت‌های اساسی ساختمانی و رفتاری بین میتوکندری‌ها و باکتری‌ها از دلایل تأییدکننده این نظر است. در عین حال تاکنون در بررسی‌های دیرین‌شناسی سنگواره‌های مشخصی از باکتری‌هایی که آنها را به‌عنوان اجداد میتوکندری‌ها مطرح کنند، شناخته نشده است و از سوی دیگر میتوکندری‌ها قادر به بیوسنتز همه نوع پروتئین‌های مورد نیاز خود از جمله سیتوکروم اکسیداز نیستند پس چگونه می‌توانسته‌اند در گذشته زندگی مستقلی داشته باشند. در پاسخ به این سؤال نظر این است که وقتی در جوّ زمین اکسیژنی وجود نداشته است، نیازی هم به برخی ترکیبات کنونی از جمله سیتوکروم اکسیداز نبوده است و همچنین شاید باکتری‌هایی که منشأ میتوکندری‌ها فرض می‌شوند، پس از همزیستی با سلول‌های یوکاریوتی و به اتکاء آنها برخی توانایی‌های خود را از دست داده‌اند.

۱۲ پلاست‌ها[1]

کلیات: پلاست‌ها از اندامک‌های دو غشایی موجود در یاخته‌های گیاهی و نیز عده‌ای از آغازیان مثل جلبک‌ها هستند. این اندامک‌ها نه تنها در تجمع و اندوختن مواد مختلف ذخیره‌ای و رنگیزه‌ها نقش دارند بلکه نوعی از آنها یعنی کلروپلاست‌ها با انجام فتوسنتز و تولید مواد آلی دارای انرژی نهفته‌اند (غذا) و در بقای مصرف‌کنندگان نقش اساسی دارند.

واژه پلاست از کلمهٔ یونانی پلاستوس[2] به معنی «ساخته شده» گرفته شده است. این واژه در سال ۱۸۸۴ به وسیله استراسبورگر پیشنهاد شد. گاهی پلاست را لوسیت[3] نامیده‌اند که از کلمه یونانی لوکُس[4] به معنی «سفید» است (وان‌تیگم[5] ۱۸۸۲). مجموعه پلاست‌ها را پلاستیدوم نامند. پلاست‌ها اندامک‌هایی شبیه به کندریوزوم‌ها هستند که نقش تولیدی آنها با فراهم آوری ترکیبات مختلفی مثل نشاسته، رنگیزه‌ها، پروتئین‌ها و... روشن شده است.

گرچه در برخی یاخته‌ها مثل یاخته‌های جوانِ ساقهٔ علف خوک، پلاست‌ها از نظر ریخت‌شناسی از کندریوزوم‌ها قابل تشخیص هستند (شکل ۱۲-۱) اما در اغلب یاخته‌های جوان، پلاست‌ها و کندریوزوم‌ها شبیه هستند، با هم اشتباه می‌شوند (شکل ۱۲-۲) و تنها طی مراحل تمایز یاخته‌ای از یکدیگر قابل تشخیص می‌گردند.



شکل ۱۲-۱. کندریوزوم‌ها و پلاست‌ها در یاخته‌های ریشهٔ کرچک. در سمت چپ: هسته و ناحیهٔ دور هسته‌ای یک یاختهٔ مریستمی. در سمت راست: همان قسمت‌ها در یک یاختهٔ تمایز یافتهٔ پارانشیم پوستی (برگرفته از گی‌یرمون).

پلاست‌های یاخته‌های بالغ برحسب ماهیت موادی که در خود جمع می‌کنند انواع مختلفی دارند که عبارتند از:

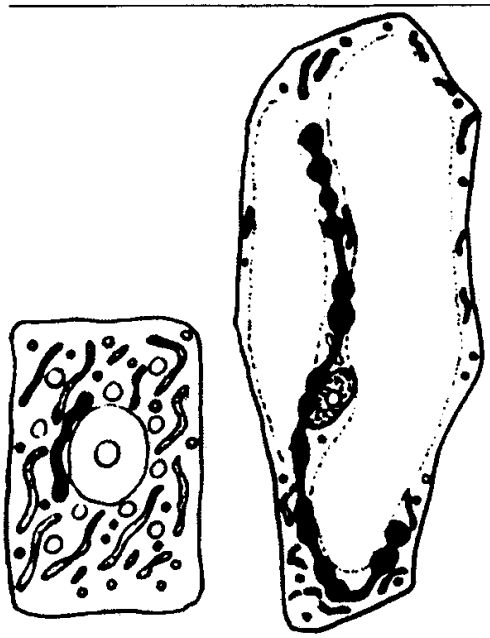
- **کلروپلاست‌ها:** کلروفیل و نشاسته جمع می‌کنند؛
- **آمیلوپلاست‌ها:** نشاسته جمع می‌کنند؛
- کروموپلاست‌ها: حاوی رنگیزه‌های کاروتنوئیدی هستند؛
- **پروتئوپلاست‌ها:** ذرات پروتئینی جمع می‌کنند؛
- **اولئوپلاست‌ها:** لیپیدها را ذخیره می‌کنند؛
- **استرینوپلاست‌ها:** استرول‌ها را ذخیره می‌کنند، و مانند آن.

همه پژوهندگان پلاست‌ها را به‌طور یکسان نامگذاری نکرده‌اند. به نظر بووا (۱۹۶۹) سه دسته پلاست وجود دارد: کلروپلاست‌ها، کروموپلاست‌ها و لوکوپلاست‌های بیرنگ؛ این سه دسته می‌توانند به‌طور موقت و به نحوی برگشت‌پذیر فرآورده‌های ذخیره‌ای پاراپلاسمی را در خود جمع کنند و برحسب ماهیت این فرآورده‌ها، به

1- Plastes 2- Plastos 3- Leucite 4- Locos 5- Vonthigem

آمیلوپلاست‌ها، اولئوپلاست‌ها و یا پروتئوپلاست‌ها تبدیل می‌شوند.

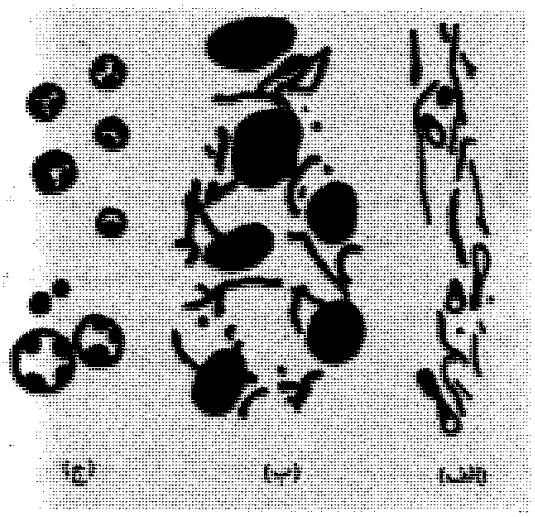
چنانچه تکامل برخی پلاست‌ها در طی تمایز یاخته‌ها دنبال شود، مشخص می‌گردد که گاهی ماهیت پلاست‌ها تغییر می‌یابد. برای مثال در بعضی اندام‌ها، کلروپلاست‌ها یا آمیلوپلاست‌ها به کروموپلاست‌ها تبدیل می‌شوند. اگر به‌طور آزمایشی ریشهٔ جو در مقابل نور قرار گیرد (شکل ۱۲-۳) حجم برخی لوکوپلاست‌ها افزایش می‌یابد و به کلروپلاست‌هایی شبیه پلاست‌های اندام‌های هوایی مبدل می‌شوند، اگر ریشه را به تاریکی برگردانند، اندازهٔ این کلروپلاست‌ها کاهش یافته کلروفیل خود را از دست می‌دهند اما، به جای بازگشت به حالت لوکوپلاست، ذرات کروی کاروتن را می‌سازند و به کروموپلاست‌ها تبدیل می‌شوند (گوتره و گی‌یرمون). بدین سان، چنین نتیجه گرفته‌اند که در واقع تنها یک دسته پلاست وجود دارد که می‌تواند به شکل‌های گوناگون درآید.



شکل ۱۲-۲. یاخته‌های «علف خوک» که یک پلاست (به رنگ سیاه)، کندریوزوم‌ها (به رنگ خاکستری)، ذرات چربی و واکوئل‌ها در آن دیده می‌شود. در سمت چپ: یاختهٔ مریستمی. در سمت راست: یاختهٔ پارانشیم پوستی ساقه (برگرفته از گی‌یرمون و آمبرژه)، با تغییراتی که داده شده است.

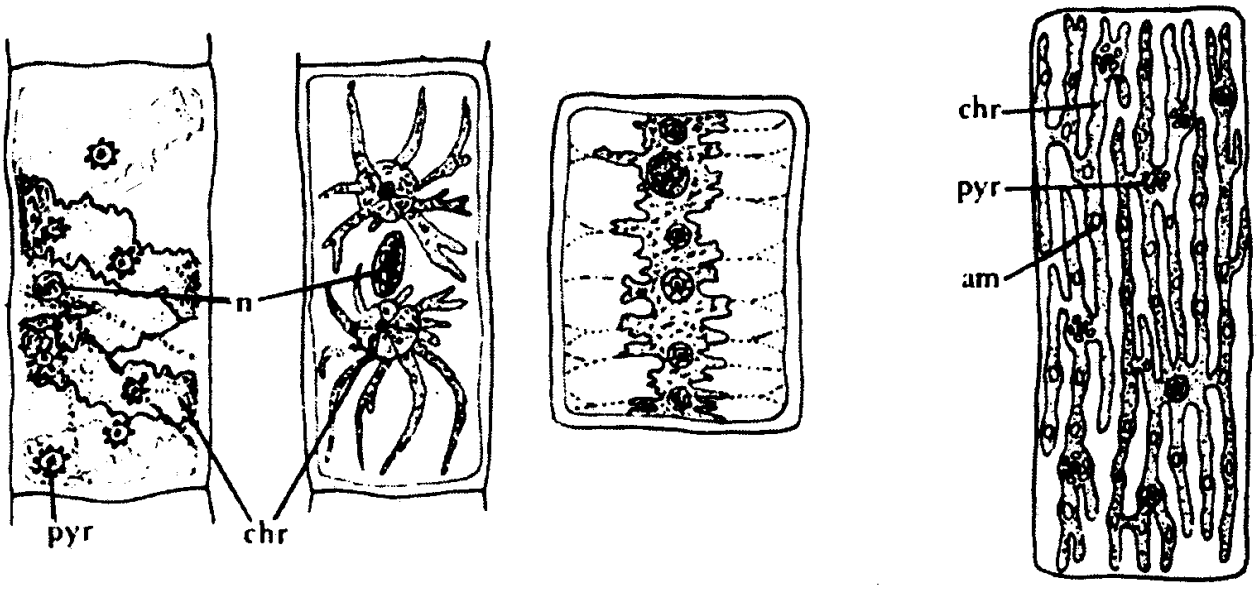
کلروپلاست‌ها

ویژگی‌های ریختی: کلروپلاست‌ها به دلیل داشتن رنگ سبز از اولین اندامک‌هایی هستند که در یاخته‌های گیاهی نظر پژوهشگران را به خود جلب کرده‌اند. ووشر در سال ۱۸۰۳ رده‌بندی جلبک‌های رشته‌ای آب شیرین (کونفروها) را بر بنای شکل ذرات سبز موجود در آنها قرار داد و آنها را به کونفروهای مارپیچی، ستاره‌ای و لوله‌ای تقسیم کرد. در جلبک‌ها کلروپلاست‌ها ساختمان ساده‌تری دارند و اغلب، آنها را کروماتوفور نامند زیرا به تناسب نوع و مقدار رنگیزه‌ای که دارند، به رنگ‌های مختلفی دیده می‌شوند. تنوع ریختی کلروپلاست‌ها در جلبک‌ها زیاد است. برای مثال در جلبک سبز اسپیروژیر کلروپلاست به‌صورت یک نوار مارپیچی در هر یاخته، در مزوکارپوس و اولوتریکس به‌صورت تیغه یا نعلی شکل، در زیگنما ستاره‌ای شکل و در ادوگونیونم مشبک است (شکل ۱۲-۴).



شکل ۱۲-۳. تغییر و تبدیل پلاست‌ها در یاخته‌های ریشهٔ جو. الف - ریشه‌ای که در تاریکی بوده است (لوکوپلاست‌های گویچه‌ای که ذرات کوچک نشاسته را ساخته‌اند و کندریوزوم‌های معمولی قابل تشخیص‌اند). ب - ریشه‌ای که در روشنایی بوده است (لوکوپلاست‌ها برای تشکیل کلروپلاست‌های حجیم بزرگ شده‌اند). ج - ریشهٔ کلروفیل‌دار که به مدت یک ماه در تاریکی قرار داده شده است (کلروپلاست‌ها به وضع اول بازگشته و به کروموپلاست‌های دارای ذرات کاروتن مبدل شده‌اند) (برگرفته از گوتره).

روی این کلروپلاست‌های حجیم، اغلب ذرات کوچک پروتئینی و پراش دهنده نور مشاهده می‌شود که در اطراف آنها دانه‌های نشاسته جمع شده است. این ذرات



شکل ۱۲-۴. کلروپلاست‌های جلبک‌ها: اسپیروژیر، زیگنما، دراپارنالدیا، ادوگونیوم. Chr: کلروپلاست، (کروماتوفور)؛ Pyr: پیرنوئید؛ n: هسته ؛ am: نشاسته

را پیرنوئید[1] نامند. بسیاری از جلبک‌ها به ویژه انواع متحرک آنها، در سطح کروماتوفور خود منطقه‌ای با رنگیزه کاروتنوئیدی، به رنگ سرخ دارند که آن را استیگما[2] نامند. استیگما گیرنده نور و مسؤل «نورگرایی» است.

در سیانوباکتری‌ها از پروکاریوت‌ها کلروپلاست وجود ندارد. در سیتوپلاسم کناری و رنگین این پروکاریوت‌ها که کروماتوپلاسم[3] نامیده می‌شود، تیغک‌های کم‌وبیش پیچ‌وخم‌داری دیده می‌شود که به موازات سطح یاخته قرار دارند. این تیغک‌ها دارای رنگیزه‌های فتوسنتزی هستند. در باکتری‌های فتوسنتزکننده، این رنگیزه‌ها روی زواید به درون برگشته و کم‌وبیش تیغه‌ای یا گاهی حفره‌ای غشاء یاخته‌ای قرار دارند.

در گیاهان پیشرفته و عده‌ای از جلبک‌های سرخ و قهوه‌ای، کلروپلاست‌ها کروی، بیضوی و یا اغلب عدسی شکل هستند.

اندازه

کلروپلاست‌ها اندازه بسیار متفاوتی دارند. طول آنها از حدود ۲ تا بیش از ۳۰ میکرومتر می‌رسد. در برخی شاخ‌گوزنی‌ها[4] از خزه‌گیان[5] هر یاخته بالغ گامتوفیتی دارای کلروپلاستی بزرگ به طول حدود ۴۰ میکرومتر است.

در گیاهان پیشرفته طول کلروپلاست‌ها ۳ تا ۱۰ میکرومتر، عرض آنها ۱ تا ۳ و ضخامتشان ۱ تا ۲ میکرومتر است. اندازه کلروپلاست به ویژگی‌های وراثتی، سن یاخته و دیگر ویژگی‌های فیزیولوژیکی یاخته وابسته است. یاخته‌های پلی‌پلوئید، کلروپلاست‌های درشت‌تری از یاخته‌های دیپلوئید دارند. کلروپلاست‌های گیاهانی که در سایه رشد کرده‌اند نسبت به نمونه‌هایی که در آفتاب بوده‌اند، بزرگتر و دارای کلروفیل بیشتری هستند.

رنگ

کلروپلاست‌ها به دلیل داشتن کلروفیل اغلب سبز رنگند اما در برخی شرایط فیزیولوژیکی یا به حسب نوع یاخته و میزان نسبی رنگیزه‌های غیر کلروفیلی ممکن است به رنگ‌های دیگری دیده شوند. در جلبک‌های قهوه‌ای و قرمز، رنگ سبز کلروفیل به وسیله سایر رنگیزه‌ها پوشیده شده است.

1- Pyrenoid 2- Stigma 3- Chromatoplasm 4- Antocerus 5- Bryophytes

تعداد

تعداد کلروپلاست‌ها برحسب نوع یاخته، گونه گیاهی و سن یاخته تغییر می‌کند. در هر یاخته ریسه اسپیروژیر، جلبک اولوتریکس یا ساقه علف خوک یک کلروپلاست، در هر یاخته جلبک زیگنما، دو، در هر یاخته پارانشیم اسفنجی برگ بیشتر نهاندانگان حدود ۳۰ و در یاخته‌های پارانشیم نرده‌ای این گیاهان حدود ۱۰۰ کلروپلاست وجود دارد. در یاخته‌های پارانشیم اسفنجی و نردبانی برگ اسفناج این تعداد به ترتیب حدود ۲۰۰ تا ۳۰۰ و ۳۰۰ تا ۴۰۰ می‌باشد. تعداد کلروپلاست‌ها در هر میلیمتر مربع برگ کرچک به حدود ۴۰۰۰۰۰ می‌رسد. یک درخت ممکن است تا 10^{14} کلروپلاست داشته باشد.

محل

کلروپلاست‌ها در یاخته‌های جلبک‌ها و گیاهان مختلف در بخش‌های مختلف یاخته قرار می‌گیرند به‌طور معمول در بخش‌های کناری یاخته که امکان دریافت نور بیشتر است، فراوانی بیشتری دارند. در برخی جلبک‌های شاخه کریزوفیتا[1] کریپتوفیتا و فئوفیتا[2] کلروپلاست‌ها به وسیله شبکه آندوپلاسمی احاطه شده‌اند (شبکه آندوپلاستی کلروپلاستی) و چهار غشایی به نظر می‌رسند.

تحرک

کلروپلاست‌ها اندامک‌هایی فعال‌اند و دو نوع جنبش و حرکت دارند. حرکات و جابه‌جایی‌هایی که همراه جنبش‌های درونی یاخته و سیکلوز است (حرکات غیرفعال[3]) و حرکات هدف‌دار و همراه با خرج ATP که به تغییرات شرایط فیزیولوژیکی و میزان تابش نور به یاخته‌ها بستگی دارد. در تجربیات مختلفی، جابه‌جایی، تغییر شکل و تغییر ابعاد فعّال کلروپلاست‌ها با تغییر عوامل محیطی به ویژه شدت نور مشخص شده است. تابش نور به کلروپلاست‌های جدا شده از برگ اسفناج موجب کاهش حجم مشخص آنها و شروع فتوفسفوریلاسیون می‌شود. این اثر برگشت‌پذیر است. در تاریکی انقباض کلروپلاست‌ها را می‌توان با افزودن ATP القا کرد. از کلروپلاست‌های جداشده، پروتئین‌های قابل انقباض استخراج شده که ممکن است در پدیده انقباض کلروپلاست‌ها دخالت داشته باشند.

ساختمان درونی و فراساختار کلروپلاست

در ساختمان کلروپلاست‌ها سه بخش اصلی شامل پوش پلاستی، ماده زمینه (استروما) و ساختمان‌های غشایی درونی قابل تشخیص است.

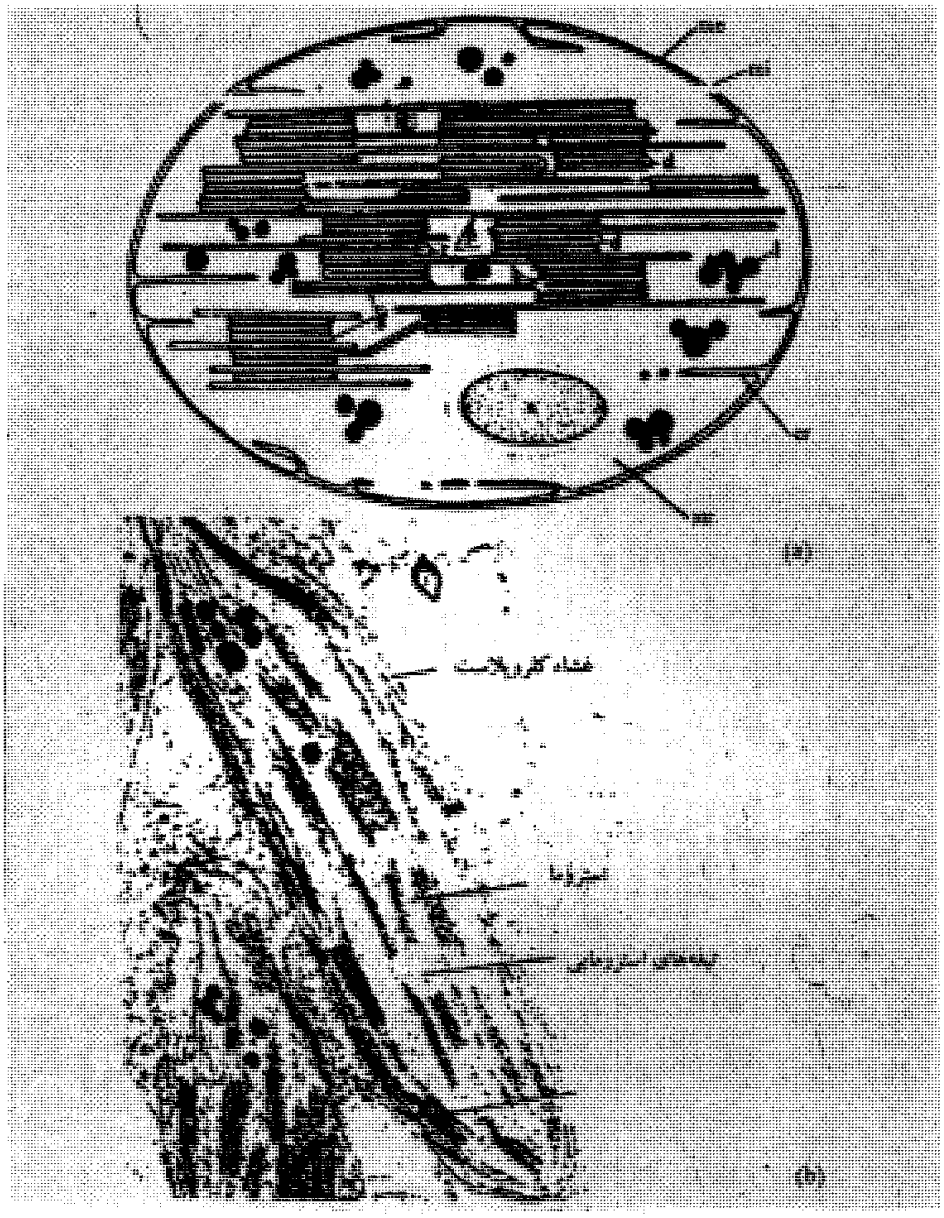
پوشش پلاستی: شامل غشاء خارجی، فضای بین دو غشاء یا اطاق خارجی و غشاء داخلی است (شکل ۱۲-۵ الف و ب)

غشاء خارجی کلروپلاست ضخامت متوسط حدود ۶۰ آنگستروم دارد و از نوع غشاءهای زیستی واحد است. این غشاء صاف است، ریبوزوم ندارد و سد بین سیتوزول و درون پلاست است.

اطاق خارجی یا فضای بین دو غشاء وسعت متوسط حدود ۱۰۰ تا ۲۰۰ آنگستروم دارد و از مایعی دارای آب، ترکیبات مختلف آلی، مقدار کمی نمک‌های کانی و یون‌های حاصل از آنها پرشده است.

غشاء داخلی ویژگی‌های عمومی شبیه غشاء خارجی دارد. ضخامت متوسط آن حدود ۶۰ آنگستروم است. گرچه غشاء داخلی می‌تواند چین‌خوردگی‌هایی را به درون پلاست داشته باشد اما نظریه کنونی بر این است که سیستم غشایی درونی کلروپلاست اساساً مستقل از غشاء داخلی است.

1- Crysophyta 2- Phaeophyta 3- Passive movements



شکـــل ۱۲-۵. فراساختار کلروپلاست گیاهان عالی. a) طرح سادهٔ فراساختار کلروپلاست گرانایی. me: غشای درونی با تیغه‌ها (cr). str: استروما، حاوی حفره‌های نشاسته‌دار(a). g: چین‌خوردگی‌های کیسه‌های گرانایی. ig: منطقهٔ بین گرانایی. P: سوراخ‌دار شدن تیغک‌ها. r: تشکیلات گرانایی حاصل از چین خوردن تیغک. d: تشکیلات گرانایی حاصل از دوتا شدن تیغک. b: تشکیلات گرانایی حاصل از انشعاب تیغک. I: لیپیدها (برگرفته از بووا). b) ریزنگار الکترونی کلروپلاست و فراساختار آن.

مـاده زمینه یا استروما اطاق درونی کلروپلاست را پر کرده است. در استروما اجزای قابل رؤیت با میکروسکوپ‌های الکترونی مثل سیستم غشاءهای درونی، مولکول‌های DNA مشابه با DNA پروکاریوت‌ها و با حالت نوکلئوئیدی، ریبوزوم‌های نوع ۷۰s با قطر حدود ۱۷۰ آنگستروم (پلاستوریبوزوم) به حالت منفرد یا پلی‌زوم و ذرات متراکم به نام اسمیوم دیده می‌شود. این ذرات یا پلاستوگلبول‌ها با اندازه حدود ۳۰۰ تا ۵۰۰ آنگستروم، غنی از ترکیبات لیپیدی به ویژه ماده محلول در چربی پلاستوکینون هستند. پلاستوگلبول‌ها در مرحله تشکیل تیلاکوئیدها بسیار کم هستند ولی وقتی که تیلاکوئیدها به دلایل مختلف از جمله پیری یا تاریکی تجزیه می‌شوند فراوان‌ترند.

در استروما اغلب ذرّه (ذرات) نشاسته نیز وجود دارد. به‌طوری که خواهیم دید استروما دارای آنزیم‌های مختلف از جمله آنزیم‌های واکنش‌های مرحله تاریکی فتوسنتز و آنزیم‌های لازم برای بیوسنتز پروتئین‌ها است.

پس از شرح کلی فراساختار کلروپلاست به بررسی ویژگی‌ها و نقش پوش پلاستی و سیستم غشایی درونی پلاست توجه می‌کنیم.

پوش کلروپلاست و تبادل مواد از آن

بررسی کلروپلاست‌ها با میکروسکوپ‌های الکترونی گذاره نشان داد که این اندامک‌ها توسط دو غشاء متمایز، احاطه می‌شوند که آنها را بر روی هم پوش کلروپلاستی نامند. این پوش جایگاه سنتز برخی از اجزای غشایی است و در انتقال تعداد زیادی از متابولیت‌ها شرکت می‌کند. پوش را می‌توان به وسیله شوک اسمزی ملایم و سپس سانتریفوژ کردن آن در ساکارز دارای غلظت ناهمگن جدا کرد. بخش پوش‌های پلاست از پوش‌های تیلاکوئیدی (کیسه‌های غشایی درونی کلروپلاست) سبک‌تر است و در روی آنها قرار می‌گیرد.

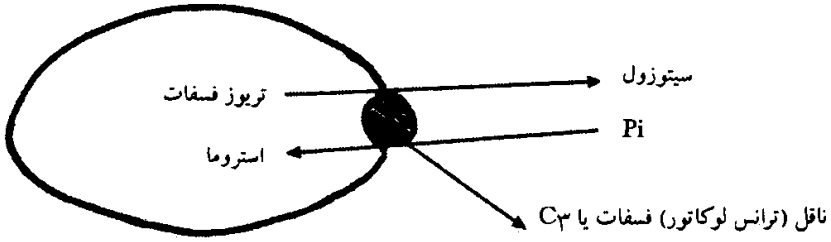
با روش‌های پیشرفته و استفاده از امواج فراصوت و سانتریفوژ کردن‌های مناسب می‌توان پوش خارجی را از پوش داخلی جدا کرد.

رنگ پوش‌های خالص شده به علت وجود کاروتنوئیدها زرد است. این پوش‌ها فاقد کلروفیل، سیتوکروم o، آنزیم‌های اکسایشی و کاهشی می‌باشند. پوش کلروپلاستی محل سنتز و تجمع گالاکتولیپیدهای غشایی، α - توکوفرول و کاروتنوئیدها می‌باشد. ترکیب بخش پلی‌پپتیدی پوش با تیلاکوئیدها و استروما متفاوت است. با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید و نقش شوینده‌ها، مشخص شده که پوش کلروپلاستی دارای ۷۵ نوع پلی‌پپتید است که برخی از آنها مسئول تنظیم تبادل متابولیت‌ها از پوش می‌باشند و عده‌ای در حفظ ساختمان غشاء نقش دارند. پوش هم به‌عنوان سد جداگر و هم به‌عنوان عامل مؤثر در تنظیم مبادلات بین سیتوزول و استروما عمل می‌کند.

غشاء خارجی: در حکم یک غربال مولکولی است و نسبت به اجزای باردار مثل فردوکسین، NADP، $NADH^+$، استیل کوآنزیم A، پیروفسفات، بسیاری از قندهای فسفات‌دار، کاتیون‌های کوچک مثل Na^+ و Mg^{++} و نسبت به ساکارز و سوربیتول، تقریباً غیرقابل نفوذ است.

مولکول‌های بدون بار مثل CO_2، O_2، اسیداستیک، اسیدپیرورویک و گلیسرول می‌توانند از غشاء درونی انتشار پیدا کنند. عبور اجزای باردار مثل پیروفسفات، تریوزفسفات، ATP و آنیون‌های دی‌کربوکسیلاتی (مالات، اسپارتات، اکسالواستات و مانند آن) از غشاء درونی تنها با حضور ناقل‌های ویژه موجود در پوش (ترانس لوکاتورها[1]) امکان‌پذیر است.

از بین این ناقل‌ها، عامل پروتئینی انتقال فسفات (ترانس لوکاتور فسفات یا C_3) که عبور تریوزفسفات از استروما به سیتوزول را در تبادل با پیروفسفات (Pi) به سوی درون استروما امکان می‌دهد، بهتر و با جزئیات بیشتری مطالعه شده است (شکل ۱۲-۶). وجود چنین مبادلات متقابلی برای تولید ساکارز در سیتوزول ضرورت دارد. در این انتقال، ناقل، یک پروتئین آنیونی دو ظرفیتی است که جایگاه‌های فعال آن را گروه‌های سولفوریل تشکیل می‌دهند.



شکل ۱۲-۶. نمای ناقل فسفات که عبور تریوزفسفات از استروما به سیتوزول را در تبادل با پیروفسفات به استروما امکان‌پذیر می‌سازد.

برای تبادل دو طرفی، تریوزفسفات به این پروتئین متصل می‌شود و موجب تغییر آرایش ساختمان آن می‌گردد: پس از آن ناقل آماده پذیرفتن Pi شده و با اتصال Pi، کانال انتقال برای مبادله تریوزفسفات به طرف سیتوزول و Pi به

1- translocators

طرف استروما باز می‌شود. علاوه بر این در شرایط نوری با شروع مرحله نوری فتوسنتز، مقداری H^+ از استروما به درون روزن تیلاکوئیدها منتقل می‌شود به‌طوری که PH استروما بالا می‌رود. برای جبران کاهش پروتون در استروما لازم است مقداری H^+ از سیتوزول به استروما منتقل گردد. ایفای چنین نقشی به عهده آنزیم‌آزهای موجود در غشاء درونی کلروپلاست است (شکل ۱۲-۶).

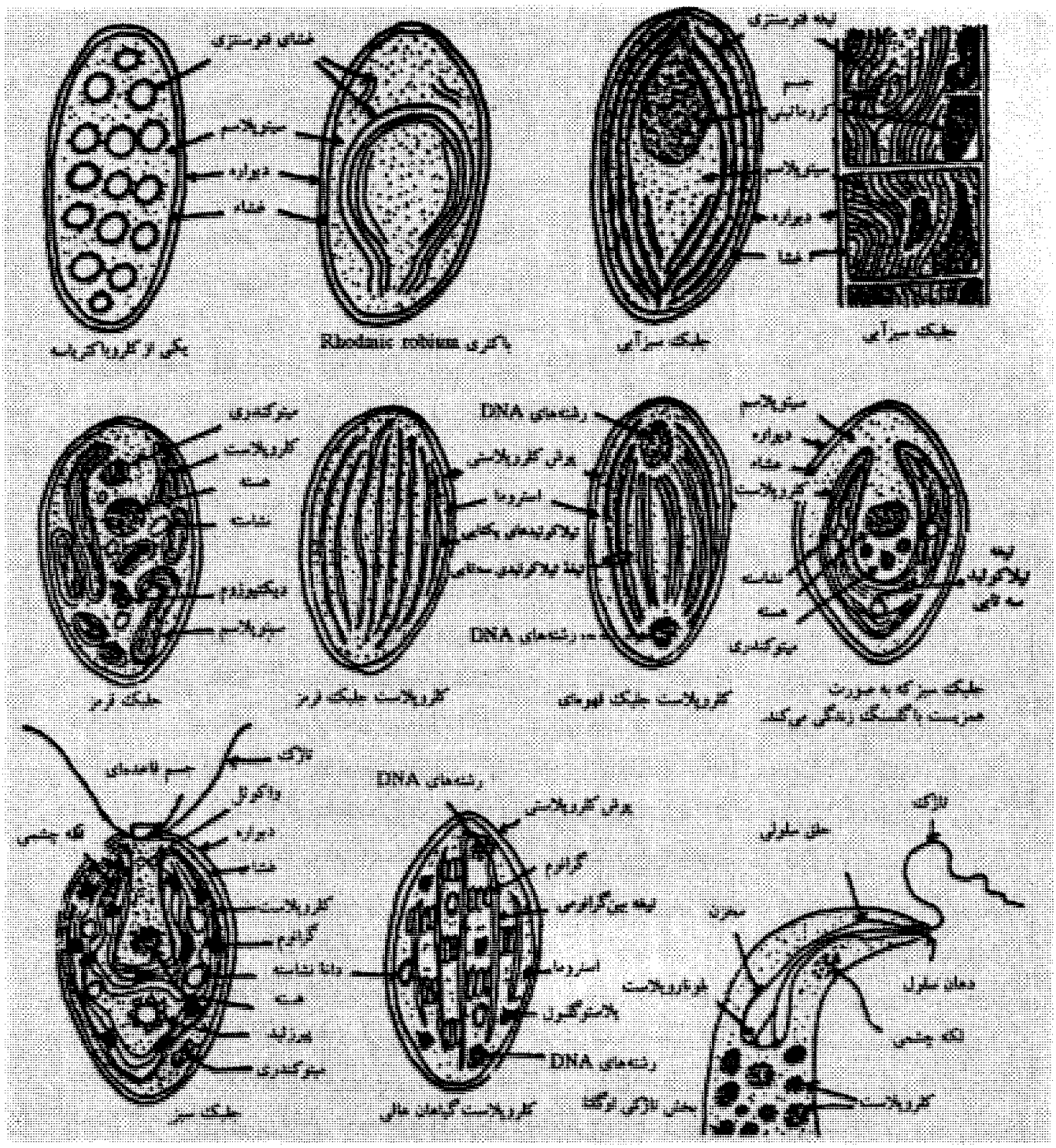
ویژگی‌های سیستم غشایی درونی کلروپلاست

در استرومای کلروپلاست‌ها، ساختمان‌های غشایی زیادی وجود دارند که مقدار آنها و نوع آرایششان به حسب نوع گیاه، سن و ویژگی‌های فیزیولوژیکی یاخته‌ها متفاوت است. در گیاهان پیشرفته که این تیغه‌های غشایی سازمان یافتگی بیشتری دارند (شکل ۱۲-۵)، آنها را به تیغه‌های گرانومی، بین‌گرانومی و استرومایی تقسیم می‌کنند. در تقسیم‌بندی‌های جدید مجموعه تیغه‌های بین‌گرانومی و تیغه‌های آزاد در استروما را تیغه‌های استرومایی می‌نامند. بررسی‌هایی که با میکروسکوپ‌های الکترونی انجام شده نشان می‌دهد که، در بخش‌هایی از استروما عده‌ای از ساختمان‌های غشایی برهم منطبق شده به حالتی شبیه سکه‌های روی هم درآمده‌اند. هر یک از این مجموعه‌ها را که می‌تواند از ۵ تا ۶۰ کیسه غشایی منطبق برهم داشته باشد، گرانوم[1] می‌نامند. مجموعه گرانوم‌های موجود در هر کلروپلاست را گرانا[2] گویند. تعداد گرانوم‌ها در پلاست‌ها متفاوت است و در گیاهان عالی به‌طور متوسط به ۴۰ تا ۶۰ می‌رسد.

از ۱۹۳۷، فری‌ویسلینگ با استفاده از میکروسکوپ پلاریزان نشان داد که هر گرانوم از تیغه‌های غشایی[3] موازی و منطبق برهم تشکیل شده است. مطالعه با میکروسکوپ الکترونی T.E.M نشان داد که تیغه‌های مذکور از حبابچه‌ها[4] یا کیسه‌های[5] خوابیده و بسته‌ای تشکیل شده‌اند. کیسه‌های مذکور را ساکول[6] یا تیلاکوئید[7] می‌گویند.

واژه تیلاکوئید از کلمه تیلاکوس[8] به معنای کیسه گرفته شده است. تیلاکوئیدها در درون یک زمینه پروتئینی آب‌گریز یعنی استروما قرار گرفته‌اند. در برش عرضی، هر تیلاکوئید دارای دو غشاء موازی و یک فضای درونی است. در نهاندانگان، تیلاکوئیدها بر دو نوعند: تیلاکوئیدهای بلند که موازی با محور بزرگ کلروپلاست قرار دارند و تیلاکوئیدهای کوتاه که عموماً قرصی شکلند و از روی‌هم قرار گرفتن آنها دانه‌های گرانوم به وجود می‌آید. همین دانه‌هاست که قبلاً با میکروسکوپ نوری مشاهده شده‌اند. تیلاکوئیدهای نوع اول را تیلاکوئیدهای استرومایی و تیلاکوئیدهای نوع دوم را تیلاکوئیدهای گرانومی می‌گویند. پهنای تیلاکوئیدهای استرومایی نزدیک به پهنای کلروپلاست و قطر تیلاکوئیدهای گرانومی ۳۰ تا ۶۰ نانومتر است. مجموعه این سیستم غشایی در درون یک ساختمان غشایی به نام پوش کلروپلاستی[9] قرار دارند. آرایش تیلاکوئیدها در گروه‌های مختلف گیاهی متفاوت است (شکل ۱۲-۷). ساده‌ترین آرایش در جلبک‌های قرمز[10] دیده می‌شود که در آنها تیلاکوئیدها جدا از هم و تقریباً موازی با هم قرار دارند. در سطح خارجی این تیلاکوئیدها دانه‌های فیکوبیلین - پروتئین یا فیکوبیلیزوم که ۳۰ تا ۴۰ نانومتر قطر دارند وجود دارد. بعد از جلبک‌های قرمز ساده‌ترین آرایش در جلبک‌های کریپتوموناد دیده می‌شود (این جلبک‌ها از کریپتوفیت‌ها هستند) که در آنها تیلاکوئیدها عموماً به‌صورت دستجات دوتایی وجود دارند. در سایر جلبک‌ها، به استثنای برخی از کلروفیتا، تیلاکوئیدها عموماً به‌صورت دستجات سه‌تایی دیده می‌شوند (در فئوفیتا، تیلاکوئیدها دستجات ۳ تا ۷ تایی تشکیل می‌دهند). در اکثر گونه‌های کلروفیتا، آرایش تیلاکوئیدها شبیه به کلروپلاست‌های گیاهان عالی است (شکل ۱۲-۷). سیستم غشایی کلروپلاست باعث تشکیل سه منطقه جداگانه در

1- granum 2- grana 3- Lamella 4- Vesicles 5- Sacs
6- Sacule 7- Thylacoid 8- Thylacos 9- Chlroplast envelope
10- Rhodophceae



شکـــل ۱۲-۷. ساختار کلروپلاست در گروه‌های مختلف موجودات فتوسنتزی (باکتری‌ها، جلبک‌های سبزآبی، جلبک‌های قرمز، جلبک‌های قهوه‌ای، جلبک‌های سبز، گیاهان عالی).

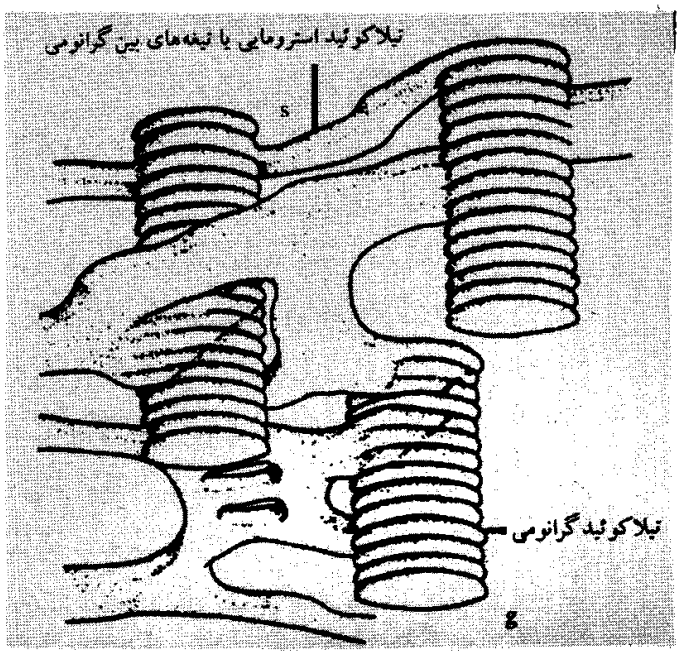
این اندامک می‌شود: منطقه‌ای که بین دو غشاء تشکیل دهندهٔ پوش کلروپلاستی قرار دارد و فضای بین غشایی نامیده می‌شود، منطقه‌ای که به وسیله غشای داخلی احاطه شده و استروما نام دارد، منطقه‌ای که به غشاء تیلاکوئیدی محدود شده، فضای درون تیلاکوئیدی[1] یا لانه یا روزن[2] نام دارد.

در تیلاکوئیدهای استرومایی، سوراخ‌های کم‌وبیش بزرگی وجود دارد. بزرگی این سوراخ‌ها طوری است که تیلاکوئیدهای مذکور اغلب به لوله‌های باریک یا صفحات مشبک تبدیل می‌شوند. لوله‌های تیلاکوئیدی می‌توانند

1- intrathylacoid Space 2- Lumen

روزن‌های بعضی از تیلاکوئیدهای گرانومیِ یک گرانوم را به روزن‌های بعضی از تیلاکوئیدهای گرانومیِ گرانوم دیگر وصل کنند و یا در درون یک گرانوم، روزن‌های تیلاکوئیدهای گرانومیِ یک گرانوم را به‌هم متصل می‌سازند.

این امر باعث می‌شود که فضاهای درون تیلاکوئیدی هر کلروپلاست در مجموع سیستم واحدی را تشکیل دهد، سیستمی که غشای تیلاکوئیدی، را از استروما جدا می‌سازد (شکل ۱۲-۸). غشاءهای تیلاکوئیدی با سازمان یافتگی بسیار ویژه خود جایگاه انجام واکنش‌های مرحله نوری فتوسنتز هستند.



شکل ۱۲-۸. دیاگرام، پیوستگی‌های بین تیلاکوئیدهای گرانومی (g) و استرومایی (s)

ترکیب شیمیایی غشاءهای تیلاکوئیدی

غشاء تیلاکوئیدی اساساً یک غشاء زیستی به ضخامت حدود ۵۰ تا ۷۰ آنگستروم با مدل ساختمانی موزائیک سیال است که زیر بنای لیپیدی - پروتئینی دارد. لیپیدها که حدود ۵۰٪ این غشاء را می‌سازند در دو لایه نامتقارن قرار دارند. حالت نامتقارن لیپیدها در دو نیمه غشاء از جابه‌جایی لیپیدها و پروتئین‌ها از یک لایه به لایه دیگر جلوگیری می‌کند. لیپیدهای تیلاکوئیدی مجموعه پیچیده‌ای را تشکیل می‌دهند که ۸۰٪ آن راگلیکولیپیدهای همراه گالاکتوز، ۱۰٪ فسفولیپیدها و ۵۰٪ را سولفولیپیدها تشکیل می‌دهند. اسیدهای چرب موجود در غشاءهای تیلاکوئیدی که از محصولات چرخه کالوین در استرومای پلاست هستند، تا حد زیادی اشباع نشده‌اند. اسیدلینولنیک[1] ($C_{18:3}$) اسید چرب غالب و اسیدترانس ۳- هگزادکانوئیک ($C_{16:3}$) اسیدچرب شاخص غشاءهای تیلاکوئیدی است که به احتمال نقش ساختمانی دارد. وجود مقدار قابل توجهی از این دو اسیدچرب غیراشباع، برای سیالیّت اهمیت زیادی دارد و موجب تسهیل حرکت ترکیبات پروتئین - رنگیزه‌ها می‌شود.

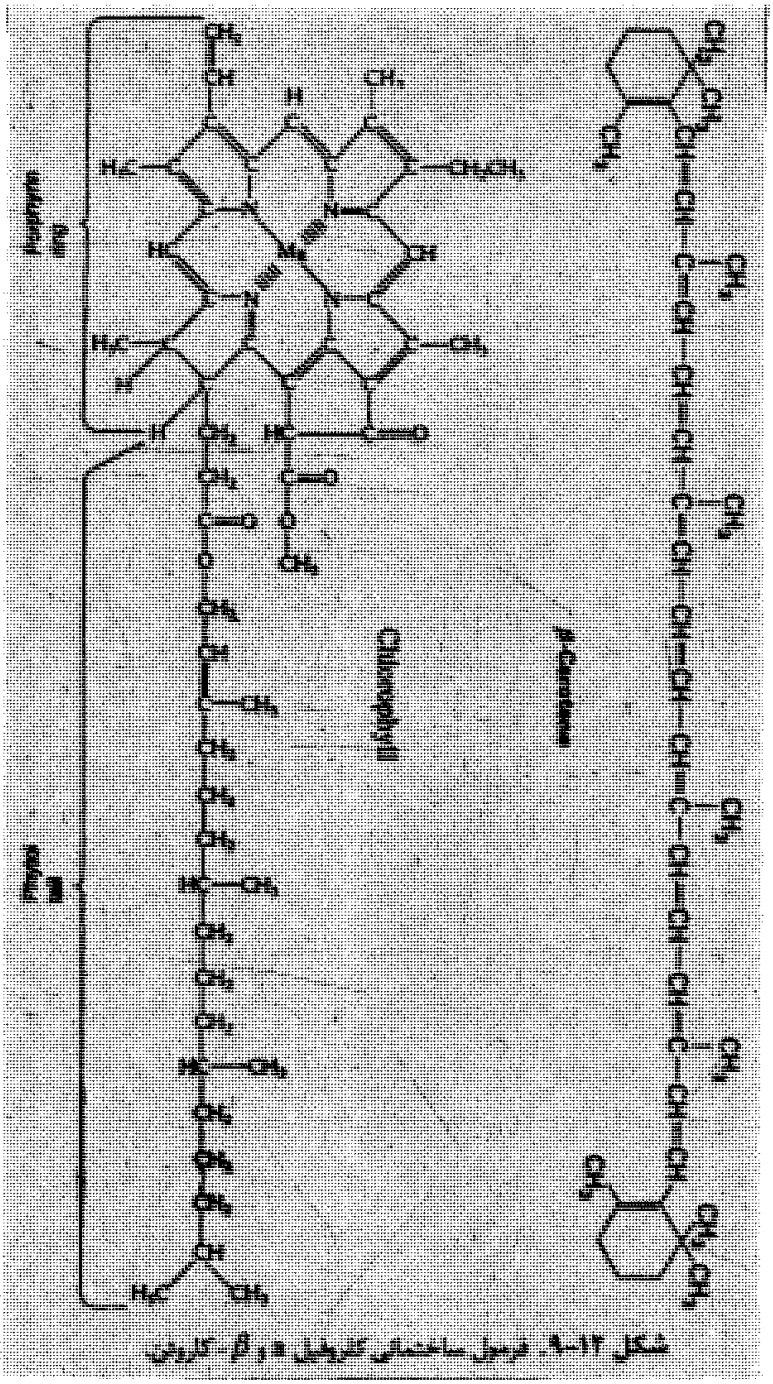
غشاءهای تیلاکوئیدی دارای نیمی از لیپیدهای کلروپلاست‌اند و در بین بخش لیپیدی این غشاء مولکول‌های بسیار مهمی مثل کلروفیل، کاروتنوئیدها، پلاستوکینون‌ها و دیگر عوامل تشکیل دهنده فتوسیستم I و فتوسیستم II که در فتوسنتز شرکت دارند، جاگرفته‌اند. یکی از ترکیبات مهم غشاءهای تیلاکوئیدی کلروفیل است. کلروفیل مولکول نامتقارنی است دارای یک سر آب‌دوست و یک زنجیره فیتولی آب‌گریز. سر آب‌دوست آن از چهار حلقه پیرولی تشکیل شده که به یکدیگر پیوسته و یک حلقه پورفیرینی را می‌سازند (شکل ۱۲-۹).

این بخش از مولکول کلروفیل شبیه برخی رنگیزه‌های یاخته‌های جانوری (هموگلوبین و سیتوکروم) است. در مولکول کلروفیل یک اتم Mg وجود دارد که با چهار حلقه پیرولی یک مجموعه را تشکیل می‌دهد (رنگیزه‌های یاخته‌های جانوری به جای Mg، اتم Fe یا Cu وجود دارد). زنجیر فیتولی آب‌گریز کلروفیل به یکی از حلقه‌های پیرولی چسبیده است (شکل ۱۲-۹). در گیاهان کلروفیل‌دار و نیز در جلبک‌ها و باکتری‌های فتوسنتزکننده انواع مختلفی از کلروفیل (بیش از ده نوع) شناخته شده که بین آنها کلروفیل a و b فراوانی نسبی بیشتری دارند. در کلروفیل b

1- Linolenique

یک گروه CHO – به جای گروه CH_3 – که بر روی یکی از حلقه‌های پیرولی قرار گرفته است وجود دارد (شکل ۱۲-۹).

از رنگیزه‌های مهم کاروتنوئیدی که همراه کلروفیل در کلروپلاست‌ها وجود دارد، کاروتن ($C_{40}H_{56}$) و گزانتوفیل ($C_{40}H_{56}O_2$) است. کاروتن رنگ قرمز نارنجی دارد و گزانتوفیل زرد است. رنگ این رنگیزه‌ها در کلروپلاست به وسیله رنگ سبز کلروفیل پوشیده می‌شود. در پاییز که مقدار کلروفیل کاهش می‌یابد، رنگیزه‌های دیگر قابل مشاهده می‌گردند. مولکول‌های کلروفیل در غشاء تیلاکوئیدها با پروتئین‌های غشاء و رنگیزه‌های کاروتنوئیدی پیوستگی زیادی دارند و از مجموعه‌هایی از آنها فتوسیستم‌های I و II سازمان می‌یابند.



شکل ۱۲-۹. فرمول ساختمانی کلروفیل a و β-کاروتن

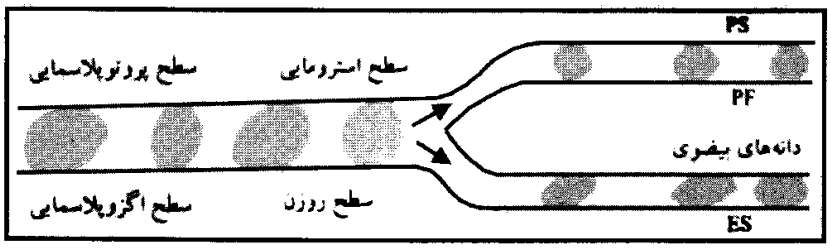
ویژگی‌های فراساختاری غشاءهای تیلاکوئیدی

اجزای تشکیل دهنده غشاء تیلاکوئید در تیلاکوئیدهای گرانومی و استرومایی یکسان نیست، حتی بخش‌های مختلف یک تیلاکوئید نیز ساختمان همگنی ندارد. در این بحث به ویژگی‌های فراساختاری غشاء تیلاکوئید گرانومی که محل اصلی واکنش‌های مرحله نوری فتوسنتز است توجه می‌کنیم.

بخش‌های سازنده غشاء تیلاکوئید گرانومی با استفاده از فنّ انجماد و شکستگی[1] شناخته شده است. شکل ۱۲-۱۰ که مدلی از غشاء تیلاکوئید است نشان می‌دهد که در یک غشاء دو لایه عوامل سازنده فتوسیستم II و کمپلکس جذب‌کننده نورِ وابسته به آن، به‌صورت ذرات درشت به طرف سطح داخلی (سطح روزنی) و عوامل سازنده فتوسیستم I به‌صورت ذراتی کوچک‌تر به طرف سطح خارجی (سطح پروتوپلاسمی) قرار دارند.

به‌طور کلی به کمک ذرات درون غشایی می‌توان دو لایه یا دو برگچه حاصل از انجماد – شکستگی را از هم تشخیص داد، ذرات کوچک‌تر که کروی شکلند و قطری حدود ۸۰ تا ۱۰۰ آنگستروم دارند چسبیده به برگچه خارجی (برگچه پروتوپلاسمی) که به طرف استروماست باقی می‌مانند و ذرات درشت‌تر و بیضی شکل با قطر ۱۲۰ تا ۱۶۰ آنگستروم به برگچه اکزوپلاسمی یا برگچه به سوی درون تیلاکوئید چسبیده‌اند (شکل ۱۲-۱۰).

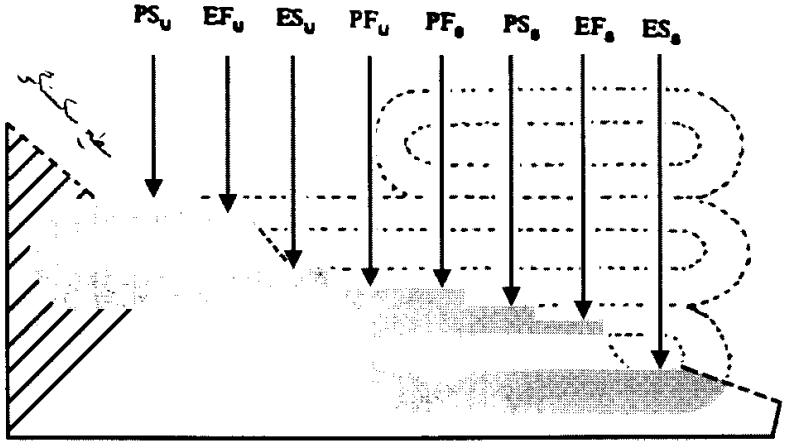
1- freeze fructuring



شکل ۱۲-۱۰. نمایی از دو برگچه غشاء تیلاکوئید و ذرات درونی آنها

تراکم ذرات درون سلولی غشایی دو برگچه نیز متفاوت است. در اسفناج، در برگچه پروتوپلاسمی ۳۵۰۰ دانه و در برگچه اکزوپلاسمی ۶۰۰ دانه در هر میکرومتر مربع مشاهده می‌شود.

پراکنش دانه‌های درون غشایی برحسب منطقه نیز با هم تفاوت دارد. در تیلاکوئیدهای استرومایی تعداد دانه‌های بزرگ بیضی شکل کم است، در تیلاکوئیدهای گرانومی زیاد است و گاهی به‌صورت توده‌های متراکمی وجود دارند. عدم تقارن و تفاوت ساختاری بین غشاء تیلاکوئیدی استرومایی و غشاء تیلاکوئیدی گرانومی با استفاده از روش رنگ‌آمیزی منفی نیز تأیید شده است. با استفاده از روش انجماد و شکستگی مشخص شده که غشاء تیلاکوئید از دو نیمه یا دو برگچه[1] به نام‌های نیمه پروتوپلاسمی (P) و نیمه اکزوپلاسمی (E) تشکیل شده است. هر برگچه دارای یک سطح واقعی یا طبیعی (S) و یک سطح حاصل از شکستگی (F) است. بنابراین (PS) سطح واقعی و (PF) سطح شکستگی برگچه پروتوپلاسمی را معرفی می‌کند. (ES) سطح واقعی و (EF) سطح شکستگی برگچه پروتوپلاسمی را مشخص می‌سازد. هر یک از این سطوح برحسب این که در تیلاکوئیدهای مجتمع (گرانومی) و یا منفرد (استرومایی) واقع شده باشند، به ترتیب با افزودن علامت (S) (از غشاهای مجتمع[2]) و U[3] مشخص می‌گردند. طرح زیر علایم مربوط به سطوح مختلف را نشان می‌دهد (شکل ۱۲-۱۱).



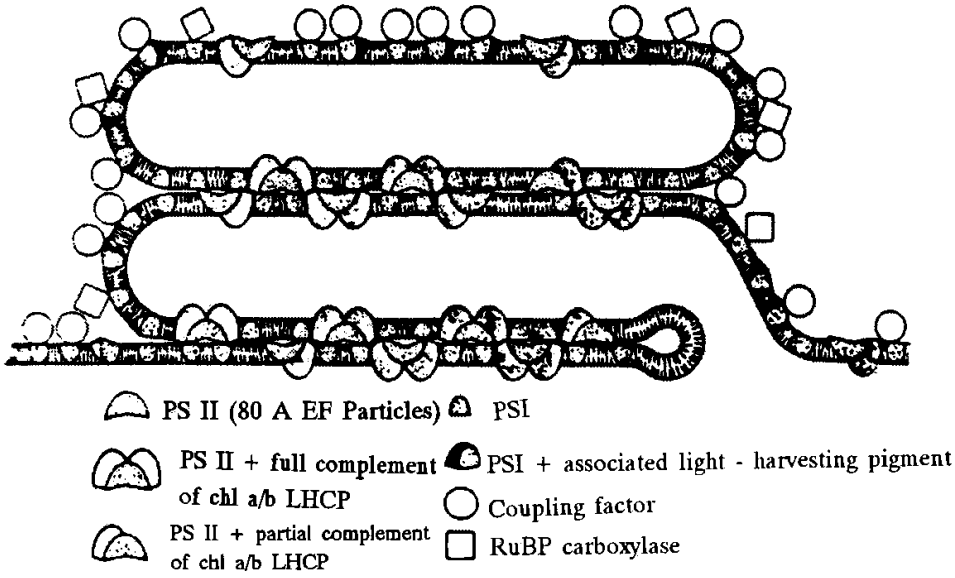
شکل ۱۲-۱۱. سطوح متفاوت غشاءهای تیلاکوئیدی و نامگذاری آنها.

غشاء تیلاکوئیدی مانند تمام غشاءهای سلولی نامتقارن است. پراکنش لیپیدها در برگچه‌های آن یکسان نیست و پروتئین‌ها محل دقیقی را در درون و یا در روی لایه مضاعف لیپیدی اشغال نمی‌کنند. مشاهده این غشاء با میکروسکوپ الکترونی نیز این عدم تقارن را تأیید می‌کند. بسیاری از پروتئین‌های حاشیه‌ای به سطح استرومایی غشاء متصل شده‌اند:

سازه اتصال CF_1 که بر روی پایه آب‌گریز ATPase کلروپلاستی (CF_0) تثبیت شده، فردوکسین، فردوکسین – $NADP^+$ – ردوکتاز، در روی سطح استرومایی، البته به‌صورت بسیار سست و یک پروتئین استرمایی یعنی ریبولوز ۱ و ۵ بیس فسفات کربوکسیلاز اکسیژناز، نیز به این سطح متصل شده است. به نظر می‌رسد که پلاستوسیانین تنها پروتئین و یا از جمله پروتئین‌هایی است که روی سطح روزنی تیلاکوئیدها قرار گرفته است. کمپلکس‌های کلروفیل

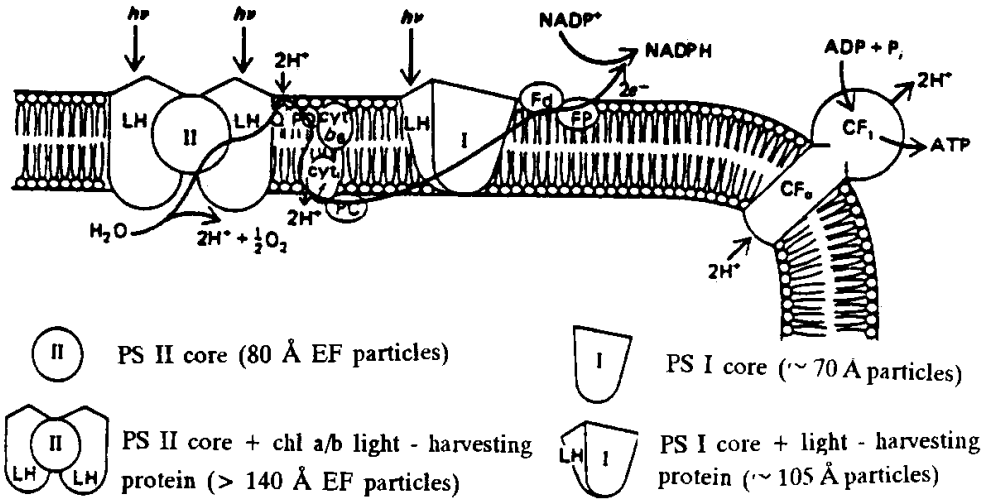
1- leaflet 2- Stacked membrane 3- unstacked membrane

- پروتئین در لایه مضاعف لیپیدی وجود دارند. مولکول‌های کلروفیل همه در یک جهت در غشای تیلاکوئیدی قرار گرفته‌اند: هسته‌های چهار پیرولی، همه به طرف درون تیلاکوئید و یا همه به طرف استروما هستند (شکل ۱۲-۱۲).



شکل ۱۲-۱۲. طرحی از سازمان مولکولی غشاء تیلاکوئیدی در گیاهان عالی و جلبک‌های سبز را نشان می‌دهد در این شکل عدم تقارن بخش‌های مختلف غشاء مشخص است.

در شکل ۱۲-۱۳ نیز طرحی از فراساختار غشاء تیلاکوئید و جایگاه ATP سنتتاز کلروپلاستی مشخص شده است. برای هر تیلاکوئید گرانومی، ناحیه حاشیه‌ای در پهلوها و نواحی جداگر در حد واسط بین تیلاکوئیدها در نظر گرفته می‌شود.



شکل ۱۲-۱۳. نمایی از وضعیت انتقال الکترون‌ها از منطقه آب به $NADP^+$ که در غشاء تیلاکوئید انجام می‌شود. این دیاگرام شامل الکترون‌هایی است از شمای Z که در آن ترتیب (آرایش) قرار گرفتن ترکیبات غشاء تیلاکوئید را نشان می‌دهد (با تکنیک Freeze Fracture)

مناطق جداگر و حاشیه‌ای گرانوم گروه‌های پروتئینی مشابهی ندارند. مناطق جداگر فاقد ATPase، فردوکسین - $NADP^+$ - ردوکتاز و ریبولوزبیس فسفاتازند. به نظر می‌رسد که این آنزیم‌ها فقط در مناطق حاشیه‌ای گرانوم وجود دارند. این تفاوت‌ها و همچنین عدم تقارن ساختار مولکولی غشای تیلاکوئید، برای وقوع فتوفسفوریلاسیون عامل مهمی محسوب می‌شوند.

واحدهای کلروفیل - پروتئین موجود در غشای تیلاکوئید

پس از خارج کردن کمپلکس‌های کلروفیل - پروتئین از غشاء تیلاکوئیدی با استفاده از پاک‌کننده‌ها و جداسازی آنها به وسیله ژل الکتروفورز مشخص شده است که در غشاء سه بخش وجود دارد که ۹۰٪ کل کلروفیل را به خود

اختصاص می‌دهد: ۱- کمپلکس کلروفیل a، P۷۰۰ یا کمپلکس پروتئین - کلروفیل I که شامل فتوسیستم یک (PSI) و گیرنده‌های (آنتن‌های) کلروفیل a مربوط به آن می‌باشد و به‌طور اختصار CPI نامیده می‌شود. ۲- کمپلکس جمع‌کننده نور که فقط نقش گیرنده (آنتن) دارد، فاقد فعالیت فتوشیمیایی است و به‌طور اختصار LHCP[1] نامیده می‌شود. ۳- کمپلکس کلروفیل - پروتئین (CPII) II که شامل فتوسیستم ۲ (PSII) و کلروفیل a آنتنی آن می‌باشد و به‌طور اختصار CPa یا CPII نامیده می‌شود.

ویژگی‌های کلی هر یک از این کمپلکس‌ها در جدول ۱-۱۲ آمده است:

ساختار مولکولی فتوسیستم‌ها (PSI و PSII)

هر فتوسیستم از تعدادی زیرواحد (جزء) تشکیل شده است. مولکول‌های تشکیل‌دهنده هر زیرواحد عبارتند از: تعدادی مولکول کلروفیل کمین یا اصلی (مولکول‌هایی که در نتیجه تابش پرتوها، یک الکترون از آنها برانگیخته شده و در زنجیره انتقال الکترون قرار می‌گیرد)، رنگیزه‌های کمکی (رنگیزه‌هایی که با دریافت نور، الکترون خود را از دست نمی‌دهند، بلکه انرژی دریافتی را به مولکول کمین هدایت کرده تا در انتقال الکترون مورد استفاده قرار گیرد)، یک مولکول‌دهنده[2] الکترون و یک مولکول گیرندهٔ[3] الکترون (پذیرنده الکترون) در طرفین هر مولکول کمین و بالاخره مولکول‌های پروتئین زمینه که اسکلت زیرواحدها را تشکیل می‌دهند و پایداری رنگیزه‌ها بسته به وجود آنهاست. در PSI مولکول کمین عبارتست از کلروفیل a (Chl_a) جذب‌کننده طول موج ۷۰۰ نانومتر (P۷۰۰) و رنگیزه‌های کمکی عبارتند از حدود ۲۰۰ تا ۴۰۰ مولکول کلروفیل‌های a شامل ۶۶۲ Chl_a، ۶۷۰، ۶۷۷، ۶۸۴، ۶۹۲، کلروفیل b و حدود ۵۰ مولکول کاروتنوئیدها. مولکول‌دهنده در آن پلاستوسیانین (PC) و مولکول گیرندهٔ الکترون، ماده X (پروتئین آهن - گوگرد) است. (در گذشته گاهی گیرنده را فردوکسین می‌دانستند) در PSII مولکول کمین را مولکول کلروفیل a دارای طول موج جذبی در ناحیه ۶۸۰ نانومتر (P۶۸۰) تشکیل می‌دهد و رنگیزه‌های کمکی عبارتند از: حدود ۲۰۰ مولکول کلروفیل‌های a شامل ۶۶۲ Chl_a، ۶۷۰، ۶۷۷، کاروتنوئیدها و کلروفیل b و (یا سایر انواع کلروفیل‌ها به حسب نوع جاندار). مولکول‌دهنده الکترون در آن ماده Z (به احتمال نوعی کلروفیل a) و مولکول گیرنده الکترون Y یا فئوفیتین[4] می‌باشد که دارای ساختمان ۴ پیرولی باز و اغلب وابسته به پروتئین‌ها می‌باشد (مثل فیکواریترین، فیکوسیانین).

نحوهٔ ارتباط در زیرواحدهای هر فتوسیستم (انتقال درون سیستمی)

در این زمینه دو نظریه وجود دارد:

۱- **مدل گودال‌های جداشده:** طبق این مدل رنگیزه‌های کمکی، انرژی جذب شده را فقط به مولکول‌های کمین موجود در زیرواحد خود منتقل می‌کنند (شکل ۱۲-۱۴ الف). وقتی که یک زیرواحد از انرژی اشباع شد، انرژی دریافتی به‌صورت فلورسانس دایم تلف خواهد شد و هیچگونه انتقال انرژی به زیر واحد مجاور نخواهیم داشت (شکل ۱۲-۱۴ ب).

۲- **مدل دریاچه‌ای:** در این مدل رنگیزه‌های کمکی علاوه‌بر این که انرژی را به مولکول کمین زیرواحد خود هدایت می‌کنند، می‌توانند پس از اشباع شدن مولکول کمین، انرژی دریافتی را به زیرواحد مجاور خود هدایت نمایند (شکل ۱۲-۱۴ ج). بنابراین طیف فلورسانس در این مدل بدین نحو است که ابتدا و به دنبال اشباع شدن یک

1- light harvesting complex protein 2- Donor 3- Acceptor 4- Pheophytin

جدول ۱-۱۲. مجموعه‌ای کلروفیل - پروتئین (cp) و کارتنوئیدها در غشاءهای تیلاکوئید گیاهان عالی

نام	علامت اختصاری	تعداد در واحدها	نوع کلروفیل‌ها و نسبت کلروفیل $\frac{a}{b}$	مقدار در صد کل پروتئین	نسبت مولکول کلروفیل به مولکول پروتئین	کارتنوئیدهای اصلی نسبت کارتنوئیدهای $\frac{x}{\beta}$	جرم مولکولی کمپلکس KD جرم آنزیم به حسب KD
کمپلکس کلروفیل پروتئین I	CPI کمپلکس $P_{700}-Chl_a$	۲	$Chl_a-p-700$ $(\frac{a}{b}=1:1)$	۳۰	۱۲	کلروفیل $\frac{x}{\beta}=0.1$	[illegible]
کمپلکس کلروفیل پروتئین II	CPIa CPIV کمپلکس $P_{680}-Chl_b$	۱	$Chl_b-p-680$ $(\frac{a}{b}=0.5)$	۱۰	۵	کلروفیل $\frac{x}{\beta}=0.5$	[illegible] (۳۳)
کمپلکس کلروفیل پروتئین جمع‌کننده نور	LHCPI LHCPII LHCPIII	۲ [illegible]	Chl_a, Chl_b $(\frac{a}{b}=1:1)$	۱۰ ۱۰ ۳۰	۶	لوتئین - نئوکسانتین $(\frac{x}{\beta}=0.1)$	۲۰-۲۲ (۱۶-۲۲) برای [illegible]

زیرواحد، با اتلاف انرژی به‌صورت فلوئورسانس موقّت روبرو هستیم و پس از مدّتی، انتقال انرژی به زیرواحد مجاور شروع شده و بنابراین فلورسانس خاموش می‌شود و پس از اشباع‌شدن کل فتوسیستم دوباره فلورسانس دایم شروع خواهد شد (شکل ۱۲-۱۴ د).

کمپلکس پروتئینی جمع‌کننده نور LHCP[1]

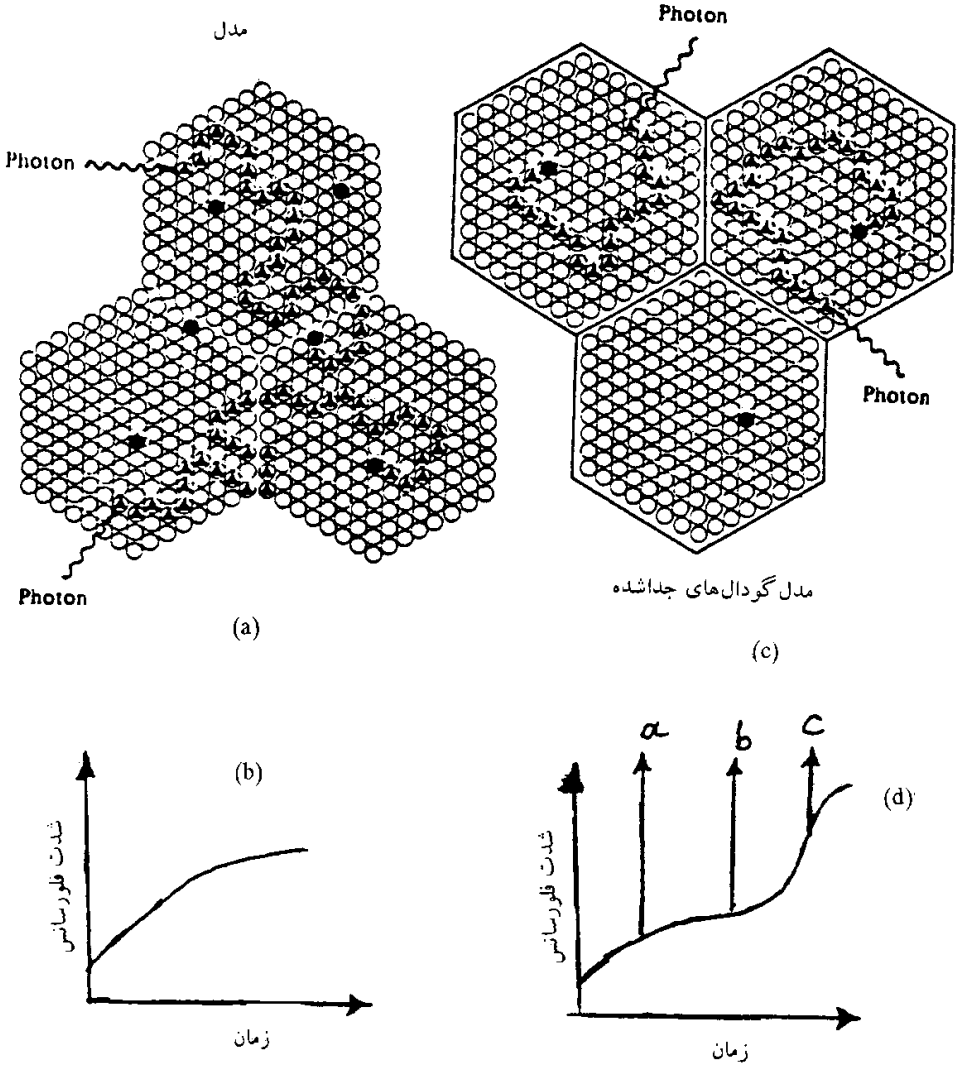
این کمپلکس که در بخش‌های گرانایی بیشتر دیده می‌شود، تنها نقش آنتن جمع‌کننده نور و هدایت آن به فتوسیستم‌ها را دارد و فعالیت فتوشیمیایی ویژه‌ای برای آن شناخته نشده است. ۵۰٪ از کل کلروفیل a و تقریباً تمامی کلروفیل b($\frac{a}{b}$ = 1:3) را در خود جای داده است و به ازای هر ۶ مولکول کلروفیل ۱ مولکول کاروتنوئید در آن وجود دارد. بیش از ۵۰٪ کل پروتئین تیلاکوئیدی در آن قرار گرفته است. LHCP یک کمپلکس کاملاً ضروری و غیرقابل اجتناب برای انجام عمل فتوسنتز نیست، به‌طوری که در گروه‌های جهش یافتهٔ فاقد این کمپلکس نیز عمل فتوسنتز انجام می‌گیرد.

پروتئین موجود در این کمپلکس از دو نوع پلی‌پپتید ۲۵ و ۲۳ کیلو دالتون (KD) تشکیل شده که با کلروفیل a و b در تماس می‌باشند. اگر هر پلی‌پپتید دارای ۶ مولکول کلروفیل باشد، ۳۰ مونومر پلی‌پپتیدی جهت تشکیل LHCP مجتمع می‌شوند. بیشتر قسمت‌های LHCP، آب‌گریز است و در درون غشاء تیلاکوئید قرار دارد. اما بخشی از آن (۲KD) که شامل ۲۰ اسیدآمینه (از جمله ترئونین با بار مثبت است) در تماس با استروما قرار می‌گیرد. بخش دیگری از LHCP نیز با سطح روزنی تیلاکوئید در تماس می‌باشد. ترتیب اسیدهای آمینه موجود در بخش دو کیلودالتونی در تماس با استروما، از انتها به‌صورت زیر می‌باشد (از چپ به راست).

$$Lys^+, Arg^+, Ser^+, Ala^+, Thr^+, thr^+, Lys^+, lys^+$$

همان‌گونه که مشاهده می‌شود با وجود چنین اسیدهای آمینه‌ای، LHCP تا حد زیادی دارای بار مثبت خواهد شد. اما در عین حال با وجود چنین بار مثبتی باز هم سطح تیلاکوئیدها دارای بار منفی است (۱ بار منفی به ازای

1-light harvesting complex protein



شکـــل ۱۲-۱۴. چگونگی ارتباط واحدهای فتوسنتزی. a) اتلاف انرژی به‌صورت فلوئورسانس پس از اشباع شدن هر زیرواحد. b) یک واحد فتوسیستم با مدل گودال‌های جداشده. c) یک واحد فتوسیستم با مدل دریاچه‌ای. d) - (a) اتلاف انرژی به‌صورت موقّت در هر زیرواحد پس از اشباع (b) انتقال انرژی به زیرواحد مجاور و خاموش شدن فلوئورسانس (c) اشباع کلّ سیستم و شروع فلوئورسانس دایم.

$6mm^2$). به دلیل وجود همین بارهای منفی، دو تیلاکوئید از هم دور شده و به‌هم متصل نمی‌شوند. وجود کاتیون‌ها (مثل Mg^{2+}) تا حدودی باعث پوشاندن بارهای منفی می‌شوند. نظریه‌ای وجود دارد که بر بنای آن، وقتی این بارهای منفی تاحدی پوشانده شدند، بارهای مثبت موجود در LHCP باعث جذب بارهای منفی موجود در تیلاکوئید مجاور شده دو تیلاکوئید روی هم سوار می‌شوند و تجمع تیلاکوئیدی ایجاد می‌شود. البته این نظریه در توجیه و چگونگی ایجاد گرانوم‌ها از تیلاکوئیدهای پراکنده در استروما بیان شده که بعداً در مورد آن بحث خواهد شد ولی در مورد درستی آن هنوز بحث است و تنها نظریه در این مورد نمی‌باشد.

در مورد طرز ارتباط LHCP با فتوسیستم‌ها و نحوهٔ انتقال انرژی دو نظریه وجود دارد:

۱- **نظریه آندرسون:** طبق این نظریه LHCP توسط یک آنتن Chl_a و Chl_b، فقط به Chl_a موجود در PSII متصل می‌شود و به‌طور مستقیم به PSI ارتباط ندارد.

۲- **نظریه روبینسون:** هر دو فتوسیستم با کمپلکس LHCP ارتباط دارند و هر کمپلکس LHCP موجود در یک فتوسیستم با کمپلکس LHCP در فتوسیستم دیگر در ارتباط است و این خود در مواردی باعث تبادل انرژی می‌گردد که چگونگی آن بعداً شرح داده می‌شود.

ارتباط دو فتوسیستم (PSI و PSII)با همدیگر و راه‌های انتقال انرژی

انرژی نوری دریافت شده توسط PSII باید به نحوی در اختیار PSI قرار گیرد، در غیراین‌صورت H^+ و NADPH و ATP لازم، جهت مصرف در مرحلهٔ تاریکی فتوسنتز تولید نخواهد شد. ارتباط بین PSII با PSI به دو طریق انجام می‌گیرد:

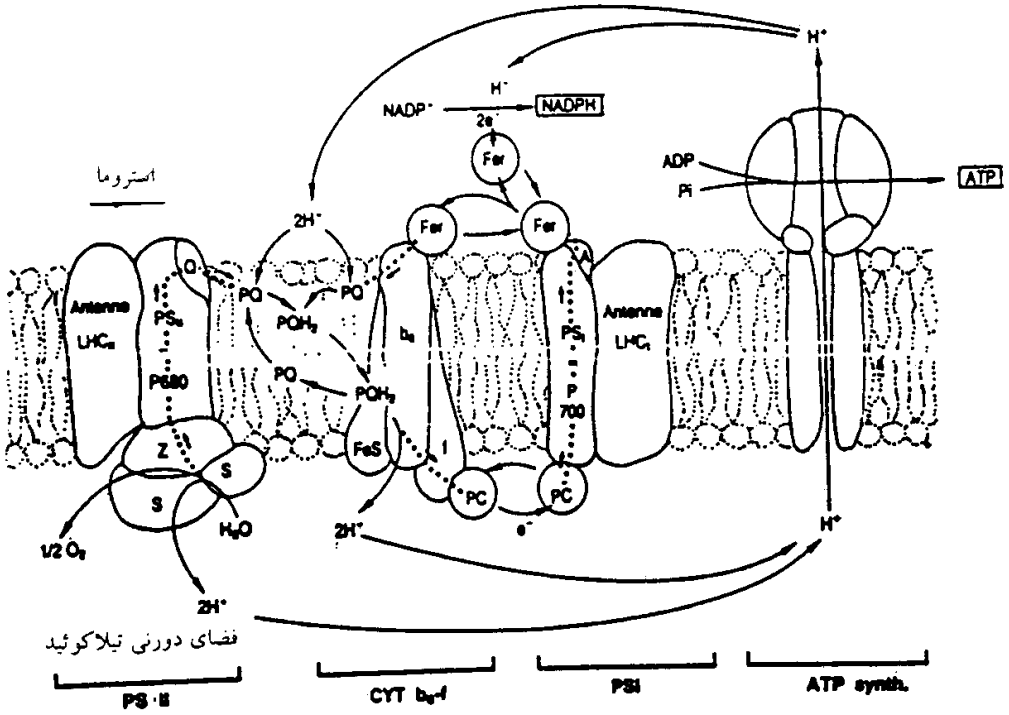
۱- از راه زنجیر انتقال الکترون

۲- از راه پخشیدگی[1] یا جریان انرژی باواسطه LHCP

زنجیر انتقال الکترون

چگونگی انتقال الکترون و ارتباط فتوسیستم II و I را نشان می‌دهد (شکل ۱۲-۱۴).

فتوسیستم II دارای کمپلکس موج‌گیر است که امواج را به مرکز سیستم هدایت می‌کند. سطحی که نور به آنجا برخورد می‌کند سطح روزنی تیلاکوئید است. در طرف پرتوپلاسمیِ فتوسیستم ۲، مادهٔ گیرنده الکترون (Y) یعنی فئوفیتین الکترون را گرفته و به خاموش‌کننده[2] و از آنجا به Cyt۵۵۹، PQ، Cyt_f، PC و PSI منتقل می‌کند. با برانگیخته شدن مرکز واکنش فتوسیستم I، الکترون به ماده X (پروتئین آهن گوگرد) در اطراف استرومایی غشاء تیلاکوئید منتقل شده و از طریق Fd (فردوکسین) به $Fd - NADP^+$ ردوکتاز منتقل می‌شود و باعث تولید H^+ و $NADH^+$ در این قسمت می‌گردد (شکل ۱۲-۱۵).



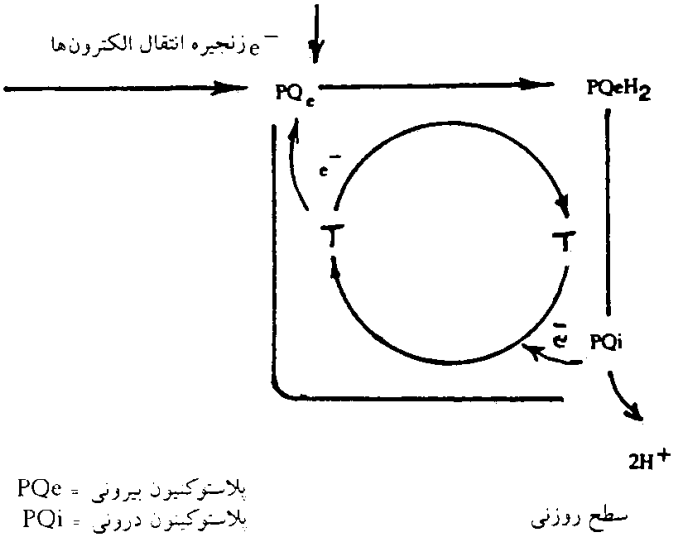
شکل ۱۲-۱۵. چگونگی استقرار و ارتباط اجزای موجود در غشاء تیلاکوئیدی و نحوه ارتباط دو فتوسیستم باواسطه انتقال الکترون‌ها

با تابیدن نور، سطح روزنی دارای بار مثبت (پایین آمدن PH) می‌شود و در سطح استرومای PH بالا می‌رود. مکانیسم عمل بدین صورت است که PQ (پلاستوکینون) ضمن این که ناقل الکترون در زنجیره انتقال الکترون است (یک الکترون به ازای هر مولکول PQ در زنجیره منتقل می‌شود)، عمل انتقال پروتون ($2H^+$ به ازای هر PQ). از سمت استروما به روزن را نیز به عهده دارد (شکل ۱۲-۱۶).

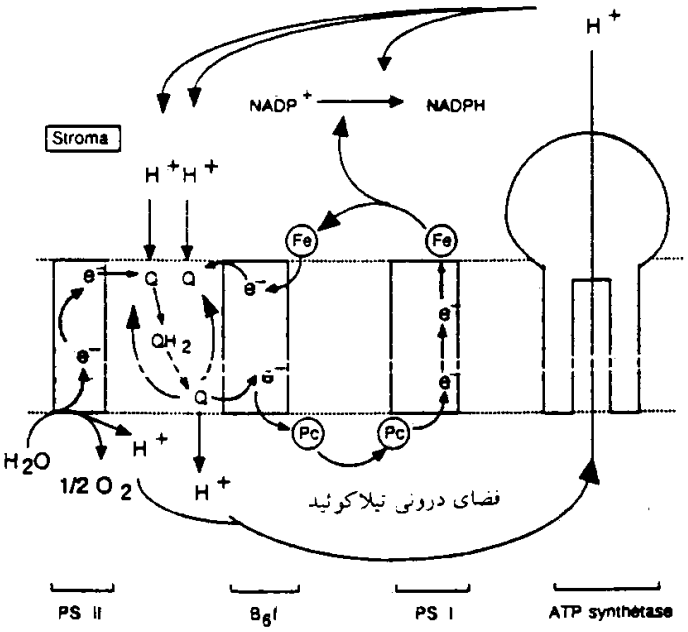
با شروع انتقال الکترون، در زنجیر انتقال PQ (پلاستوکینون)، یک الکترون از این طریق دریافت کرده و یک

1- spill - over 2- Quencher

الکترون نیز از شاتل T (ترکیبات موجود در غشاء) می‌گیرد و با داشتن دو الکترون آماده پذیرش $2H^+$ در سطح استرومایی می‌شود. PQe (PQ استرومایی یا پلاستوکینون بیرونی) با گرفتن $2H^+$ به $PQ\ eH_2$ تبدیل شده و چون آزادانه می‌تواند در عرض غشاء حرکت کند (به علت وجود سیالیت غشاء)، به سمت سطح روزنی حرکت می‌کند تا به سطح روزنی می‌رسد، در این حالت $PQiH_2$ (پلاستوکینون درونیِ احیا شده) نامیده می‌شود. این پلاستوکینون با از دست دادن یک الکترون که در زنجیره انتقال الکترون قرار می‌گیرد و پس دادن الکترون دوم به T^+ (شاتل اکسیدشده)، $2H^+$ را در روزن تیلاکوئیدی تخلیه و به PQi تبدیل می‌شود که دوباره در عرض غشاء حرکت کرده و در سطح استرومایی قرار می‌گیرد. چنین مکانیسمی باعث ایجاد اختلاف پتانسیل الکتروشیمیایی در طرفین غشاء تیلاکوئیدی می‌شود (بالا رفتن PH در سطح استرومایی و پایین آمدن PH در سطح روزنی). این تغییر لازمهٔ عمل سازه اتصال (CF_1) جهت تولید ATP می‌باشد. بدین صورت که پروتون‌های موجود در روزن تیلاکوئیدی، از راه کانال موجود در CF_0 حرکت کرده و در سطح استرومایی با برخورد به واحدهای سازنده CF_1 باعث تغییر شکل آنها می‌شوند. این تغییر شکل، بخش CF1 را در جهت ATP سنتتازی و تولید ATP از ADP و PI فعال می‌کند (شکل ۱۲-۱۷).



شکل ۱۶-۱۲. طرز عمل پلاستوکینون در انتقال پروتون‌ها از سطح استرومایی به سطح روزنی.



شکل ۱۲-۱۷. انتقال شعاعی (برداری) پروتون‌ها از استروما به سوی فضای درونی تیلاکوئید و برعکس.

۲- *از راه پخشیدگی یا جریان انرژی با واسطه* LHCP

ارتباط دو فتوسیستم از راه انتشار یا پخشیدگی انرژی[1]

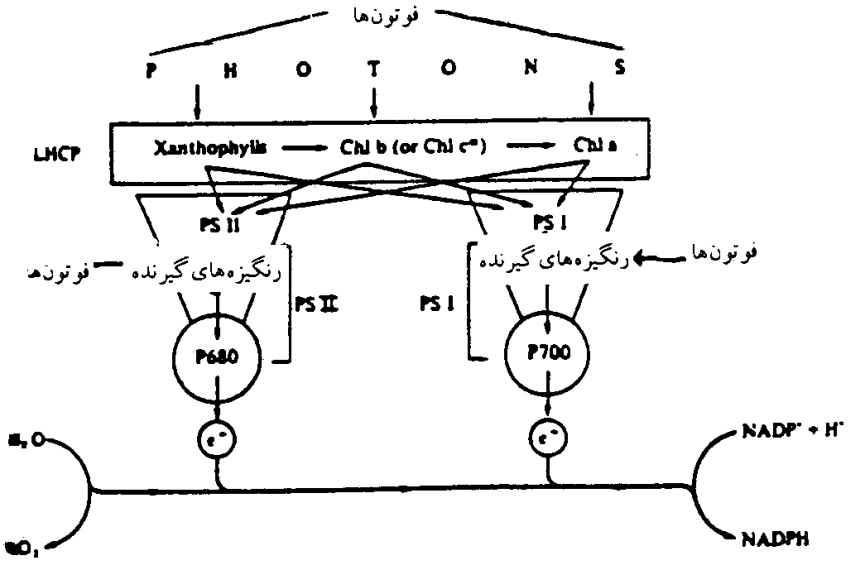
اگر به یک کلروپلاست جداشده از سیتوپلاسمی که در تاریکی قرار داشته، نور بتابانیم، در ابتدای تابش نور، شدت بالایی از فلورسانس را در کلروپلاست (که در محل وقوع آن در PSII می‌باشد) مشاهده می‌کنیم. به این مرحله، مرحله I (مرحلهٔ دارای شدت فلورسانس بالا) گفته می‌شود. اما پس از گذشت مدتی از هنگام تابش نور، به

1- Spill - over

مرحله‌ای می‌رسیم که شدت فلورسانس در کلروپلاست (در PSII) کم می‌شود. این زمان را مرحله II (مرحله‌ای که شدت فلورسانس اولیه کم می‌شود) می‌نامند. ممکن است تصور شود که کم شدن شدت فلورسانس در مرحله II ناشی از تغییر وضع آنتن‌های جذب‌کننده نور باشد، در صورتی که چنین نیست و ناشی از پخش شدن انرژی از PSII به PSI باواسطه سیستم LHCP می‌باشد. در مورد چگونگی پخش انرژی از PSII به PSI هنگام لبریز شدن PSII از انرژی، دو مدل را در اینجا بررسی می‌کنیم.

الف - مدل روبینسون: طبق این مدل، بر روی PSII و PSI به ترتیب LHCPII و LHCPI قرار گرفته‌اند، هر یک از این کمپلکس‌ها قادرند پرتوهای نوری را جذب و انرژی آن را به مرکز واکنش مربوط به خود هدایت نمایند. این دو کمپلکس جدای از هم نیستند بلکه به همدیگر اتصال دارند. اما ترتیب قرارگرفتن مولکول‌ها در دو کمپلکس به نحوی است که از LHCPII به طرف LHCPI، به ترتیب طول موج جذب مولکول‌ها افزایش می‌یابد.

هنگام اشباع شدن PSII از انرژی نوری (مرحله I)، انرژی لبریز شده از LHCPII عبور کرده وارد LHCPI می‌شود تا به مرکز واکنش PSI هدایت و مصرف شود (رسیدن به مرحله II) و چون طول موج‌های جذبی مولکول‌ها به ترتیب از LHCPII به LHCPI به‌صورت افزایشی است، جهت انتقال انرژی یک طرفه بوده و غیرقابل برگشت است و این خود باعث خاموش شدن فلورسانس ایجاد شده در PSII می‌شود (شکل ۱۲-۱۸).



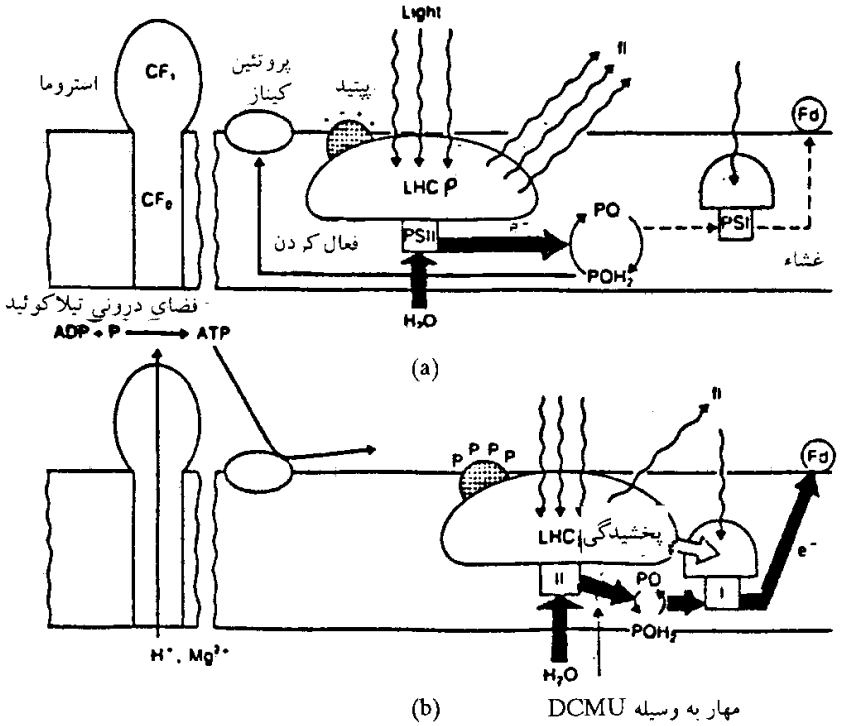
شکل ۱۲-۱۸. طرز استقرار و نحوهٔ ارتباط LHCPS و PSI با PSII از راه جریان انرژی.

ب - مدل اتصال‌های LHCP/PSII با PSI: به عقیده آندرسون (۱۹۸۱)، LHCP، توسط یک آنتن Chl_a و Chl_b که در آن موجود است با Chl_a موجود در فتوسیستم II مرتبط می‌شود و ترجیحاً انرژی خود را به PSII منتقل می‌کند. در مواقع لزوم بین LHCP و PSI پخشیدگی انرژی صورت می‌گیرد.

در یک آزمایش انجام شده با تیلاکوئیدهای منفک از کلروپلاست، بوناونتورا[1] (۱۹۶۹) نشان داد که در غلظت‌های پایین کاتیونی، شدت بالایی از فلورسانس یا مرحله I (کمینه پخشیدگی انرژی) را خواهیم داشت. اما با افزایش میزان کاتیون‌ها، میزان پخشیدگی انرژی افزوده شده و شدت فلورسانس کم می‌شود (مرحله II). با توجه به این تجربه، مکانیسم پخشیدگی به علت وجود بارهای مثبت بر روی دنباله‌های ترئونین است که در پلی‌پپتید ۲KD، در LHCP و در تماس با استروما قرار دارد. فتوسیستم I از LHCP منفی‌تر است. همچنین

1- Bonaventora

توجه به منفی بودن سطح غشاء تیلاکوئیدها در محلول‌های دارای غلظت یونیِ کم، این بارهای منفی موجود در غشاءها پوشیده نمی‌شوند و همدیگر را دفع می‌کنند (دفع الکترواستاتیکی). بنابراین فتوسیستم I و LHCP/PSII به‌طور تصادفی در درون غشاء پراکنده می‌شوند تا به یک حالت تعادل بار برسند. در این وضع به علت نابرابر بودن بارها در فتوسیستم I و LHCP/PSII، تماس‌هایی بین آنها برقرار می‌شود، پخشیدگی انرژی از PSII به PSI به وقوع می‌پیوندد و مرحله II مشاهده می‌شود. کاتیون‌ها (مثل $mM_{۱۰}^{-۳}$، $Mg^{+۲}$) بارهای منفی موجود در سطح غشاء را پوشانده و در این حالت LHCP که دارای بار مثبت است، می‌تواند با غشاء دیگر متّصل شود و سیستم گرانایی بدین صورت تشکیل گردد. در این حالت فتوسیستم I به مناطق غیرمجتمع (حاشیه تیلاکوئیدها) مهاجرت کرده و اجزاء LHCP (اجزاء بزرگ)، در مناطق مجتمع تیلاکوئیدها مستقر می‌شوند. با جداافتادن PSI از PSII، پخشیدگی انرژی کم شده و شدت فلورسانس بالا خواهد رفت (مرحله I) (شکل ۱۲-۱۹).



شکل ۱۲-۱۹. کنترل پخشیدگی انرژی در تیلاکوئیدها به وسیله فسفوریلاسیون و کمپلکس پروتئینی LHCP (a) ابتدا نور به وسیله فتوسیستم II جذب می‌شود و e (الکترون) به پلاستوکینون منتقل شده موجب احیای آن می‌شود، در این مرحله پخشیدگی انرژی کم و فلوئورسانس در فتوسیستم II زیاد است (مرحله I). (b) افزایش ارتباط بین فتوسیستم II و فتوسیتم I و پخشیدگی انرژی. در این حالت فلوئورسانس کاهش می‌یابد.

مطالعات اولیه و اصول واکنش‌های فتوسنتزی

پریستلی[1] تولید اکسیژن توسط گیاهان را در ۱۷۷۱ کشف کرده بود. اهمیت نور در این پدیده توسط اینگنهوس[2] فیزیکدان دانمارکی که تابستان سال ۱۷۷۹ را در لندن به همین لحاظ سپری کرد کشف گردید. او با انجام ۵۰۰ آزمایش در این رابطه نتایجی به‌دست آورد که قبل از اتمام آن سال در مجموعه‌هایی به‌صورت یک کتاب به چاپ رسید. تا سال ۱۸۵۰ فتوسنتز به‌صورت واکنش‌های زیر منظور می‌شد:

$$CO_2 + H_2O \longrightarrow O_2 + \text{قند}$$

پژوهشگران دریافته بودند که در جریان این واکنش انرژی نور ضمن مراحل فتوسنتز به انرژی شیمیایی تبدیل می‌گردد. اواخر قرن نوزدهم، آثار فتوسنتز در یاخته از راه شناسایی آزاد شدن اکسیژن از کلروپلاست نیز به آگاهی‌های

1- Joseph Priestley 2- Jan Ingenhousy

پژوهشگران افزوده شد. رها شدن اکسیژن در یاخته به وسیله کلروپلاست توسط انگلمن[1] شناخته شد. وی همچنین دریافت زمانی که برخی جلبک‌های سبز در معرض نور قرار گیرند، باکتری‌های کوچک فعال در بیرون یاخته در منطقه وسیعی در اطراف آنها جمع می‌شوند تا از اکسیژن آزاد شده استفاده کنند.

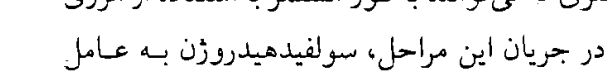
نقش CO_2 و H_2O در فتوسنتز

یکی از بزرگ‌ترین عوامل پیشرفت دانش امروزی ما در مورد شناخت فتوسنتز مدیون پژوهش‌های وان‌نیل[2] در اوایل سال ۱۹۳۰ می‌باشد. در آن زمان باور عمومی اندیشمندان بر این بود که از انرژی نور برای شکست دی‌اکسیدکربن به اجزای ساده‌تر استفاده می‌شود و از آن اکسیژن مولکولی پدید می‌آید و اتم کربن نیز به مولکول H_2O انتقال می‌یابد. این جریان را با فرمول زیر می‌توان نشان داد:

$$CO_2 + H_2O \longrightarrow (CH_2O) + O_2$$

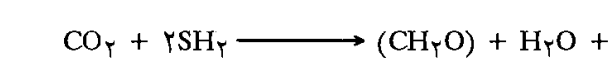
(CH_2O) بیانگر یک واحد قند است که ساختارهای مختلفی دارد.

در سال ۱۹۳۱ وان‌نیل پیشنهاد دیگری در این خصوص ارائه داد. این پیشنهاد براساس تحقیقات او در رابطه با باکتری‌های گوگردی بود. نتیجه تحقیقات نیل نشان داد که این باکتری‌ها می‌توانند به‌طور مستمر با استفاده از انرژی نور، قند تولیدکنند بدون آن که در این پدیده اکسیژنی آزاد شود. در جریان این مراحل، سولفیدهیدروژن به عامل سولفوراکسید می‌شد. این مثالی بود از یک واکنش کاملاً متفاوت با آنچه تا آن زمان در مور فتوسنتز شناخته شده بود. در این واکنش CO_2 مورد استفاده قرار می‌گرفت اما O_2 تولید نمی‌گردید، چنین برمی‌آمد که باکتری گوگردی به این ترتیب عمل می‌نماید:



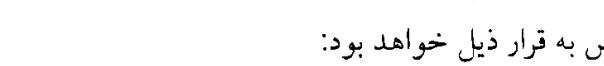
$$CO_2 + 2SH_2 \longrightarrow (CH_2O) + H_2O + 2S$$

از آنجا که نیل اساس تشابه مراحل مختلف فتوسنتز در جانداران را دریافته بود، یک پیشنهاد کلی در این خصوص ارائه داد:



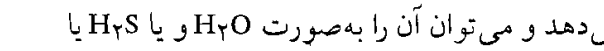
$$CO_2 + 2H_2A \longrightarrow (CH_2O) + H_2O + 2A$$

با تولید هگزوز (قند سادهٔ ۶ کربنی) همچون گلوکز این واکنش به قرار ذیل خواهد بود:



$$6CO_2 + 12H_2A \longrightarrow C_6H_{12}O_6 + 6H_2O + 12A$$

وان‌نیل دریافته بود که فتوسنتز شامل واکنش‌های پیوسته و هماهنگی از مراحل اکسیدکننده و احیاکننده است. در واکنش بالا H_2A عامل احیاکننده است که الکترون از دست می‌دهد و می‌توان آن را به‌صورت H_2O و یا H_2S یا هر عامل دیگری نشان داد در صورتی که CO_2 یک عامل اکسیدکننده است که در یاخته گیاهان احیاء می‌شود تا به‌صورت زیر گلوکز تولید کند:



$$6CO_2 + 12H_2A \longrightarrow C_6H_{12}O_6 + 6H_2O + 6O_2$$

در این واکنش هر مولکول اکسیژن از طریق شکست دو مولکول آب (H_2O) به‌دست می‌آید که مراحل مختلف آن از طریق جذب نور صورت می‌پذیرد. مکانیزم مولکولی دقیق این پدیده هنوز هم مورد بحث است. توجّه داشته باشیم که هر دو اتم اکسیژن مولکولی از آب در نتیجهٔ این واکنش به‌دست آمده و تبدیل CO_2 (با نسبت مولکول‌های کربن به اکسیژن که ۲:۱ است) به گلوکز (با نسبت کربن به اکسیژن ۱:۱) بایستی همراه تولید آب باشد.

1- Engelman 2- Van.Neil

پیشنهاد نیل فتوسنتز را به طریقی دیگر که عکس واکنش تنفس به نظر می‌رسد معرّفی کرد.

در حالی که در یاخته عمل اکسید شدن در میتوکندری‌ها صورت می‌گیرد و از اکسیژن یونی شده و پروتون‌ها آب به‌دست می‌آید، در عمل فتوسنتز، کلروپلاست آب را اکسید می‌کند تا اکسیژن حاصل شود. مشکلات ترمودینامیکی را که در این پدیده بروز می‌کند بعداً مورد بررسی قرار خواهیم داد.

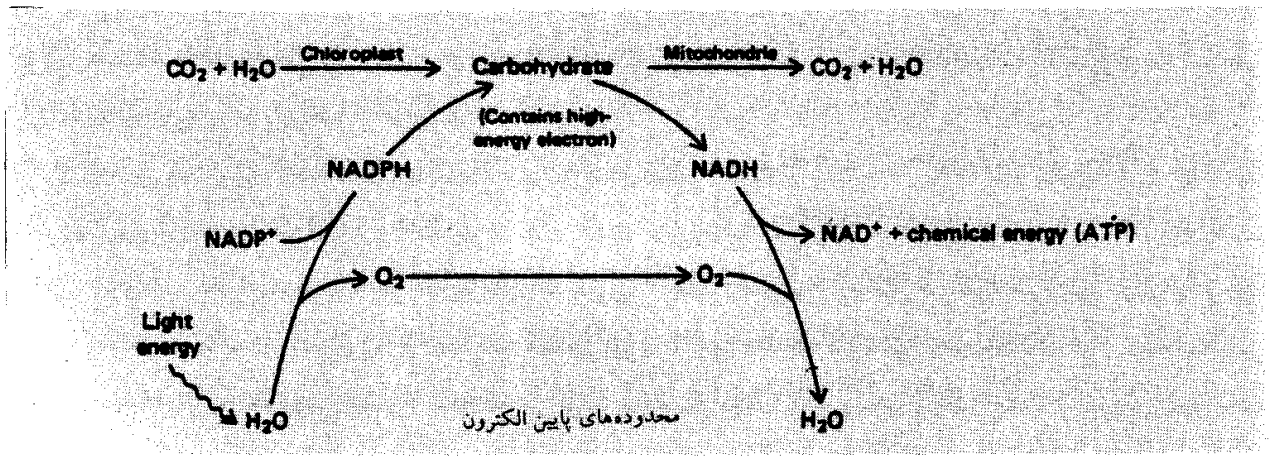
واکنش هیل

در سال ۱۹۳۷، هیل[1] طی یک سری آزمایش‌ها به این نظر قوت داد که منبع تولید اکسیژن در جریان مراحل فتوسنتز در گیاهان، آب است. هیل با آزمایشات خود راهی را به سوی مطالعهٔ بیوشیمی فتوسنتز گشود. یکی از نکات برجسته کاربردی فتوسنتز این است که فتوسنتز در اندامک‌هایی با اندازه بزرگ صورت می‌پذیرد. به‌دست آوردن کلروپلاست کاری ساده است، اما چنانکه مشخص خواهد شد، مراحل تهیهٔ کلروپلاستی که از حالت طبیعی خود خارج شده اغلب با از دست دادن برخی مواد تشکیل دهندهٔ آن همراه خواهد بود.

یکی از بهترین فواید شناخت کلروپلاستی که از حالت طبیعی خود خارج شده و به اصطلاح صدمه دیده است تمایز فتوسنتز «از تنفس هوازی» می‌باشد.

زمانی که تمام مواد طبیعی در یک یاخته وجود داشته باشد، میتوکندری‌ها عمل اکسیژن‌گیری را ضمن فتوسنتز انجام می‌دهند که، به اشتباه به نظر می‌رسد که این کار را کلروپلاست به عهده دارد. "هیل" برگ گیاهی را در محلول سوکروزله کرد و سپس محلول به‌دست آمده را به وسیله صافی پشم شیشه صاف کرد و کلروپلاست تهیّه نمود.

هیل نشان داد که گرچه این کلروپلاست قادر به جذب CO_2 نیست (به این دلیل که مواد مشخصی از آن از بین رفته است) ولی می‌تواند اکسیژن مولکولی تولید کند. در آزمایش "هیل" تولید اکسیژن در غیاب CO_2 صورت می‌گرفت که به‌طور یقین به نور احتیاج داشت و همچنین حضور یک پذیرنده الکترون نیز الزامی بود. با این آزمایش "هیل" توانست موارد متعددی از اساس کار فتوسنتز را به شرح زیر مشخص سازد.



۱- از آنجایی که اکسیژن در غیاب دی‌اکسیدکربن تولید می‌شود، اتم‌های اکسیژن نمی‌توانند از آن منبع به وجود آمده باشند و بنابراین بایستی از آب به‌دست آمده باشند.

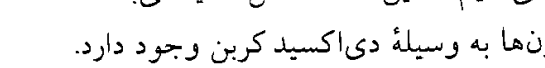
چند سال بعد زمانی که گاز اکسیژن رادیواکتیو در جریان آزمایش‌هایی که در آنها از آب رادیواکتیو استفاده شده بود، آزاد شد این تصوّر به یقین تبدیل شد.

۲- واکنش‌هایی که در آنها آب دخالت دارد بایستی از سایر واکنش‌هایی که در آنها دی‌اکسیدکربن وجود دارد متمایز

1- Robert Hill

گردد زیرا یکی از این آزمایش‌ها بدون حضور دیگری می‌تواند انجام شود.

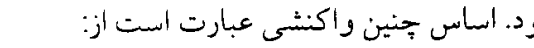
۳- بنا به واکنش هیل، برای این که اتم اکسیژن از آب خارج شود، برخی پذیرندگان اکسیژن (عامل احیاکننده) باید حضور داشته و پذیرای الکترون شوند.



$$2H_2O \longrightarrow 4H^- + 4^-e + O_2$$

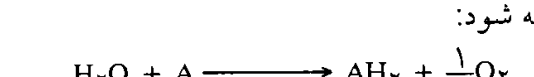
در واکنش‌های هیل، CO_2 پذیرای الکترون است و ما هم‌اکنون می‌دانیم که این مسئله اصل قضیه می‌باشد. مراحل زیادی بین جداشدن الکترون‌ها از آب و پذیرش الکترون‌ها به وسیلهٔ دی‌اکسید کربن وجود دارد. برای جداسازی الکترون‌ها از آب "هیل" می‌بایستی پذیرندگانی را برای الکترون‌ها منظور می‌داشت.

او برای این کار از نمک‌های فرّیک مثل اکسالات فرّیک[1] یا فرّی سیانید استفاده کرد. در حضور این نمک‌های آهن، کلروپلاست جداشده فتوسنتز می‌کند، اکسیژن آزاد می‌شود و همزمان با آن، احیای عامل پذیرنده توسط الکترون‌ها صورت می‌گیرد و ترکیبات فرّو تولید می‌شود. اساس چنین واکنشی عبارت است از:



$$4Fe^{3+} + 2H_2O \longrightarrow HO\ 4Fe^{2+} + 4H^+ + O_2$$

شکل عمومی‌تر این واکنش (واکنش هیل) می‌تواند چنین نوشته شود:



$$H_2O + A \longrightarrow AH_2 + \frac{1}{2}O_2$$

در اینجا A می‌تواند هر مقدارِ ممکن از الکترون‌های عامل پذیرای الکترون در لوله آزمایش باشد و برخی عامل‌های دیگر (که بعداً توضیح آن داده خواهد شد) پذیرندگان الکترون در یاخته هستند. از آنجایی که CO_2 برای تولید O_2 ضروری نبود، از واکنش حذف شد.

۴- واکنش "هیل" بنیان کار فتوسنتز را براساس رها شدن و یا گرفتن الکترون نشان داد و همچنان که خواهیم دید این پدیده زیر بنای پدیدهٔ فتوسنتز به حساب می‌آید.

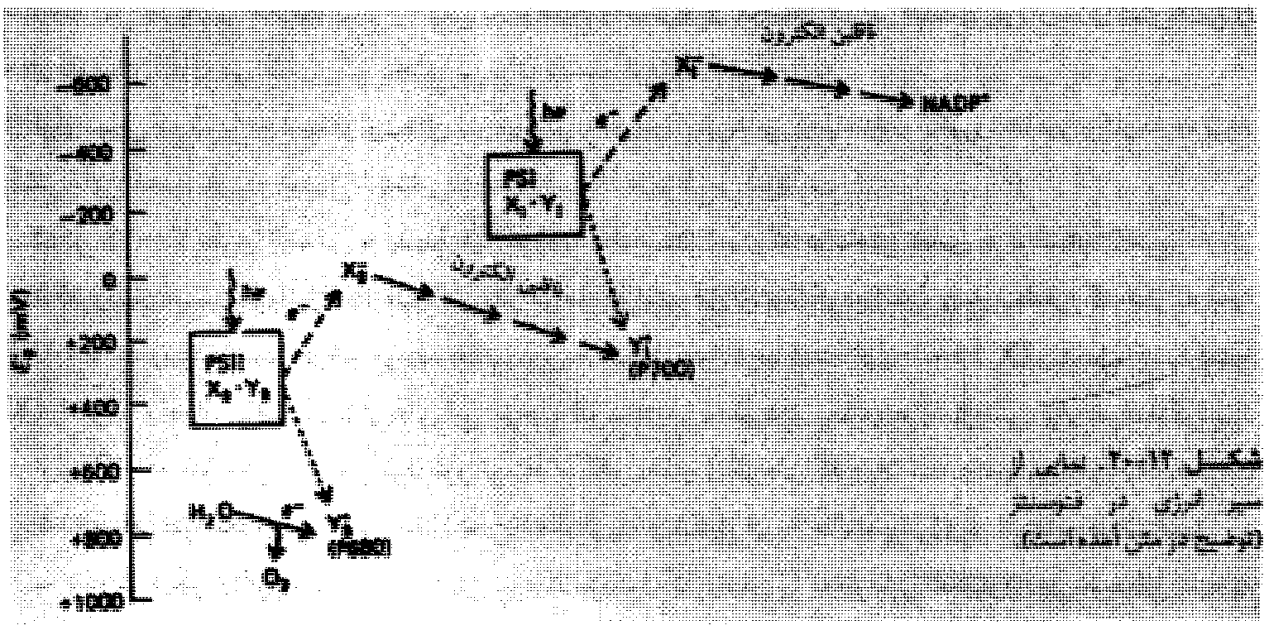
اکسیژن نقش پذیرنده نهایی الکترون را دارد. اکسیژن توانایی انجام این وظیفه را دارد و دلیل آن هم این است که یک عامل قوی اکسیدکننده می‌باشد. برای مثال آن چنان الکترون‌خواه است که الکترون‌ها معمولاً به سمت آن در جریان هستند. از طرفی می‌توان تصور کرد به دلیل تمایل به پیوستگی زیاد الکترون با اکسیژن به سادگی الکترون‌های خود را به پذیرنده دیگری نمی‌دهد.

از آنجایی که انرژی احیاکنندگی اکسالات فرّیک از یک جفت ($Fe^{3+} - Fe^{2+}$) که تقریباً ۰/۰ است به التکروپوزیتیوتی جفت $O_2 - H_2O$ که تقریباً ۰/۸ است نمی‌رسد، در شرایط عادی یون‌های فرّیک قادر به جذب الکترون‌های آب نخواهند بود. به هر حال زمانی که کلروپلاست در معرض نور قرار می‌گیرد شرایطی در آن به وجود می‌آید که احیاء نمک فریک تقریباً تا آخر صورت می‌گیرد. اساس مطالعه فتوسنتز (همچنانکه در صفحات آتی خواهیم دید) بر پایهٔ مکانیزمی استوار شده که می‌تواند منجر به انتقال الکترون‌ها از یک جفتِ الکتروپوزیتیو مانند ($O_2 - 2H_2O$) به یک زوج با درجهٔ الکترونگاتیوتی بیشتر همچون $Fe^{3+} - Fe^{2+}$ و یا $CO_2 - CH_2O$ باشد که در شکل ۱۲-۲۰ در شیب پتانسیل الکتریکی نمایان است.

تشکیل نیروی احیاکننده

به دنبال آزمایش "هیل" یکی از سؤالات مهمی که مطرح شد، ماهیت پذیرندهٔ الکترون در کلروپلاست بود. تصور می‌شد که هر ماهیّتی که این پذیرنده داشته باشد، حتماً بایستی با احیاء CO_2 به قند ارتباط داشته باشد.

1- Ferric oxalate



شکل ۱۲-۲۰. نمایی از سیر انرژی در فتوسنتز (توضیح در متن آمده است)

تا سال ۱۹۵۰، تحقیق بر روی تجزیه قندها، اسیدهای آمینه و چربی‌ها در یاخته‌های جانوری از طریق اکسایش، مهم‌ترین حالت متابولیسم یاخته را نشان می‌داد. یکی از ویژگی‌های روشن این بیوشیمی استفاده از نوکلئوتیدپیریدین با واکنش‌های اکسایش و کاهش می‌باشد.

NADH در آن زمان DPNH خوانده می‌شد که یکی از عوامل مهمی در واکنش‌های کاتابولیسمی به شمار می‌رفت و NADPH که در آن وقت به TPNH موسوم بود از عوامل مهم در واکنش‌های آنابولیکی محسوب می‌گردید. از آنجایی که فتوسنتز در گیاهان منجر به تشکیل قندهایی مشابه با آنچه که در کلیه‌ها و یا هر بافت دیگری در پستانداران می‌شد. تصور این بود که نوع مشابهی از عوامل احیاکننده موجود در یاخته‌های جانوری نیز در واکنش‌های تولید در گیاهان به کارگرفته می‌شود.

تشکیل NADPH در فتوسنتز در سال ۱۹۵۱ در سه آزمایشگاه مختلف کشف گردید. به هنگام کار کردن با کلروپلاست جداشده از سایر اجزای یاخته گیاهی، دانشمندان دریافتند که $NADP^+$ نقش پذیرنده الکترون‌های فتوسنتز را بازی می‌کند، بنابراین در واکنش هیل، جایگزین نمک فرّیک می‌شود.

آزمایشات بعدی نشان داد که $NADP^+$ معمولاً رابطی است برای حمل الکترون‌ها از آب به دی‌اکسیدکربن. در جریان فتوسنتز این ماده تولید NADPH می‌کند که استفادهٔ بعدی آن در احیاء CO_2 است.

در سال ۱۹۵۴ دانیال آرون و همکارانش نشان دادند که کلروپلاست‌های مجزا شده قادر به انجام تمام مراحل فتوسنتز از رهاسازی O_2 تا تشکیل NADPH و تبدیل آن به CO_2 و گلوکز هستند. روی هم رفته یک انتقال الکترون‌ها در فتوسنتز از آب تا نوکلئوتید پیریدین به هیدروکربن‌ها وجود دارد که دقیقاً بر خلاف جریان موجود در اکسایش است. چنان که شرح داده خواهد شد، در کلروپلاست، الکترون‌هایی که از آب جدا می‌شوند قبل از رسیدن به دی‌اکسیدکربن که پذیرنده نهایی آنهاست از قسمت‌های مختلفی عبور می‌کنند.

نگاهی اجمالی به چگونگی فتوسنتز

فتوسنتز پدیده‌ای است که در آن تعداد زیادی واکنش صورت می‌پذیرد، بسیاری از این واکنش‌ها هنوز به خوبی شناخته نشده‌اند. به جای این که اجزای تشکیل دهندهٔ پدیده فتوسنتز را به تفکیک مورد بررسی قرار دهیم، بهتر

است ابتدا کلّ جریان را خلاصه کنیم و سپس به توضیح واکنش‌های مختلف در هر قسمت بپردازیم. واکنش‌هایی را که در فتوسنتز اتفاق می‌افتد به سه بخش می‌توان تقسیم کرد:

اول آنهایی که شامل جذب فوتون‌های نور می‌شود، دوم واکنش‌هایی که با انتقال الکترون‌ها سر و کار دارد، سوم واکنش‌هایی که به تغییر و تبدیل شیمیایی در متابولیت‌ها مربوط می‌شود.

شکل ۱۲-۲۰ نظری اجمالی به پدیدهٔ سیر انرژی در فتوسنتز است که در بخش بعدی به توضیح آن می‌پردازیم. یک الکترون از قسمت کم‌انرژی در آب، طی دو مرحله افزایش انرژی پیدا کرده است و به سطحی که قادر به احیا $NADP^+$ باشد رسیده است. در هر مرحله جذب نور به تشکیل مواد احیاکنندهٔ اولیه شده (X^-) و عامل اکسیدکننده (Y^-) را نیز به وجود می‌آورد. ویژگی‌های این مرحله فتوسنتز در بخش‌های بعدی مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

اولین گام در فتوسنتز جذب فوتون نور توسط مولکول‌های رنگیزه‌ای کلروپلاست و سپس تحریک الکترون می‌باشد. در این مرحله، از انرژیِ نور برای تحریک الکترون و تبدیل آن به حالت پرانرژی‌تر استفاده می‌شود.

به عبارت دیگر از انرژی نور استفاده می‌شود تا مولکول کلروفیلی را که توانایی الکترون‌دهی ضعیفی دارد به مولکولی که قادر به دادن الکترون است تبدیل نماید. زمانی را در نظر بگیرید که رنگیزه (مولکول Y) یک الکترون به پذیرندهٔ (X) می‌دهد. (X) پذیرندهٔ اولیهٔ الکترون نامیده می‌شود و دلیل آن هم این است که به‌طور مستقیم از رنگیزه تحریک شده الکترون دریافت کرده است.

رنگیزه تحریک شده نیز دهندهٔ الکترون خوانده می‌شود. با این ترتیب هر کدام از این مولکول‌ها باردار می‌شود. رنگیزه به Y^+ تبدیل شده و پذیرنده الکترون به X^- و این دو، از نظر فیزیکی با یکدیگر متفاوت می‌شوند. وظایفِ دهندهٔ الکترون اوّلیه Y و پذیرندهٔ X وقتی که در حالت باردار هستند، بیشتر مشخص می‌گردد. Y^+ کمبود الکترون دارد و به دنبال جذب الکترون می‌باشد در نتیجه یک عامل اکسیدکننده است در حالی که X^- یک الکترون اضافی دارد و به راحتی آن را از دست می‌دهد، بنابراین عامل احیاکننده خوانده می‌شود.

این جریان در نتیجه تشکیل عوامل اکسایشی و کاهشی است (که در زمانی کمتر از یک بلیونیم ثانیه صورت می‌گیرد) که ماهیت اصلی فتوسنتز می‌باشد. عامل‌های اکسیدکننده‌ای که بر اثر جذب نور به وجود آمده‌اند به اندازه‌ای الکترون‌خواه هستند که می‌توانند آب را به خود جذب کنند و عوامل احیاکننده نیز تا آن حد الکترون‌ده که می‌توانند به $NADP^+$ الکترون بدهند.

ما می‌توانیم این جریان را بیشتر بررسی کرده و به ویژگی‌های جزئی‌تر آن از دیدگاه تغییر و تحوّل انرژی بپردازیم. مجموعه $O_2 - H_2O$ توان کاهش و اکسایشی[1] دارد که تقریباً برابر ۰/۸۲ V + است در حالی که این توان برای مجموعه $NADP^+ - NADPH$ تقریباً در حدود ۰/۳۲V - است. اختلاف بین این دو مقدار (تقریباً ۱/۲V) است که نشانگر حداقل مقداری است که انرژی یک الکترون بایستی اضافه شود. این مقدار به‌طور قابل ملاحظه بیشتر از یک فوتون (کوآنتوم) نور است.

به نظر می‌رسد وجود دو فتوسیستم کاملاً مجزای از یکدیگر راهی برای دست یابی گیاهان به این امکان باشد. هر فتوسیستم موظّف به تحریک کردن الکترون‌ها در مرحله‌ای از جریان ازدیاد انرژی است (شکل ۱۲-۲۰) یک فتوسیستم الکترون‌ها را از سطح پایین‌تر از آب به نقطهٔ میانی سوق داده و از آنجا تا حدّ $NADP^+$ بالا می‌برد. گفته می‌شود که دو فتوسیستم به‌طور سری و در نتیجه یکی پس از دیگری با هم کار می‌کنند (شکل ۱۲-۲۰) در هر دوی این فتوسیستم‌ها (PSII , PSI) از انرژی نور برای بالا بردن الکترون‌ها به مرحله‌ای با انرژی بیشتر استفاده می‌شود که

1- redox

با گرفتن الکترون توسط مولکول پذیرنده همراه می‌گردد.

جذب نور توسط PSII منجر به تشکیل عامل خیلی قوی اکسیدکننده $Y^{+}II$ و یک عامل احیاکنندهٔ ضعیف، $X^{-}II$ (شکل ۱۲۰-۲) می‌شود. عامل اکسیدکننده‌ای که به وجود آمده قادر به جداکردن الکترون‌ها از آب است. در مقابل، جذب نور به وسیلهٔ PSI منجر به پیدایش عامل احیاکننده قوی $X^{-}I$ و یک عامل اکسیدکننده ضعیف $Y^{+}I$ می‌شود. عامل احیاکننده‌ای که به وجود آمده قادر به دادن الکترون‌ها به $NADP^{+}$ است.

هر کدام از این جابه‌جایی الکترون‌ها از H_2O به $Y^{+}II$ و از $X^{-}I$ به $NADP^{+}$، از راه عبور از ناقلین الکترون صورت می‌گیرد (شکل ۱۲-۲۰). تا اینجا، دو مرحلهٔ پایانی را بررسی کرده‌ایم که خلاصهٔ آن این است که الکترون‌ها از آب گرفته شده و به $NADP^{+}$ داده می‌شود. ما تنها احتیاج به پیوستگی این دو فتوسیستم به یکدیگر داریم تا اجازه دهد جریان الکترون از یک سر به انتها صورت پذیرد.

چگونگی پیوستن دو فتوسیستم از این قرار است که یک عامل احیاکننده ضعیف از $PSII(X^{-}II)$ یک عامل ضعیف اکسیدکننده $PSI(Y^{+})$ را چنانچه در (شکل ۱۲-۲۰) مشخص شده است، احیاء می‌کند.

خلاصه این که جذب یک کوآنتم انرژی به وسیلهٔ هر کدام از دو فتون این سیستم منجر به تشکیل دو الکترون با انرژی زیاد می‌شود که این دو الکترون به مولکول‌های پذیرندهٔ الکترون XI و XII می‌رسد. الکترون با انرژی زیاد PSI از پایین جدول انرژی عبور می‌کند تا فضای خالی $Y^{+}I$ از PSII را پُر کند. در همین حال الکترون‌ها از آب به PSII حرکت می‌کنند تا خلایی را که در مولکول رنگ دانه باقی مانده پر کنند و به این ترتیب زنجیره کامل می‌شود.

زمانی که هر یک از پذیرندگان اولیهٔ الکترون هر فتوسیستم، الکترون خود را به‌دست آورد، احتیاج گیاه به نور تمام می‌شود و سایر مراحل رد و بدل شدن الکترون می‌تواند در تاریکی اتفاق افتد. امّا اصطلاح واکنش نوری تا زمانی که NADPH تشکیل می‌شود به کلّ مراحل اطلاق می‌گردد.

در بحث قبلی، نیاز برای داشتن دو فتوسیستم براساس وجود انرژی جهت تحریک الکترون و انتقال آنها از آب به $NADP^{+}$ مورد بررسی قرار گرفت و این نظریه را به اثبات رساند که دلیل اولیه برای وجود دو فتوسیستم از تجزیه سیستم‌های باکتریایی به‌دست آمده است.

باکتری از آب به‌عنوان یک منبع الکترون استفاده نمی‌کند و اکسیژن مولکولی نیز تولید نمی‌نماید. این باکتری‌ها تنها یک نوع فتوسیستم دارند (مشابه PSI) زیرا مراحل فتوسنتز در آنها توسط یک دهنده الکترون همچون H_2S انجام می‌شود که به‌طور قابل توجهی از H_2O الکترون‌ده‌تراست. تفاوت ولتاژ بین H_2S و $NADP^{+}$ تنها ۰/۱ V است که به راحتی با انرژی که از جذب یک کوآنتم نور به‌دست می‌آید تأمین می‌گردد. مرحلهٔ مهم در انتقال الکترون‌ها در پایین جدول انرژی بین پذیرندهٔ اولیه الکترون در فتوسیستمِ دو (PSII) و کلروفیل با بار مثبت در فتوسیستم یک (PSI) و تشکیل ATP می‌باشد. اگرچه این فسفوریلاسیون که فتوفسفوریلاسیون خوانده می‌شود به روشنیِ فسفوریلاسیون اکسایشی در میتوکندری‌ها مشخص نیست ولی مبنایی مشابه دارد.

اثر فتوالکتریک

حضور اشیاء رنگارنگ پیرامون ما در نتیجهٔ جذب طول موج‌های مختلف نور است. در تمام امواج الکترومغناطیسی، انرژی موجود بستگی به طول موج براساس تساوی: $E = h\upsilon = \frac{c}{\lambda}$ دارد.

در اینجا h ثابت پلانک است و برابر است با (کالری $۱/۵۸ \times ۱۰^{-۳۴}$)، υ تناوب فرکانسی تشعشع، c سرعت نور در خلاء و λ طول موج می‌باشد. هر چقدر که طول موج بیشتر باشد انرژی کمتر می‌گردد. محور مراحل فتوسنتز براساس جذب انرژی نور به وسیلهٔ رنگیزه‌های کلروپلاست و تبدیل آن به انرژی جنبشی الکترون می‌باشد. برای

درک بهتر این جریان بایستی برخی از آزمایش‌های ویژهٔ فتوالکتریسیته را که در اواخر قرن گذشته صورت گرفته مورد بررسی قرار دهیم. این آزمایش‌ها به ویژه برای این که به وضوح خواصّ کوآنتمی تشعشعات الکترومغناطیسی را نشان می‌دهند، سودمند هستند.

در سال ۱۸۸۸ پس از برخی دست آوردهای اولیه، مشخص گردید که اگر صفحه‌ای از روی را در معرض نور قرار دهیم بار مثبت الکتریکی به خود می‌گیرد. در سال ۱۹۰۰، سه سال پس از کشف الکترون، اساس اثر فتوالکتریک در نتیجهٔ خروج الکترون‌ها از فلزی که در معرض نور قرار گرفته بود نشان داده شد. انرژی جنبشی فتوالکترون با طول موج پرتو تحریک‌کننده رابطهٔ معکوس دارد، در حالی که تعداد فتوالکترون‌هایی که خارج می‌شوند با شدت پرتو رابطه مستقیم دارند. توضیح این روابط به وسیلهٔ آلبرت اینشتن زمانی داده شد که وی طبیعت دو جانبهٔ پرتوافشانی را عنوان نمود و شرح داد که اثر فتوالکتریکی از جذب انرژی یک جزء نور مثلاً یک کوآنتم انرژی که در یک فوتون وجود دارد پدید می‌آید.

پرتاب هر الکترون در نتیجهٔ جذب یک کوآنتم از انرژی است که منجر به نابودی همان فوتون می‌شود. فوتون‌ها غیرقابل تقسیم هستند و تنها قسمتی از انرژی آنها قابل جذب شدن نیست. هر چقدر پرتوی که جذب می‌شود انرژی بیشتری داشته باشد، طول موج کمتری دارد و انرژی الکترونی که خارج می‌سازد بیشتر است .

در مقابل هرچقدر که شدت تابش بیشتر باشد، تعداد الکترونی که خارج می‌گردد زیادتر است.

جذب نور

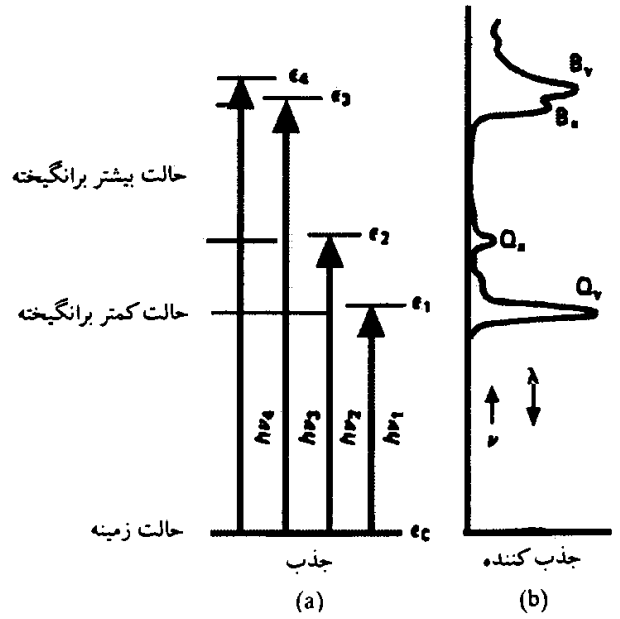
برای یک اتم وقتی که یک کوآنتم انرژی نور را جذب می‌کند چه اتفاقی می‌افتد؟ الکترون‌هایی که هستهٔ یک اتم را فرا گرفته‌اند در اوربیتال‌های جداگانه قرار دارند و هر یک از آن الکترون‌ها سطح انرژی ویژهٔ خود را دارد. اوربیتال‌هایی که به هستهٔ اتم نزدیک‌تر هستند دارای الکترون‌هایی با انرژی کمتر در مقایسه با الکترون اوربیتال‌هایی که دورتر از هستهٔ اتم قرار دارند می‌باشند. زمانی که یک فوتون جذب می‌شود الکترون تا حدودی انرژی لازم را به‌دست می‌آورد تا خود را از یک اوربیتال درونی به اوربیتال بیرونی برساند. تفاوتی که بین این دو حالت وجود دارد اصطلاحاً انتقال انرژی نامیده می‌شود.

از آنجا که تعداد محدودی اوربیتال وجود دارند که در آنها یک الکترون می‌تواند موجود باشد و هر اوربیتال نیز سطح انرژی مخصوص به خود را دارد، در نتیجه هر اتم تنها مقدار مشخصی فوتون جذب می‌نماید. تنها طول موج‌های مشخصی می‌توانند جذب گردند. طرح مقدار جذب در مقابل طول موج نور یک طیف (اسپکتروم) جذب برای ماده را به وجود می‌آورد. زمانی که کسی طیف (اسپکتروم) جذب را برای یک اتم ویژه آزمایش می‌کند درمی‌یابد که انرژی قابل دریافت در محدودهٔ بسیار کمی است به هر حال زمانی که مولکول‌های پیچیده‌ای همچون کلروفیل مورد ارزیابی قرار می‌گیرند، محدودهٔ جذب نور تقریباً وسیع است (شکل ۱۲-۲۱).

از مجموعهٔ این محدوده‌ها یک حالت برانگیخته به وجود می‌آید. یکی از چهار حالت برانگیخته در شکل ۱۲-۲۱ نمایش داده شده است که پایین‌ترین حالت (در نور قرمز) می‌باشد. زمانی که پروتون‌ها به بالاترین درجهٔ انرژی جذب می‌رسند، الکترون‌ها به کم‌ترین حالت (که با ایجاد گرما همراه است) قبل از آنکه بتوانند مورد استفاده قرار گیرند تنزّل می‌کنند.

حالت برانگیختهٔ یک مولکول یک حال غیرثابت است که معمولاً چیزی حدود 10^{-9} ثانیه به طول می‌انجامد. پیامدهای متعددی در حالت برانگیخته الکترون نظر به شرایط مختلف وجود دارد. اگر الکترون به اوربیتال کمتر باز گردد انرژی که به‌دست آورده، بایستی از دست بدهد. این انرژی می‌تواند به شکل فرّار و یا نور (فلورسان) رها شود.

در مورد مولکول کلروفیل که در کلروپلاست وجود دارد چنانچه انرژی الکترونِ برانگیخته شده در قالب نور و یا حرارت آزاد شود، کلروفیل به حالت اولیهٔ خود باز می‌گردد و انرژی جذب شده از فوتون به هدر می‌رود. این نتیجه‌گیری دقیقاً زمانی که کلروفیلِ محدود شده در داخل یک محلول را در معرض نور قرار دهیم قابل مشاهده است و ممکن است دریابیم که محلول قویاً فلورسان می‌شود زیرا انرژی جذب شده دوباره در طول موج‌های بلندتر منتشر می‌شود. به هر حال چنانچه شخصی این آزمایش را با کلروپلاست محدود شده‌ای انجام دهد که دارای مقادیر قابل توجهی کلروفیل باشد، در خواهد یافت که، تنها اندکی فلورسان حضور دارد که نشانگر خروج مقدار کمی انرژی جذب شده است. در عوض، همچنانکه قبلاً توضیح داده شد، الکترون انرژی‌دار قبل از این که موقعیّت بازگشت به اوربیتال با انرژی کمتر را به‌دست آورد به یک پذیرنده الکترون منتقل می‌شود. تخمین‌زده می‌شود که این انتقال در زمانی بین 10^{-12} ثانیه صورت می‌پذیرد.



شکل ۱۲-۲۱. a) تجسم سطح انرژی که بیانگر انتقال انرژی (فلش‌های عمودی) برای کلروفیل باکتری می‌باشد. تصویر همچنین به ماهیت کلروفیل a و b نیز پرداخته است. سطوح مختلف انرژی با سایه مشخص شده است. الکترون‌هایی که به سطح بالاتر انرژی انتقال یافته‌اند به کمترین حالتِ برانگیخته تنزّل سطح پیدا کرده و این در زمانی است که هنوز توسط پذیرنده الکترون اوّلیه دریافت نگردیده‌اند. b) نشانگر اسپکتروم جذب است که سطوح انرژی a را نمایش می‌دهد. این اسپکتروم ۹۰° از محور خود گردش می‌کند تا رابطه بین سطح‌های مختلف انرژی را نشان دهد.

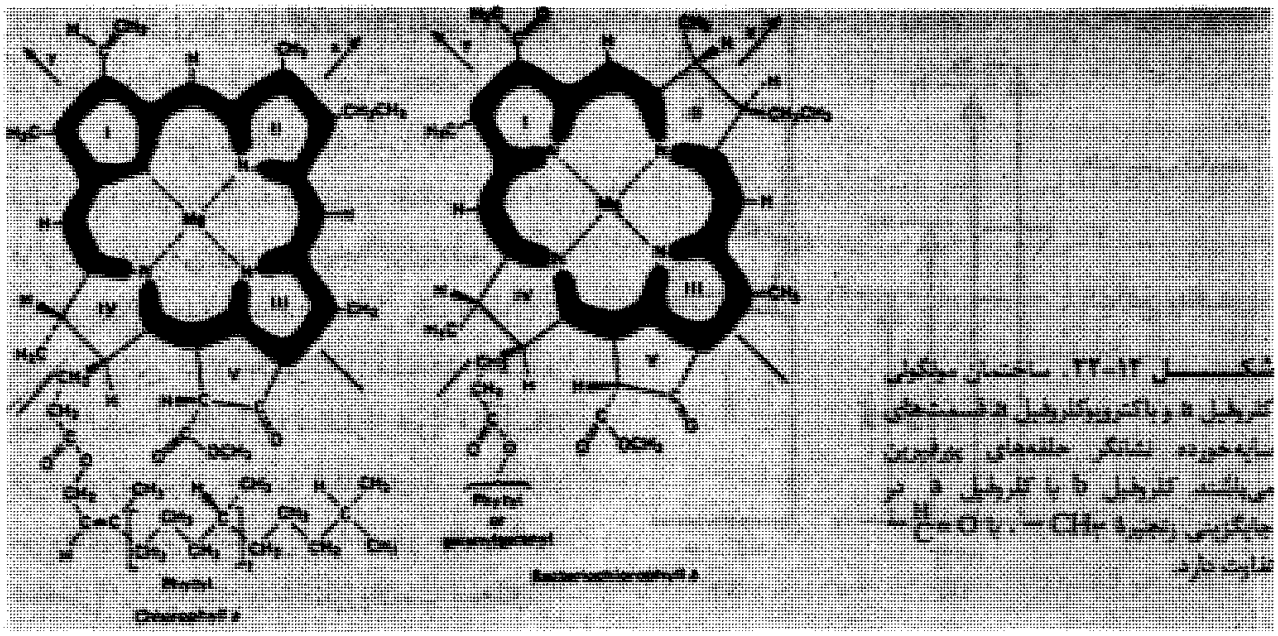
رنگیزه‌های فتوسنتزی

ظاهر سبز یاخته گیاهان در نتیجهٔ حضور رنگیزه کلروفیل در کلروپلاست می‌باشد که با قدرت زیاد طول موج نورهای آبی و قرمز را جذب کرده و در نتیجه طول موج سبز را منعکس می‌سازد. اساس ساختمان کلروفیل در شکل ۱۲-۲۲ نمایش داده شده است.

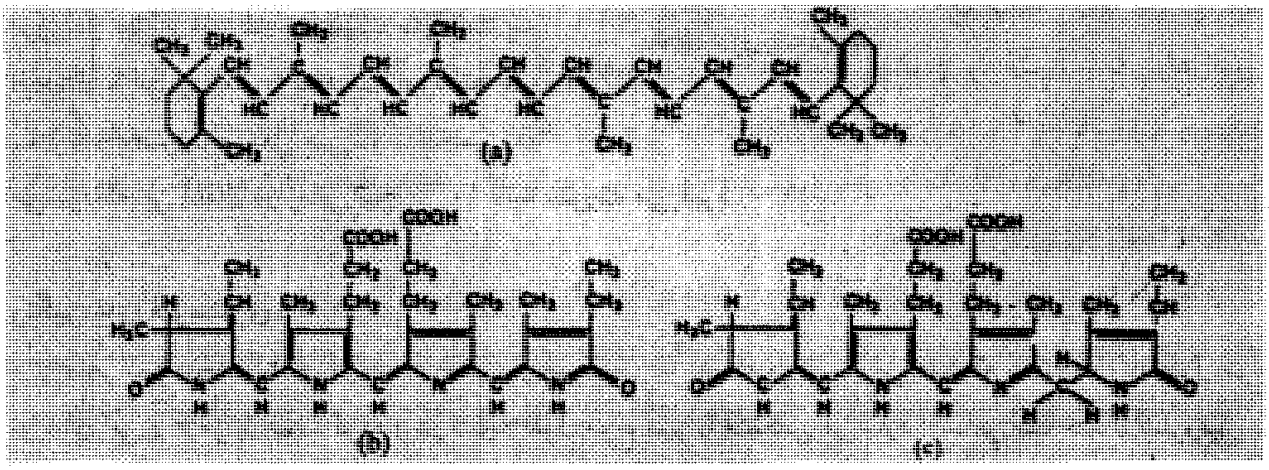
هر مولکول از دو قسمت تشکیل می‌شود. یکی از این قسمت‌ها حلقهٔ پورفیرین و جزء مواد آب‌دوست است و دیگری زنجیرهٔ آب‌گریز فیتول است که کلروفیل را در داخل ساختمان‌های غشایی درونی کلروپلاست نگهداری می‌کند. برخلاف هموگلوبین و یا میوگلوبین قرمز رنگ که دارای آهن هستند کلروفیل سبز شامل منیزیم است. هر پورفیرین دارای چهار زنجیرهٔ پیرولی که بین خود یک مولکول منیزیم را گرفته‌اند.

کلروفیل a در تمام ارگانیزم‌های فتوسنتزکننده‌ای که اکسیژن تولید می‌کنند وجود دارد ولی در انواع باکتری‌های سولفوری موجود نمی‌باشد. علاوه بر کلروفیل a، کلروفیل b در تمام گیاهان سبز عالی و جلبک‌های سبز موجود است در حالی که نوع سوم کلروفیل یعنی کلروفیل c تنها در جلبک‌های قهوه‌ای، آغازیان، دیاتومه‌ها و برخی تک یاخته‌ای‌ها وجود دارد.

پروکاریوت‌هایی که اکسیژن آزاد نمی‌کنند تنها شامل یک کلروفیل هستند که باکتریوکلروفیل نامیده می‌شود که تا



حدی با ساختمان انواع دیگر کلروفیل تفاوت دارد. گرچه کلروفیل‌ها رنگیزه‌های ضروری در یاخته‌های فتوسنترکننده هستند ولی تنها رنگیزه‌های فتوسنتزکننده نمی‌باشند. رنگیزه‌های دیگری نیز وجود دارد که یکی از آنها کارتنوئیدها و دیگری فیکوبیلین‌ها می‌باشند (شکل ۱۲-۲۳).



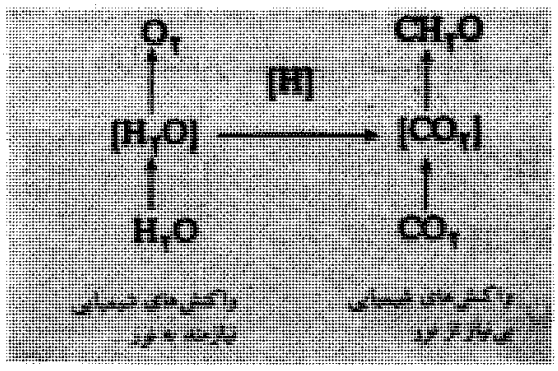
شکل ۱۲-۲۳. ساختار شیمیایی a) بتاکاروتن، b) (فیکوبیلین) و c) (فیکواریترین).

کاروتنوئیدها که به رنگ زرد مایل به پرتقالی هستند در بین جانداران فتوسنتزکننده به گستردگی وجود دارند در حالی که فیکوبیلین‌ها در جلبک‌های قرمز و سیانوباکترها وجود دارند. نقش هر یک از انواع مختلف این مولکول‌های جذب‌کننده نور در بخش‌های دیگر مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

واکنش‌های فتوسنتزی

آزمایش‌های بلاکمن نشان داد که فتوسنتز شامل دو سلسله واکنش: واکنش‌های فتوشیمیایی (نیازمند به نور) که، به جذب انرژی نوری بستگی دارد و واکنش‌های شیمیایی بی‌نیاز از نور است که به تولید کربوهیدرات‌ها و دیگر مواد پروتوپلاسم می‌انجامد.

براساس پژوهش‌های وان‌نیل و هیل، فرآیند فتوسنتز را می‌توان چنین خلاصه کرد:



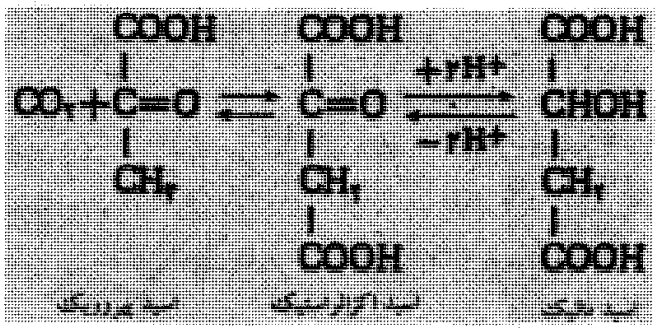
مولکول‌هایی که در میان کروشه‌ها قرار دارند نمایانگر مجموعهٔ واکنش‌های پیچیده‌ای هستند که به تولید O_2 و CO_2 احیاء شده (CH_2O) می‌انجامد. چنانکه دیده می‌شود، احیای CO_2 با انرژی نوری ارتباط مستقیم ندارد اما فرآورده‌های واکنش‌های شیمیایی برای انجام این کار لازم‌اند. اینک جزئیات هر دو سلسله واکنش بی‌نیاز از نور و نیازمند به نور شرح داده می‌شود:

واکنش‌های بی‌نیاز از نور

در اوایل قرن بیستم این نظریه رواج داشت که در اولین مرحلهٔ فتوسنتز، CO_2 احیاء می‌شود و فرم‌آلدئید تولید می‌کند. به عبارت دیگر، فرم‌آلدئید اولین محصول فتوسنتز است.

کوشش برای یافتن فرم‌آلدئید $(H-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-H)$ در گیاه بی‌نتیجه ماند و مهمتر آنکه پشناتز[1] به سال ۱۹۲۸ نشان داد که این ماده برای گیاه سمّی است. پژوهش‌های بعدی به روشنی نشان دادند که فرم‌آلدئید نمی‌تواند اولین محصول فتوسنتز باشد یا اصولاً در واکنش‌های فتوسنتزی نقشی داشته باشد.

چرخه کالوین



در سال‌های ۱۹۳۶ - ۱۹۴۰ معلوم شد که بعضی از باکتری‌ها می‌توانند از ترکیب اندیدریدکربنیک با اسیدپیرورویک[2]، اسیداگزالواستیک[3] بسازند. از احیای اسیداگزالواستیک نیز اسیدمالیک حاصل می‌شود.

پس از شناخت این واکنش‌ها در باکتری، به زودی معلوم شد که این واکنش‌ها خاص جاندار معینی نیست و عمومیّت دارد. مشکل شناخت واکنش‌های جذب CO_2 و احیای آن تا تشکیل کربوهیدرات در فتوسنتز، با کشف ایزوتوپ نشاندار کربن (^{14}C)، برطرف شد. واضح است که اگر برگ یا کلروپلاست جداشده از یاخته را در معرض CO_2 نشاندار قرار دهند، مواد حاصل از احیای این CO_2 دارای کربن نشاندار خواهند بود.

همزمان با استفاده از CO_2 نشاندار، روش تجزیهٔ جدیدی به نام کروماتوگرافی کاغذی[4] از اواخر قرن نوزدهم متداول شد، اما استفاده از روش کروماتوگرافی کاغذی در اواسط دههٔ ۱۹۴۰ کشف شد.

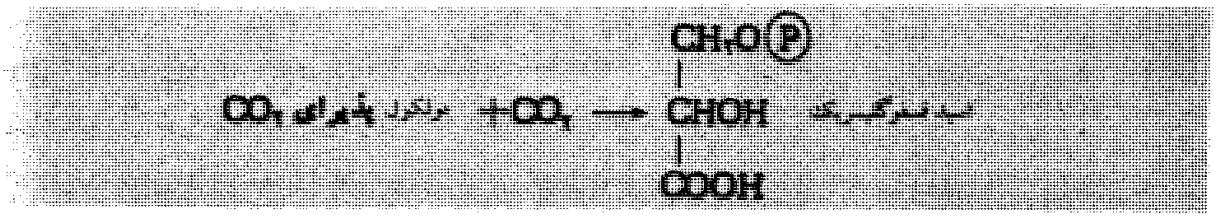
با استفاده از کربن نشاندار و روش کروماتوگرافی کاغذی، گروهی به رهبری کالوین و بنسون[5] (به سال ۱۹۴۹، در دانشگاه کالیفرنیا) موفق به شناسایی موادی شدند که در جذب CO_2 دخالت دارند.

این دانشمندان مقداری جلبک سبز را در معرض CO_2 نشاندار و نور قرار دارند. پس از گذشت قریب هفت ثانیه، در حدود دوازده مادهٔ دارای کربن نشاندار در جلبک ظاهر شد. برای شناسایی اولین ماده‌ای که پس از جذب CO_2 در فتوسنتز تولید می‌شود، زمان آرایش را به‌تدریج کوتاه‌تر کردند و توانستند حدود ۲ ثانیه پس از آغاز فتوسنتز، تنها یک

1- G.Paechnatz 2- Pyruvic acid 3- Oxaloacetic acid 4- paper chromatogaph
5- A.Benson کالوین به خاطر همین کشف به سال ۱۹۶۱ موفق به دریافت جایزه نوبل شد.

مادهٔ دارای کربن نشاندار در جلبک بیابند.

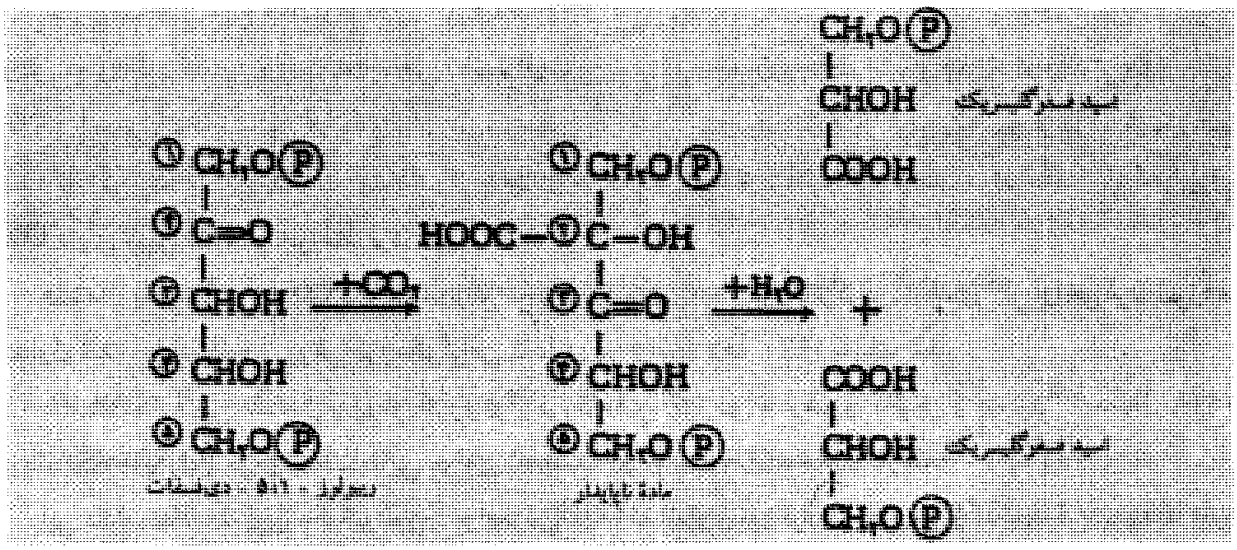
این مادهٔ نشاندار سه کربنی، اسیدفسفوگلیسریک[1] بود:



مرحلهٔ بعدی تعیین ماده‌ای دوکربنی بود که با CO_2 ترکیب شده مادهٔ سه کربنی اسید فسفوگلیسریک را به وجود آورده است. اما ماده‌ای دو کربنی به دست نیامد. تحقیق بیشتر نشان داد که مولکول پذیرای CO_2 ماده‌ای پنج کربنی به نام (ریبولوز - ۱، ۵ - بیس فسفات[2]) است.

بدیهی است که از ترکیب CO_2 و این ماده پنج کربنی، ابتدا باید ماده‌ای شش کربنی به وجود آید و سپس این ماده به دو مولکول اسیدفسفوگلیسریک تجزیه شود. از آنجا که مادهٔ شش کربنی احتمالاً ناپایدار است تاکنون به‌طور مشخصی در گیاه پیدا نشده است.

از پژوهش‌های بعدی گروه کالوین معلوم شد که در مراحل مختلف فتوسنتز مواد قندی چهار، پنج، شش و حتی هفت کربنی فسفات‌دار نیز تولید می‌شوند. با تعیین محل کربن نشاندار در مولکول قند و توجه به ترتیب زمان پیدایش هر کدام از این قندها، توانستند مسیر متابولیسم کربن را در فتوسنتز تعیین کنند. به‌علاوه نتیجهٔ تجزیه اسیدفسفوگلیسریک نشان داد که گرچه بیشتر کربن نشاندار در بنیان کربوکسیل متمرکز است اما تعدادی دیگر از کربن‌های این اسید نیز نشاندار هستند. بنابراین نتیجه گرفتند که کربن نشاندار غیرکربوکسیلی نمی‌تواند به‌طور مستقیم از مولکول CO_2 نشاندار باشد، بلکه باید به‌طور غیرمستقیم و از مواد نشاندار دیگری باشد و این امر در صورتی ممکن است که فرآیند احیای CO_2 به‌صورت چرخه باشد.



در چرخهٔ کالوین، بخشی از اسیدفسفوگلیسریک به قند تبدیل می‌شود و بقیه برای بازسازی ریبولوز- ۵،۱ - بیس‌فسفات (ماده پذیرای CO_2) مورد استفاده قرار می‌گیرد.

به‌طور کلی چرخه کالوین را می‌توان به‌صورت مراحل زیر خلاصه کرد:

1- phosphoglyceric acid

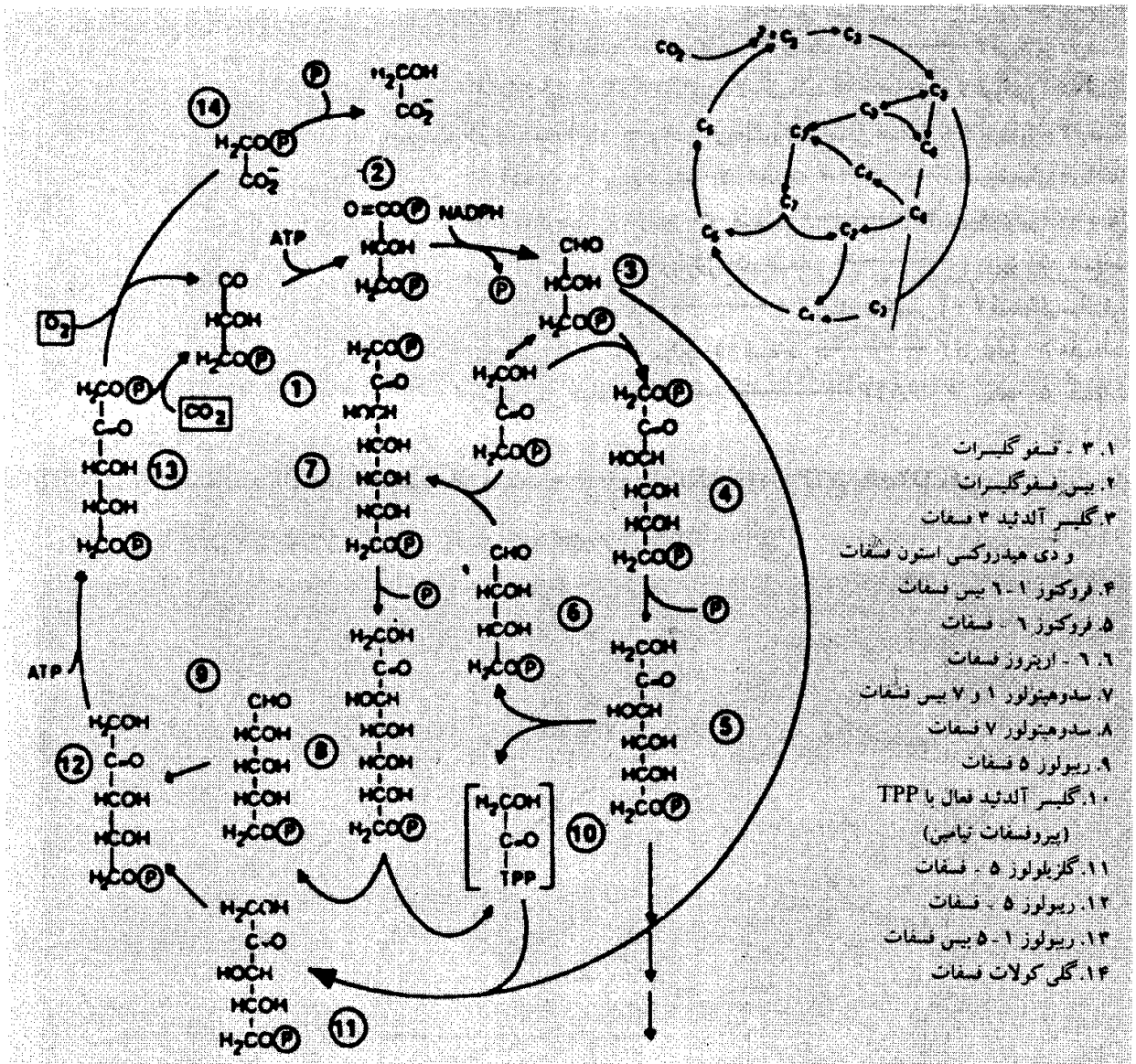
2- ribulose, 1,5 - bisphosphate

۱-کربوکسیلاسیون: در این بخش از واکنش یک ترکیب پنج کربنی به نام ریبولوز بیس فسفات ضمن ترکیب با CO_2 موجب تثبیت CO_2 می‌شود. و به این ترتیب ۲ مولکول ماده سه کربنی (به ازاء هر مولکول CO_2 که وارد چرخه می‌شود) به نام فسفوگلیسریک اسید (PGA) تولید می‌شود.

۲-احیاء: در این بخش از واکنش‌ها PGA ضمن ترکیب با H^+ و NADPH و ATP تولید گلیسرآلدئید ۳- فسفات می‌کند.

۳-بازسازی ریبولوز - ۵،۱ - بیس فسفات و تولید هگزوزها (قندی‌های شش کربنی): در این بخش از واکنش‌ها از ترکیب یک مولکول گلیسرآلدئید ۳- فسفات و یک مولکول دی‌هیدروکسی استون ۳- فسفات (که ایزومر یکدیگرند) تحت تأثیر آنزیم آلدولاز، فروکتوز ۱-۶ دی‌فسفات به‌دست می‌آید و از این ماده نیز فروکتوز ۶- فسفات و سپس فروکتوز ۱- فسفات حاصل می‌شود. مولکول‌های ماده اخیر می‌توانند موجب سنتز ساکارز و یا نشاسته شوند (شکل ۱۲-۲۴).

از هر شش مولکول گلیسرآلدئید ۳- فسفات تولید شده در چرخه کالوین یک مولکول صرف تولید هگزوزها و دیگر مواد آلی می‌شود. پنج مولکول دیگر آن صرف تشکیل مجدد ریبولوزبیس فسفات می‌گردند.



شکل ۱۲-۲۴. چرخه کالوین

در این مرحله مولکول‌های گلیسرآلدئید ۳- فسفات ضمن ترکیب با مولکول‌های فروکتوز ۶- فسفات و انجام چندین واکنش دیگر ماده‌ای به نام ریبولوز منوفسفات به وجود می‌آورند که ماده اخیر پس از ترکیب با ATP تشکیل ریبولوزبیس فسفات را می‌دهد. و به این ترتیب چرخهٔ کالوین آماده دریافت مولکول دیگری از CO_2 می‌گردد.

واکنش‌های چرخه کالوین را که منجر به تشکیل فروکتوز ۶- فسفات (که خود منشأ تشکیل سایر هیدرات‌های کربن است) می‌شود، می‌توان به‌صورت فرمول زیر خلاصه کرد:

$$۶CO_۲ + ۱۸ATP + ۱۲NADPH \longrightarrow F-۶-P + ۱۷Pi + ۱۸ADP + ۱۲NADP$$

(فروکتوز ۶- فسفات)

توضیح چرخهٔ کالوین، برای به‌دست آمدن یک قند شش کربنی (فروکتوز یا گلوکز) باید شش مولکول CO_2 جذب و احیاء شود:

(۱) ۶CO۲ + ۶ ریبولوزبیس فسفات ⟶ ۱۲ اسیدفسفوگلیسریک

(۲) ۱۲اسیدفسفوگلیسریک + ۱۲ATP + ۱۲NADPH ⟶
۱۲فسفوگلیسرآلدئید + ۱۲ فسفات + ۱۲ADP + ۱۲NADP

(۳) ۵ فسفوگلیسرآلدئید ⟶ ۵ دی‌هیدروکسی‌استن فسفات

(۴) ۳ فسفوگلیسرآلدئید + ۳ دی‌هیدروکسی‌استن فسفات ⟶ ۳ فروکتوز دی‌فسفات

(۵) ۳ فروکتوز دی‌فسفات ⟶ ۳ فسفات + ۳ فروکتوز -۶- فسفات

(۶) ۲ فروکتوز -۶- فسفات ⟶ ۲ [مادهٔ دوکربنی] + ۲ اریتروز -۴- فسفات

(۷) ۲ اریتروز -۴- فسفات + ۲ دی‌هیدروکسی‌استن فسفات ⟶ ۲ سدوهپتولوز دی‌فسفات

(۸) ۲ سدوهپتولوز دی‌فسفات ⟶ ۲ فسفات + ۲ سدوهپتولوز -۷- فسفات

(۹) ۲ سدوهپتولوز -۷- فسفات ⟶ ۲ ریبوز -۵- فسفات + ۲ [مادهٔ دوکربنی]

(۱۰) ۲ ریبوز -۵- فسفات ⟶ ۲ ریبولوز -۵- فسفات

(۱۱) ۴ فسفوگلیسرآلدئید + ۴ [مادهٔ دوکربنی] ⟶ ۴ گزیلولوز -۵- فسفات

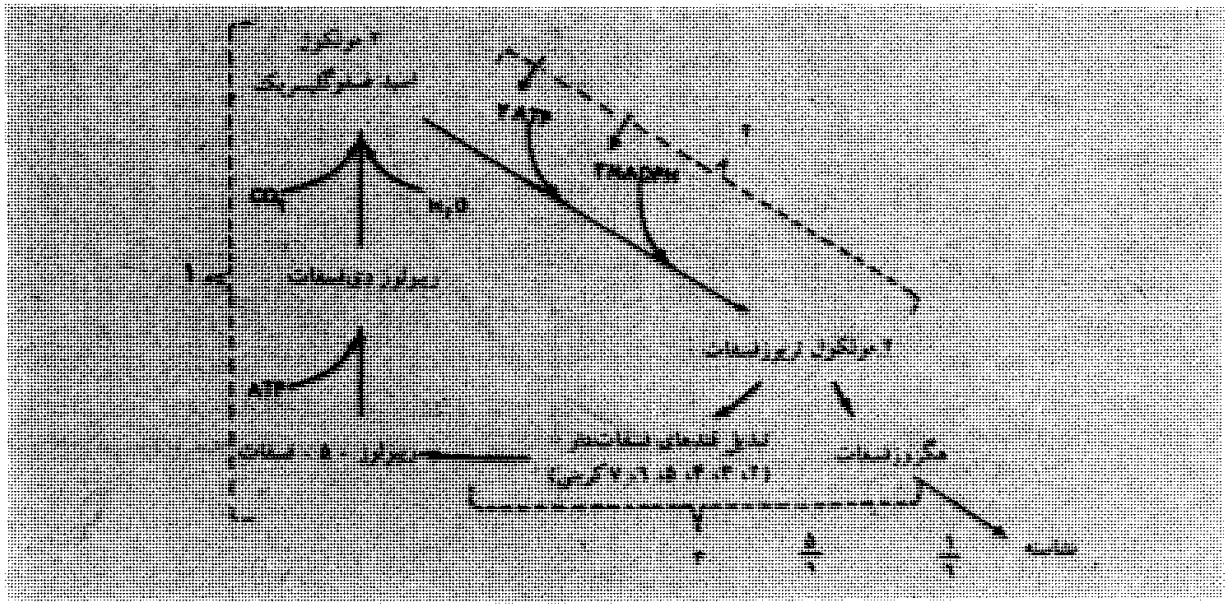
(۱۲) ۴ گزیلولوز -۵- فسفات ⟶ ۴ ریبولوز -۵- فسفات

(۱۳) ۶ ریبولوز -۵- فسفات + ۶ATP ⟶ ۶ریبولوزبیس فسفات + ۶ADP

جمع واکنش‌های ۱ تا ۱۳:

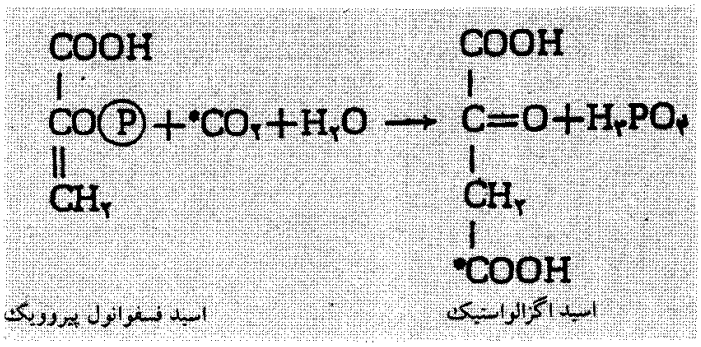
۶CO۲ + ۱۸ATP + ۱۲NADPH ⟶ فروکتوز -۶- فسفات + ۱۸ADP + ۱۷ فسفات + ۱۲NADP

مجموع واکنش‌های چرخه کالوین را می‌توان به‌صورت زیر خلاصه کرد:

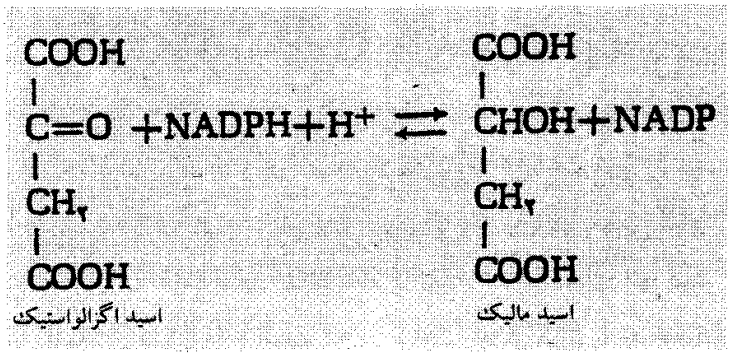


گیاهانی را که در آنها واکنش‌های چرخه کالوین با تشکیل اسیدفسفوگلیسریک سه کربنی به‌عنوان اولین ترکیب پایدار تشکیل شده ضمن تثبیت CO_2 همراه است گیاهان C_3 نامند.

چرخهٔ چهار کربنی فتوسنتز

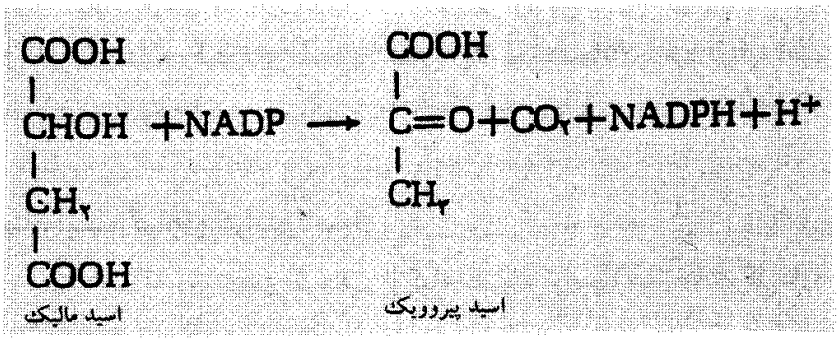


چنانکه شرح داده شد، اولین ماده پایداری که پس از جذب CO_2 در چرخه کالوین پدیدار می‌شود ماده سه کربنی (اسیدفسفوگلیسریک) است. پژوهش‌های بعدی نشان داد که در برخی گیاهان مثل نیشکر اولین ماده حاصل در واکنش‌های مرحله تاریکی فتوسنتز، اسیدی چهار کربنی به نام اسیداکسالواستیک است که به اسیدمالیک یا اسیدآسپاراتیک تبدیل می‌شود بنابراین مسیر کربن در فتوسنتز منحصر به چرخه کالوین نیست، بلکه در برخی گیاهان مسیر دیگری طی می‌شود که به دلیل تشکیل اسیداکسالواستیک (جسم چهارکربنی) یا اسیدمالیک به‌عنوان اولین ترکیب پایدار (جسم چهار کربنی) این مسیر را چرخه چهارکربنی[1] نامند. در این گیاهان مانند نیشکر و ذرّت در اولین واکنش مرحله تاریکی فتوسنتز، CO_2 با اسیدفسفوانول پیرویک ترکیب می‌شود و اسیداگزالواستیک تولید می‌کند:



سپس اسیداگزالواستیک با کمک H^+ و NADPH به اسیدمالیک تبدیل می‌شود.

اسیدمالیک نیز با از دست دادن CO_2 به اسیدپیرویک تبدیل می‌شود:



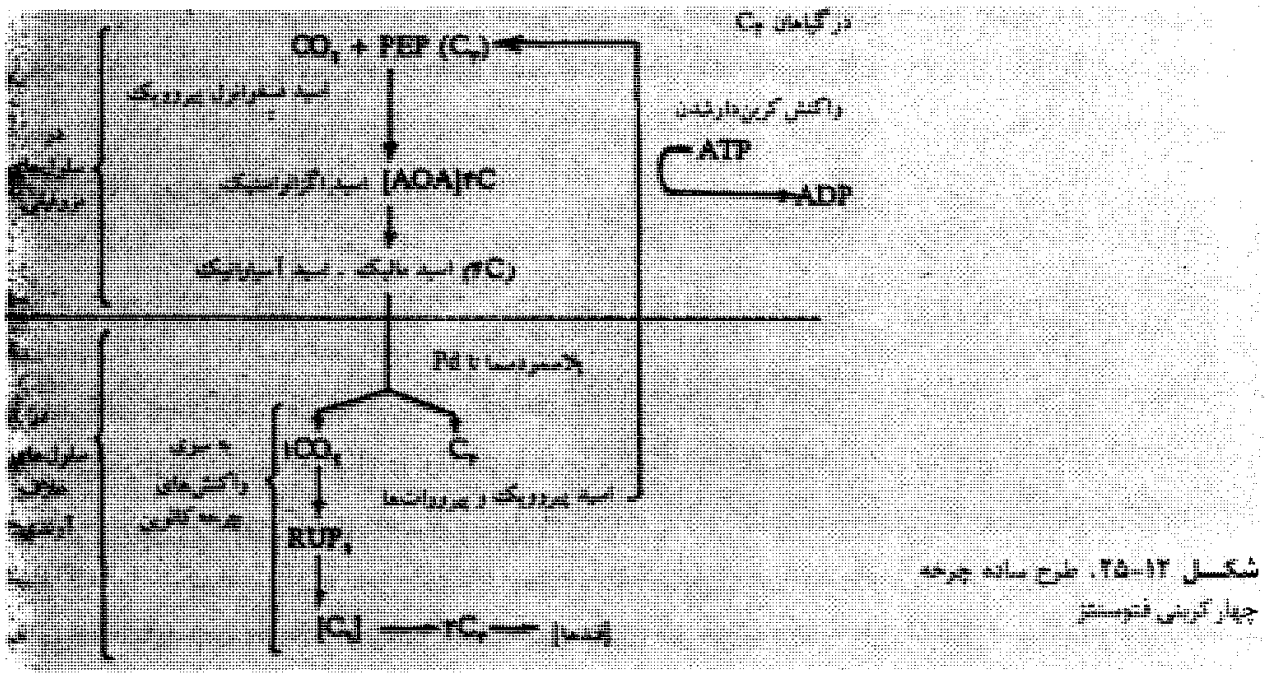
CO_2 وارد چرخهٔ کالوین می‌گردد و اسیدپیرویک هم، با گرفتن فسفات از ATP، به اسیدفسفوانول پیرویک (ماده اولیه پذیرای CO_2) تبدیل و این چرخه تکرار می‌شود.

در شکل ۱۲-۲۵، چرخهٔ چهار کربنی فتوسنتز، به صورتی ساده نشان داده شده است.

گیاهان چهار کربنی، علاوه بر آنزیم‌های مورد نیاز چرخهٔ چهار کربنی، دارای آنزیم‌های چرخهٔ کالوین نیز هستند. اما مواد لازم برای واکنش‌های این دو چرخه در یک یاخته وجود ندارند، در نتیجه واکنش‌ها در یاخته‌های متفاوت برگ انجام‌پذیر هستند.

ساختمان درونی برگ گیاهان سه کربنی و چهار کربنی یکسان نیست. چنان که در شکل ۱۲-۲۵ دیده می‌شود،

1- C_4Cycle



شکل ۱۲-۲۵. طرح ساده چرخه چهار کربنی فتوسنتز

پیرامون دسته‌های آوندی برگ ذرت (گیاه چهار کربنی) یک لایه یاختهٔ پارانشیمی به نام غلاف آوندی[1] قرار دارد، حال آنکه در برگ توتون (گیاه سه کربنی) چنین لایه‌ای دیده نمی‌شود. بین یاخته‌های غلاف آوندی فضایی وجود ندارد، نیز بین غلاف آوندی و دسته‌های آوندی فضایی دیده نمی‌شود، به‌علاوه غلاف آوندی، پیرامون نقطه انتهایی آوند را هم می‌پوشاند و در نتیجه انتقال مواد از یاخته‌های پارانشیمی برگ به دسته‌های آوندی باید از طریق یاخته‌های غلاف آوندی صورت گیرد. گرچه در برگ بعضی گیاهان سه کربنی نیز غلاف آوندی دیده می‌شود، اما یاخته‌های آن اغلب فاقد اندامک‌اند یا تعداد اندامک‌های آنها کمتر از اندامک‌های یاخته‌های دیگر برگ است.

آزمایش نشان داده است که در گیاهان چهار کربنی، چرخهٔ کالوین در کلروپلاست یاخته‌های غلاف آوندی و چرخهٔ چهار کربنی در کلروپلاست یاخته‌های مزوفیل انجام می‌گیرد (شکل ۱۲-۲۶). یاخته‌های مزوفیل و غلاف آوندی به وسیله رشته‌های سیتوپلاسمی (پلاسمودسماتا) با هم در ارتباطند و از همین راه بین آنها تبادل مواد صورت می‌گیرد.

متابولیسم گیاهان کراسولاسه‌ای[2]

می‌دانیم که روزنه‌های گروهی از گیاهان تیرهٔ کراسولاسه[3] مانند گل ناز، برخلاف روزنه‌های عموم گیاهان، در روز بسته‌اند و در شب باز می‌شوند.

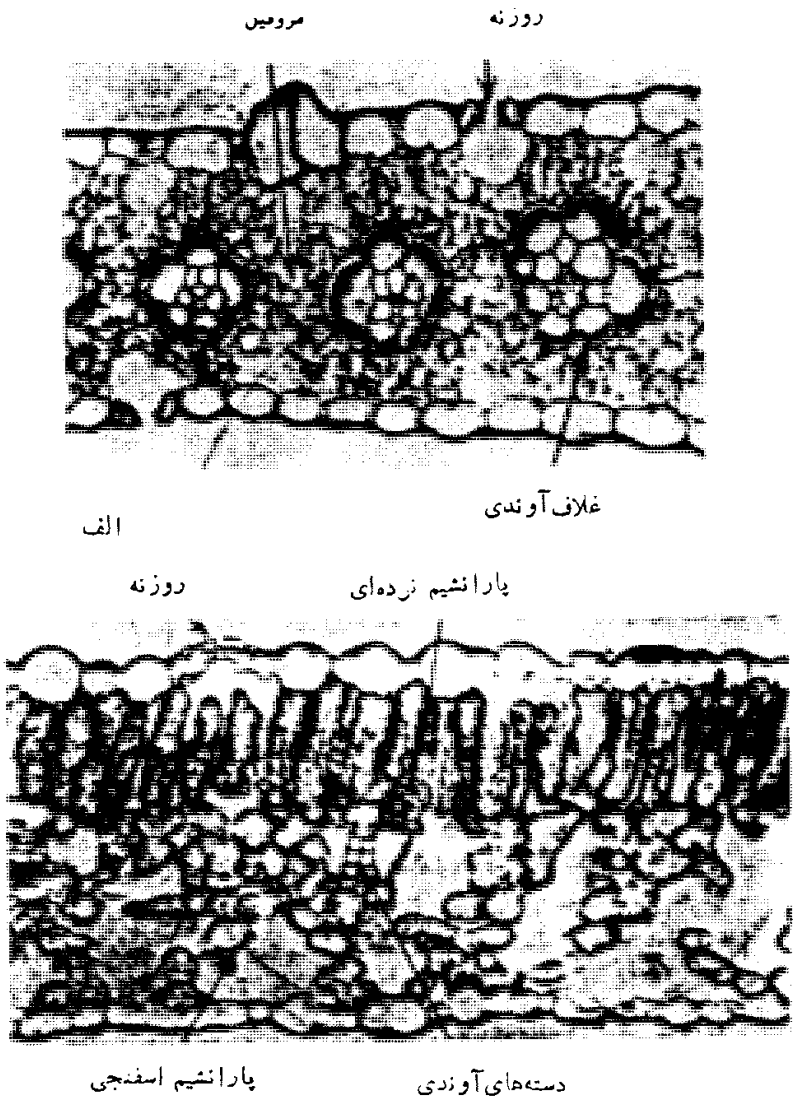
مقدار اسیدهای آلی برگ نیز در روز کاهش می‌یابد و در شب زیاد می‌شود. تغییر مقدار اسیدهای آلی، در تعدادی از گیاهان تیره‌های آناناس و ثعلب و کاکتوس (گل عقربی) نیز دیده می‌شود. این گیاهان، که عموماً متابولیسم اسیدی مشابه دارند و به‌طور کلی گیاهان کراسولاسه‌ای نامیده می‌شوند، دارای صفات مشترک زیراند:

(۱) همهٔ آنها برگ (و گاهی ساقه و دمبرگ) گوشتی دارند؛

(۲) قسمت بیشتر برگ گوشتی آنها را یاخته‌های مزوفیل کلروفیل‌دار تشکیل شده است؛

(۳) پیرامون دسته‌های آوندی آنها غلاف وجود ندارد؛

1- Bundle sheath 2- Crassulacean acid metabolism (CAM) plants 3- Crassulaceae



شکل ۱۲-۲۶. a) برش برگ ذرت (گیاه چهار کربنی)، b) برش برگ توتون (گیاه سه کربنی) در برش برگ توتون غلاف آوندی دیده نمی‌شود.

(۴) بیشتر این گیاهان ویژهٔ مناطق خشک و کویری‌اند، زیرا با بسته بودن روزنه‌ها در روز، سرعت تعرق را به کمترین حد می‌رسانند و بدین وسیله می‌توانند در مقابل کم‌آبی مقاومت کنند. تغییرات شبانه‌روزی PH و اسیدهای آلی برگ گیاهان کراسولاسه‌ای بیشتر مربوط به تولید اسید مالیک در تاریکی و مصرف آن در روز است (شکل ۱۲-۲۷). اسیدمالیک براساس مکانیسمی که در چرخهٔ فتوسنتز چهار کربنی شرح داده شد تشکیل می‌شود.

اسیدمالیک ⟶ اسیداگزالواستیک ⟶ اسیدفسفوانول پیرویک + CO_2

ترکیب CO_2 با اسیدفسفوانول پیرویک و تشکیل اسیداگزالواستیک و اسیدمالیک در تاریکی یا شب انجام می‌گیرد. اسیدمالیک، هنگام روز یا در روشنایی به CO_2 و اسیدپیرویک تبدیل می‌شود و CO_2 حاصل از این واکنش وارد چرخهٔ کالوین می‌گردد، تا به قند و نشاسته تبدیل شود.

توجه داشته باشیم که مسیر کربن در گیاهان چهار کربنی و گیاهان کراسولاسه‌ای تقریباً مشابه است و چرخه‌های کالوین و چهارکربنی را دربر می‌گیرد. تفاوت آنها در این است که واکنش‌های چرخه در گیاهان چهارکربنی در نقاط مختلف گیاه (یاخته‌های غلاف آوندی و مزوفیل)، و در گیاهان کراسولاسه‌ای در زمان متفاوت (شب و روز) انجام می‌گیرند. فتوسنتز گیاهان کراسولاسه‌ای تنها در یاخته‌های مزوفیل صورت می‌گیرد و به‌علاوه در شب واکنش‌های چرخهٔ چهارکربنی فعال‌اند و به متراکم شدن اسیدمالیک می‌انجامد، حال آنکه در روز یا در روشنایی فعالیت بیشتری متوجه چرخهٔ کالوین است و منجر به تشکیل قند و نشاسته می‌شود (شکل ۱۲-۲۸).

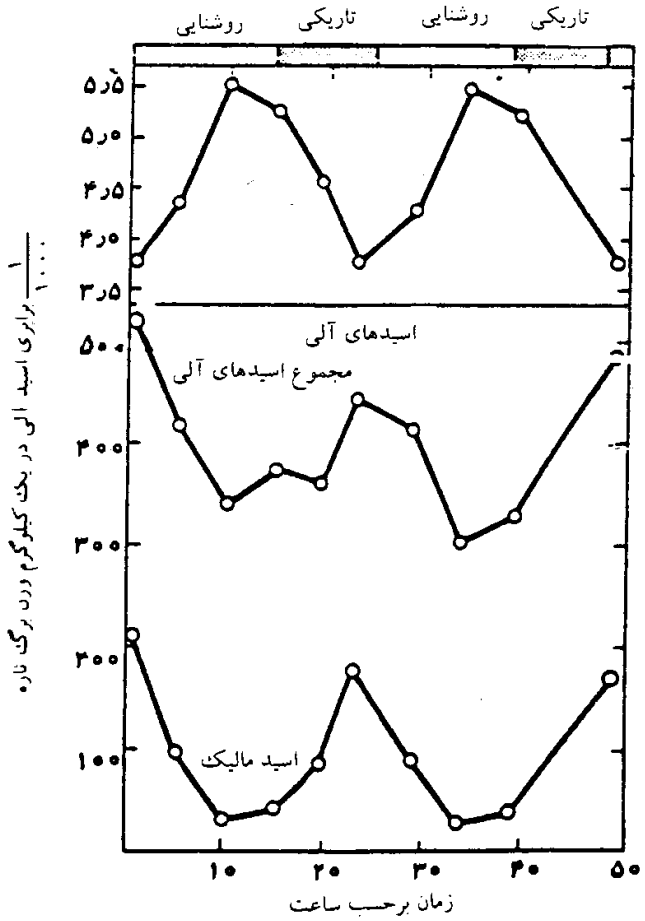
منشأ پلاست‌ها

الف: ماده وراثتی پلاست‌ها

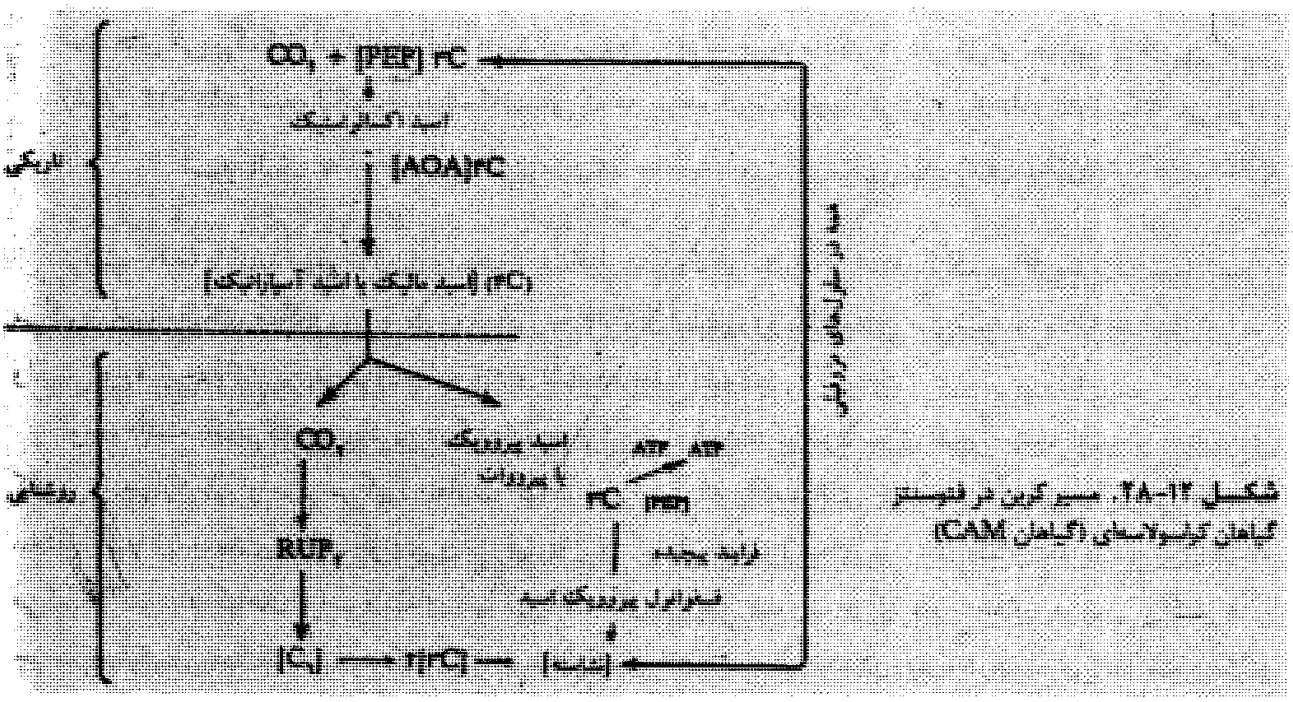
DNAی کشف شده در پلاست‌ها در سال ۱۹۵۰ از مولکول‌های ۴۰ تا ۵۰ میکرومتر حلقوی (بسته) که وزن مولکولی آنها بین ۰/۸۵ و $1/1\times10^{8}$ دالتون است و دارای حدود ۱۲۰ تا ۱۹۰ کیلو باز می‌باشد تشکیل شده است. این مولکول‌ها در بخشی از استرومای پلاست‌ها قرار دارند که نسبت به الکترون‌ها شفاف‌ترند و نوکلئوئید نامیده می‌شوند.

در پروپلاست‌ها تنها یک نسخه (یک مولکول) DNA وجود دارد، ولی در هر کلروپلاست بین ۱۰ تا ۳۰ مولکول از آن یافت می‌شود. تمایز به دنبال پلی‌پلوئیدی شدن است.

در کلروپلاست‌ها، نسخه‌ها اغلب به‌صورت سه‌تایی دسته‌بندی شده، به‌طور منظمی توزیع شده‌اند و در بخش پیرامونی اندامک و یا نزدیک یک تیلاکوئید قرار گرفته‌اند. در واقع اتصال به غشاء برای مضاعف شدن (مجموعه‌های چند آنزیمی لازم با غشاء متصل می‌شوند) متراکم‌شدن و توزیع به پلاست‌های پسر (سنتز ماده غشایی بین نقاط اتصال مولکول‌های خواهر جدایی آنها را امکان‌پذیر می‌سازد) سودمند می‌باشد.

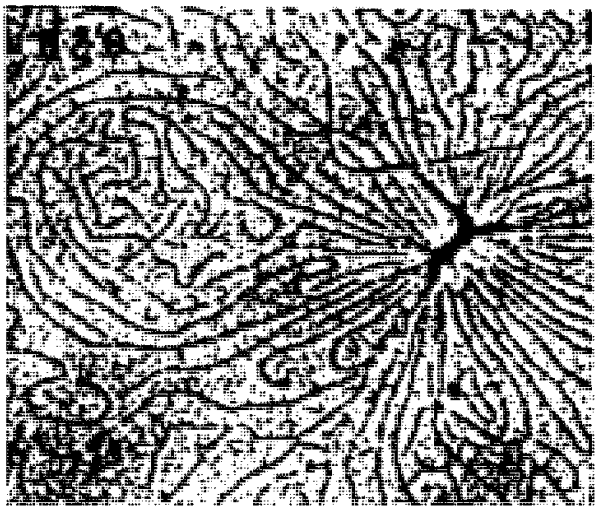


شکل ۱۲-۲۷. نمودار تغییرات شبانه‌روزی PH مجموع اسیدهای آلی و اسیدمالیک در برگ Bryophylum Calycinum: تغییرات PH بیشتر مربوط به تغییر غلظت اسیدمالیک است.



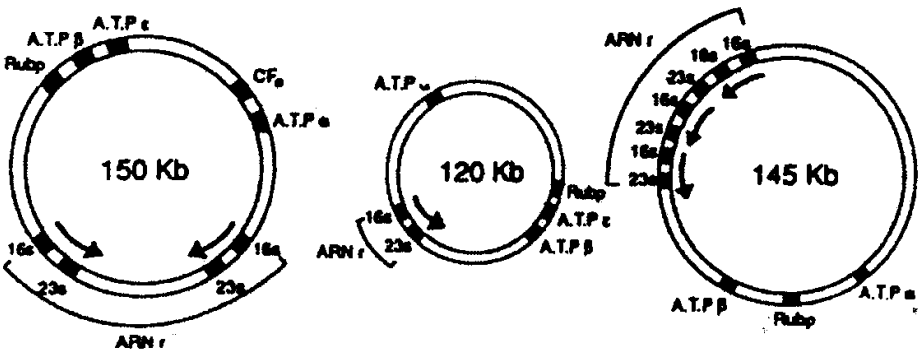
شکل ۱۲-۲۸. مسیر کربن در فتوسنتز گیاهان کراسولاسه‌ای (گیاهان CAM)

این DNA هرگز به هیستون‌ها متصل نیست، بنابراین با رشته‌های هسته‌ای[1] بسیار متفاوت است، با وجود این «برهنه» نیست، زیرا به سایر پروتئین‌های بازی متصل است، این پروتئین‌ها مولکول را به شکل تقریباً فشرده‌ای نگه می‌دارند (شکل ۱۲-۲۹)، که بسیار قابل مقایسه با ماده ژنتیکی در پروکاریوت‌ها می‌باشد.



شکل ۱۲-۲۹. DNA کلروپلاست اسفناج که به کمک روش‌های «ملایم» جداشده و با میکروسکوپ الکترونی بعد از گسترش و سایه‌دهی چرخشی، مشاهده شده است. دستجات DNA در اطراف جسمی مرکزی و فشرده سازمان می‌یابند (درشت‌نمایی ۵۰۰۰۰×) (کلیشه Y.Yoshida و همکاران، DNA کلروپلاست که از اسفناج به‌دست آمده است، زیست‌شناسی یاخته‌ای ۱۹۷۸، ۱۹۰ - ۱۸۷: ۳۲ که با اجازه انتشارات علمی Elsevier برداشت شده است ۱۹۷۸).

ژن‌های متعددی بر روی این مولکول حلقوی مستقر می‌باشند، ترتیب‌های[2] نوکلئوتیدی تمام DNA کلروپلاستی در تعدادی از گونه‌ها (توتون - مارکانسیا[3]) مشخص شده است، تاکنون مشخص شده است که: سازمان‌بندی ژنوم پلاستی تقریباً همگن است و ترتیب‌های DNAای برای رمزدار کردن پروتئین‌ها مشابه ترتیب موجود در باکتری‌ها می‌باشد. با وجود این بایستی یادآوری کرد که رونویسی (نسخه‌برداری) همانند رونویسی در هسته یاخته‌های یوکاریوتی است؛ اینترون‌ها[4] در بین بخش‌های اکزونی[5] وجود دارند (به‌خصوص در ژن‌هایی که زیرواحدهای درشت روبیسکو را رمزدار می‌کنند) این ساختار به‌عنوان یک صفت تکامل یافته تلقی می‌شود. همچنین در اکثر انواع، ترتیب‌های تکراری و معکوس شده وجود ندارد (شکل ۱۲-۳۰). این ترتیب‌ها RNAهای ریبوزومی (۱۶ و ۲۳S) را رمزدار می‌کنند، اندازه آنها کوچک است (کمتر از ۱۰ تا ۲۵Kb) و تعدادشان کم است (اغلب ۲ اوپرن[6] برای هر rRNA). در عین حال برخی گونه‌ها تنها یک اوپرن برای هر rRNA دارند، برخی دیگر چندین اوپرن به‌صورت پشت‌سرهم[7] که این حالت از موارد استثنایی می‌باشد.



شکل ۱۲-۳۰. استقرار چند ژن بر روی DNA حلقوی که از کلروپلاست اسفناج، نخود و اوگلنا استخراج شده است (ARNr، ژن‌هایی که RNAهای مختلف ریبوزومی را رمزدار می‌کنند، ATPα، β، ε و CF₀، ژن‌هایی که زیرواحدهای ATP سنتتاز را رمزدار، می‌کنند، RUBP ژنی که زیرواحد درشت روبیسکو را رمزدار می‌کند).

1- Nucleofilament 2- Sequenece 3- Marchantia 4- Introns 5- Exons
6- Operon 7- Tendem

در مورد کلی، که در اسفناج دیده می‌شود، دو اوپرن برای ژن‌های ریبوزومی وجود دارد و ترتیب آنها برعکس است. ممکن است فقط یک اوپرن وجود داشته باشد مانند نخود و یا چندین اوپرن به‌صورت پشت‌سرهم مانند اوگلنا.

ریبوزوم‌های پلاستی یا پلاستوریبوزوم‌ها از ریبوروم‌های سیتوپلاسمی کوچک‌تر می‌باشند (۱۷nm به جای ۸۰s)، بنابراین شباهت زیادی به ریبوزوم‌های باکتری‌ها ندارند. مانند باکتری‌ها به کلرامفنیکل[1] به‌عنوان بازدارنده سنتز پروتئین حساس و به سیکلوهگزیمید[2] غیرحساس می‌باشند.

نسخه‌برداری و همانندسازی در پلاست انجام می‌شود و RNA پلی‌مرازها و DNA پلی‌مرازها از استرومای پلاستی استخراج شده‌اند که، از نوع پلی‌مرازهای باکتری می‌باشند. ترتیب DNA لازم برای شروع و پایان نسخه‌برداری بسیار شبیه ترتیبی است که در پروکاریوت‌ها شناخته شده است.

همانندسازی DNA مستقل از همانندسازی DNA هسته‌ای است و از طرفی بسیار سریع‌تر از آن می‌باشد. در مورد ترجمه RNAهای پیک پلاستی، می‌تواند به وسیله یک سیستم بی‌یاخته‌ای باکتریایی انجام شود، ولی به وسیله سیستم بی‌یاخته‌ای سیتوپلاسمی انجام نمی‌شود، در اینجا نیز ترتیب‌هایی که در شروع و پایان ترجمه دخالت می‌کنند از نوع پروکاریوتی می‌باشند.

بنابراین سازمان‌بندی و نحوهٔ عمل ژنوم پلاستی، شباهت‌های زیادی با آنچه که در باکتری‌ها ملاحظه شده است، نشان می‌دهند که، مسئله مستقل بودن یا خودکاری (اتونومی) پلاست را در یاخته و در منشأ این اندامک‌ها مطرح می‌سازد.

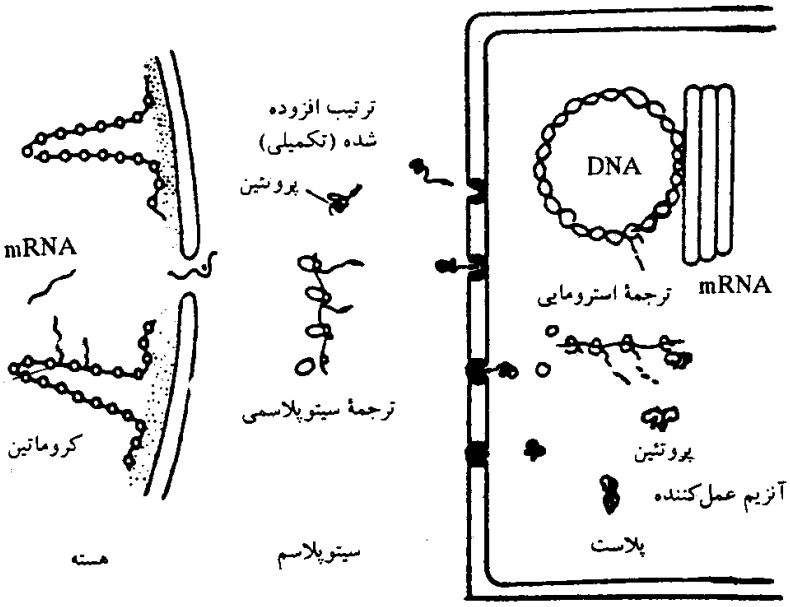
ب: *حدود استقلال (خودکاری) پلاستی*

تعداد زوج بازهای موجود در DNA پلاستی رمزدارکردن rRNAها و tRNAها و تقریباً ۸۰ نوع پروتئین ۳×۱۰^{۴} دالتون مطابقت دارد. از آنجا که بیش از ۲۰۰ پلی‌پپتید در یک کلروپلاست وجود دارد، بنابراین بعضی از آنها از اطلاعات ژنتیکی موجود در خارج پلاست، یعنی از کدهای هسته‌ای رمزدار شده‌اند. الزاماً یک همکاری بین ژنوم هسته‌ای و ژنوم پلاستی وجود دارد.

مطالعهٔ آزمایشگاهی عمل بازدارنده‌های سنتز پروتئینی ارزشیابی سهم نسبی دو ژنوم را در ساختن و نحوهٔ عمل پلاستی به ترتیب امکان‌پذیر می‌سازد. وقتی یاخته‌ها در حضور سیکلوهگزیمید (که سنتز پروتئین سیتوپلاسمی را متوقف می‌کند) و یک اسیدامینه رادیواکتیو کشت شوند، بین پروتئین‌هایی که بعد از جدایی پلاست‌ها به‌دست می‌آیند فقط آنهایی که در استرومای اندامک سنتز شده‌اند، نشان‌دار می‌گردند، آزمایش‌هایی از همین نوع که در حضور کلرامفنیکل انجام شده شناخت پروتئین‌های پلاستی ساخته شده در سیتوپلاسم را امکان‌پذیر می‌سازند. مطالعات تکمیلی که با سویه‌های جهش یافته و یا با سنتزهای آزمایشگاهی (سنتزهای در شیشه) به کمک DNA کلروپلاست‌های منفک انجام شده‌اند، نشان داده‌اند که برهم‌کنش‌های بسیار جالب می‌توانند مربوط به آنزیم‌های عمل‌کننده باشند؛ از جمله اغلب آنزیم‌هایی که در چرخه کالوین دخالت می‌کنند در سیتوپلاسم و برخی از آنها در استروما سنتز شده‌اند. این همکاری ممکن است مربوط به یک مجموعه باشد، برای مثال جزء بزرگ روبیسکو به وسیله ژنوم کلروپلاستی و جزء کوچک آن به وسیله ژنوم هسته‌ای رمزدار می‌شود (شکل ۱۲-۳۱)، زیرواحدهای α، β، ε و CF_0، در پلاست و زیرواحدهای γ و σ از هسته رمزدار می‌شوند. بسیاری از آنزیم‌ها و رنگیزه‌ها تحت وابستگی هسته‌ای می‌باشند: بنابراین وابستگی بین ژنوم‌ها وجود دارد.

این همکاری می‌تواند در طول زمان به‌خصوص هنگام تمایز اندامک‌ها تکامل یابد. بدین ترتیب در جریان تغییر

1- Chloramphenicol
2- Cycloheximide



شکل ۱۲-۳۱. همکاری نوکلئوپلاستی. mRNAها در سیتوپلاسم ترجمه شده‌اند، در دو انتهای NH_3 خود یک ترتیب تکمیلی دارند که تشخیص آنها را به وسیله ناقل‌های پوشش پلاست امکان‌پذیر می‌سازد. پس از نفوذ در استروما، در حالی که ترتیب تکمیلی حذف شده است، پلی‌پپتید دیگری که در استروما رمزدار و سنتز شده بپیوندد و آنزیم عمل‌کننده‌ای را تشکیل دهد.

شکل یک کلروپلاست به کروموپلاست، پروتئین‌ها از بین می‌روند (مثلاً روبیسکو)، در حالی که سایر پروتئین‌های آنزیمی یا ساختاری پایدار می‌مانند. به همین دلیل امکان مشخص کردن هیچگونه رونویسی یا ترجمه پلاستی در زمان این تبدیل‌ها امکان‌پذیر نبوده است. به خاطر بیاوریم که این تغییر شکل با کاهش ریبوزوم‌ها همراه می‌باشد.

سازمان‌بندی نوکلئوئید در دو نوع اندامک، کلروپلاست و کروموپلاست متفاوت است: گسترده‌های مورد بررسی وجود نوکلئوئیدهای بسیار فشرده‌ای که واقعاً رونویسی نمی‌شوند را در کروموپلاست‌ها نشان داده است. اما، مقایسه از راه دو رگه‌سازی ژنوم کلروپلاست و کروموپلاست یک گونه هیچگونه تخریب قابل ملاحظه‌ای را نشان نمی‌دهد. هم‌اکنون تصور می‌شود که تمایز کروموپلاست، به‌خصوص سنتز رنگیزه‌ها تحت کنترل هسته‌ای می‌باشد. ترجمهٔ mRNA در سیتوپلاسم انجام می‌شود و پروتئین‌های آنزیمی به کروموپلاست منتقل می‌شوند.

این تبادل‌ها که در مورد کلروپلاست به خوبی روشن شده است مسئله نفوذ پروتئین‌های سیتوپلاسمی را پیش‌رو قرار می‌دهد، پروتئین‌هایی که پس از نفوذ به پلاست بایستی در استروما بمانند یا در ساختمان تیلاکوئیدها وارد شوند. هم‌اکنون مشخص شده که پروتئین‌هایی که بایستی به پلاست نفوذکنند، به وسیلهٔ ریبوزوم‌های سیتوپلاسمی ترجمه شده‌اند و دارای یک ترتیب تکمیلی در سر N انتهایی خود هستند. این ترتیب ورود آنها به پلاست را با فرآیندی بسیار مشابه بانفوذ پروتئین‌ها به شبکه آندوپلاسمی امکان‌پذیر می‌سازد. در عین حال این دو فرآیند از هم قابل تشخیص هستند زیرا هیچگاه ریبوزوم به غشاء پلاست نمی‌چسبد. تصور می‌شود که گیرنده خاصی در غشاء پلاست وجود دارد که از بین پروتئین‌هایی که در سیتوپلاسم درگردش هستند آنهایی راکه در اعمال پلاست نقش دارند شناسایی می‌کند و ورود آنها به اندامک را تسهیل می‌کند. این ترتیب نشانه، هنگام نفوذ به اندامک بریده (قطع) می‌شود (شکل ۱۲-۳۱).

ج: منشأ پلاست‌ها از دیدگاه تکاملی

پلاست‌ها، به‌عنوان اندامک‌هایی مستقل، مانند میتوکندری‌ها، ساختارهای الزامی برای زندگی نیستند. پروکاریوت‌ها یاخته‌هایی کاملاً مستقل (خودکار) هستند که می‌توانند بر روی سوبستراهای مختلف نموّ کنند. برخی انواع آنها، از جمله سیانوباکتری‌ها و باکتری‌های فتوسنتزی با استفاده از پرتوهای نوری خورشید به‌عنوان منبع انرژی می‌توانند به حالت خودساز (اتوتروف) زندگی کنند.

مسئله جایگزینی این اندامک‌ها در یاخته‌های یوکاریوتی موضوع تحقیقات متعددی بوده است و چندین فرضیه

در این زمینه مطرح شده است که یکی از آنها نظریه درون همزیستی[1] است که، به نظر می‌رسد با آنچه هم‌اکنون از عمل یاخته‌ای می‌دانیم، سازگاری بیشتری دارد.

A. نظریه درون همزیستی : نظریه درون همزیستی از ۱۹۰۵ به وسیله مِرْشکوشْکی[2] پیشنهاد شد. این نظریه پلاست‌ها و میتوکندری‌ها را به‌عنوان جانداران پروکاریوتی و زنده به‌صورت همزیست در یاخته‌های یوکاریوتی مورد توجه قرار می‌دهد. از سال ۱۹۶۰ بود که این نظریه واقعاً پذیرفته شد، یعنی از وقتی متوجه شدند که پلاست‌ها و میتوکندری‌ها دارای اطلاعات وراثتی (DNA) و وسایلی که آن را بیان نماید (ریبوزوم‌ها) هستند و تکثیر آنها مستقل از تکثیر هسته است. این نظریه ابتدا بر روی دلایل زمانی[3] پایه گذاری شده است: در لایه‌های زمین‌شناسی آثار یاخته‌های پروکاریوت‌ها بین ۳ میلیارد و ۱ میلیارد سال پیش شناخته شده است، در حالی که آثار یاخته‌های یوکاریوتی تنها از یک میلیارد سال پیش قابل تشخیص‌اند. اما دلایل بیوشیمیایی بیشتر قابل قبول هستند از جمله: شکل حلقه‌ای DNA، نداشتن ساختار نوکلئوزومی، تشابه ریبوزوم‌های پلاستی و ریبوزوم‌های پروکاریوتی، همچنین کیفیت نسخه‌برداری، حساسیت مشابه به بازدارنده‌های سنتز پروتئین، تقسیم دوتایی و...

با وجود این همان‌طور که قبلاً دیده‌ایم، برهم‌کنش‌های بین پلاست یا میتوکندری با دیگر بخش‌های یاخته بسیار گسترده‌تر و مهمتر از برهم‌کنش‌هایی است که به‌طور معمول در یک همزیستی ساده مشاهده می‌شود: پلاست‌ها همانند میتوکندری‌ها مستقل (خودکار) نیستند، بلکه نیمه مستقل می‌باشند، بخش عمدهٔ سنتز پروتئینی آنها بستگی به اطلاعات ژنتیکی هسته‌ای دارد. پلاست‌ها نسبت به پروکاریوت‌های کنونی مقدار کمتری DNA دارند (نوکلئوتید آنها ۲۰ تا ۳۰ بار کوچک‌تر است) و بعضی از ژن‌های آنها دارای اینترون می‌باشند.

بنابراین در چارچوب این نظریه می‌بایستی قبول کرد که در جریان تکامل کاهش اهمیت ژنوم پلاستی روی داده است و تنها ژن‌های ضروری برای عمل اندامک حفظ شده‌اند. این کاهش به وسیله محیط یاخته‌ای که نسبت به محیط خارجی توانایی بیشتری دارد تسهیل شده است.

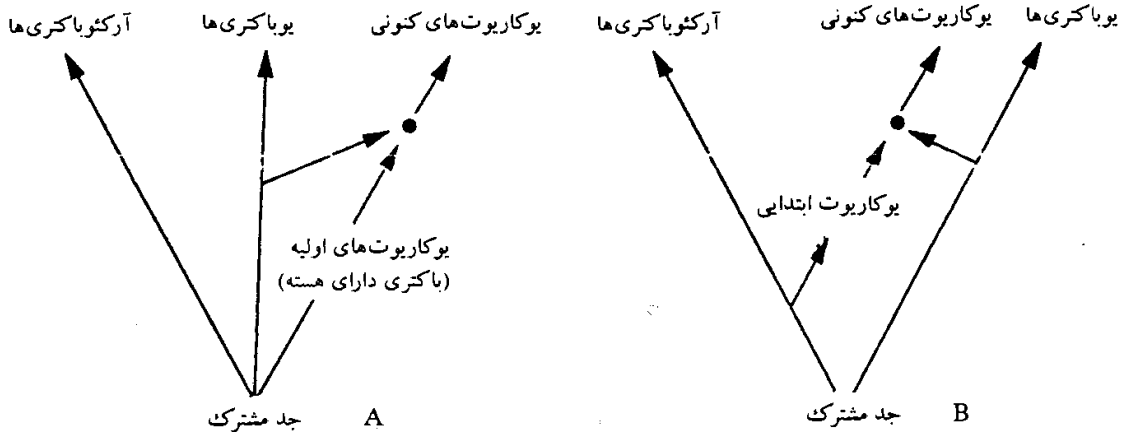
همچنین می‌بایستی وجود تبادل‌های مادهٔ وراثتی بین هسته و پلاست‌ها را پذیرفت، تجربیات دو رگه‌سازی بین DNA کلروپلاستی و DNA هسته‌ای نشان می‌دهند که ترتیب‌های مشترک وجود دارند. این تبادل ماده وراثتی از نقطه نظر مولکولی به خوبی شناخته نشده است. در عین حال می‌دانیم که تبادل‌ها فقط به پلاست - هسته محدود نمی‌شود. برای مثال در ذرّت تجارب دو رگه‌سازی نشان داده‌اند که DNA میتوکندریی، ترتیبی مشابه ترتیب ژن کلروپلاستی که زیرواحد بزرگ روبیسکو را رمزدار می‌کند، دارد.

در مورد اولین حالت‌های این وابستگی دیرینه‌ای، تصور این است که، میزبان پروکاریوت باکتریایی با پذیرفتن سیانوباکتری‌های اتوتروف که منشأ یاخته یوکاریوتی بوده است، توانسته است به حالتی نزدیک به آرکئوباکتری‌های[4] کنونی درآید.

در مورد جدّ پلاست‌های کنونی، احتمال دارد که منحصر به فرد نباشد، به نظر می‌رسد دو سویه بسیار زود تمایز یافته باشند:

- سویه‌ای که در آن درون همزیست، یک سیانوباکتری بوده است (شکل ۱۲-۳۲) که همانند گونه‌های کنونی بوده و گروه رنگیزه‌ای آن از فیکوبیلین‌ها است؛ این سویه منشأ رُدوفیکوفیت[5]های کنونی است؛
- سویه‌ای که درون همزیست آن شکلی نزدیک به پروکلورون[6] دارد (شکل ۱۲-۳۲ B). این پروکاریوت که

1- Endosymbiotique
2- Mereschkowski
3- Chronologique
4- Archeobacteies
5- Rhodophycophytes
6- Prochloron



شکل ۱۲-۳۲. بر بنای نظریه درون همزیستی پروکاریوت‌های کنونی سازمان‌بندی بسیاری نزدیک به پروکاریوت‌های اجدادی پلاست‌ها دارند. A. سیانوباکتری، B. پروکلورون.

اخیراً کشف شده است به‌صورت اجتماعی با جانوران دریایی (اسیدی‌ها[1]) زندگی می‌کند. این تنها پروکاریوت شناخته شده است که دارای کلروفیل b می‌باشد و می‌تواند به سویه‌ای تعلق داشته باشد که منشأ کلروپلاست‌های کلروفیت‌ها[2] (جلبک‌های سبز و گیاهان عالی) است.

در هر مورد غشاء پلاسمایی درون همزیست منشأ غشاء داخلی اندامک پلاستی است و غشاء خارجی آن غشاء حفره فاگوسیتوز[3] میزبان می‌باشد.

ارتباط‌های ممکن بین آرکئوباکتری‌ها، یوباکتری‌ها و یوکاریوت‌ها به خوبی شناخته شده است، چندین فرضیه در این زمینه پیشنهاد شده است. این فرضیه‌ها از این دیدگاه برای یوکاریوت اولیهٔ فاقد پلاست و میتوکندری و دارای طرح اولیهٔ بخش‌بندی درونی، منشأ آرکئوباکتری قائل هستند یا نه، از هم مشخص می‌شوند.

این نظریه که برای بیان منشأ پلاست‌های کنونی رضایت‌بخش است، انواع پلاست‌هایی را که به وسیلهٔ ۳ یا ۴ غشاء محدود می‌شوند دربر نمی‌گیرد. سازمان‌بندی این پلاست‌ها نیز می‌تواند با نظریه همزیستی تفسیر شود.

الف) احتمال دارد جدّ پروکاریوت (یا یوکاریوت) توانسته باشد به سیتوپلاسم خود، پلاست یا پلاست‌های یک جلبک واقعی را وارد کرده باشد این وضعیت همانند فرآیندی است که برخی جانوران انجام می‌دهند و با وابستگی به پلاست‌های کودیوم‌هایی که می‌بلعند به زندگی خود ادامه می‌دهند. بنابراین به دو غشاء پلاستی غشاء و حفره فاگوسیتوزی اضافه می‌شود. این وضع برای پلاستی که می‌تواند به وسیلهٔ سه غشاء محدود شده باشد، قابل توجیه است.

ب - همچنین جدّ پروکاریوت می‌توانسته است یک جلبک را به خود داخل کرده باشد، در این صورت این پروکاریوت هسته و سیستم غشاء داخلی خود را از دست داده و پلاستی با ۴ غشاء تشکیل شده است (غشاء حفره فاگوسیتوز + غشاء پلاسمایی جلبک + دو غشاء پلاست جلبک).

نظریه درون همزیستی، که نظریه «اشتراک‌های میکروبی با هم تکامل یافته» نیز نامیده می‌شود و بر روی دلایل بسیار جدّی بیوشیمیایی تکیه دارد، تفسیر ساختارهای مختلف پلاستیِ موجود کنونی را امکان‌پذیر می‌سازد.

B. سایر فرضیه‌ها: این فرضیه‌ها که تعدادشان کمتر است همگی بر این پایه استوارند که کسب (ایجاد) منطقه‌بندی (کده‌بندی) هنگام تشکیل یاخته یوکاریوتی از یک جدّ پروکاریوتی، با تفکیک گروه‌های ژنی که در اعمال اختصاصی دخالت داشته‌اند همراه بوده و به دنبال این منطقه‌بندی، ماده ژنتیکیِ تفکیک شده، توانسته است به صورتی مستقل در

1- Acidies 2- Chorophytes 3- Phagocytose

منطقه‌بندی‌های متفاوتی تحول و تکامل یابد. تبادل‌های بعدی بین هسته و پلاست موجب وضعیت کنونی شده است.

در مجموع، هم‌اکنون به نظر می‌رسد که پلاست‌ها، اندامک‌های مخصوص یاخته‌های گیاهی، دارای منشأ پروکاریوتی هستند که در دوره‌ای بسیار قدیمی با یک یاخته یوکاریوتی اجدادی همزیست شده است.

از این موجودات زنده بسیار ابتدایی، تکامل ساختارهای پلاستی در سه جهت انجام گرفته است:

الف) گسترش سطح نسبت به حجم که به‌خصوص برای کسب انرژی نورانی مناسب است؛

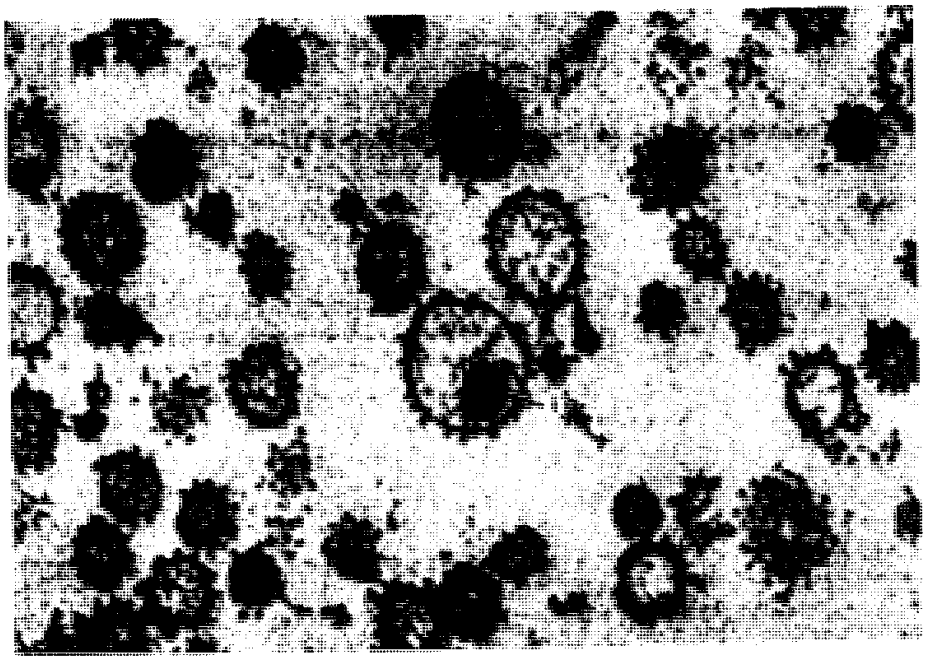
ب) گزینش انواع مختلفی از رنگیزه‌های پذیرندهٔ نور، تشکیل گیرنده‌های نوری بسیار مختلف را امکان‌پذیر می‌سازد، که زیست رخساره ۲۷۵ معین را قادر به کسب بیشتر انرژی نورانی می‌کند و استقرار در محیط‌های بسیار مختلف را مناسب می‌نماید.

پ) تخصصی شدن اعمال که منجر به تغییر ترکیب و ساختمان پلاست شده و موجب تولید انواع مختلف پلاست‌های عمل‌کننده شده است که می‌توانند به یکدیگر تبدیل شوند. تشکیل اندامک‌های فاقد فعالیت فتوسنتزی وابسته به تحوّل گیاهان خشکی‌زی و به ویژه نهاندانگان است؛ این پیدایش وابسته به استقرار در محیط هوایی (خشکی) است و امتیاز تکاملی قابل توجهی است زیرا این گیاهان توانایی آن را دارند که پلاست‌های خود را به حالتی نگهدارند که اگر فتوسنتز امکان‌پذیر نباشد، سایر فعالیت‌ها انجام شود. این کنترل اعمال پلاستی به احتمال زیاد، هسته‌ای است و بررسی چگونگی آن آغاز شده است.

۱۳ ریبوزوم‌ها

ریبوزوم‌ها از اندامک‌های بدون غشاء سیتوپلاسم همه یاخته‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی هستند که در سال ۱۹۵۳ به وسیلهٔ پالاد[1] کشف شده‌اند. این اندامک‌ها را دانه‌های پالاد نیز می‌نامند. از آنجا که سنتز پروتئین‌ها به وسیلهٔ ریبوزوم‌ها صورت می‌گیرد اهمیت زیادی دارند. ریبوزوم‌ها ذراتی بیش‌وکم کروی، متراکم (کدر) نسبت به الکترون‌ها هستند که قطرشان از ۱۴۰ تا حدود ۳۰۰ آنگستروم می‌رسد.

شناخت اولیه ریبوزوم‌ها مربوط به کارهای کلود[2] می‌شود که در ۱۹۴۱ با اولتراسانتریفوگاسیون افتراقی (مرحله‌ای) موفق به جداسازی ذراتی کوچک‌تر و سبک‌تر از میتوکندری‌ها یعنی «میکروزوم‌ها» شد. این میکروزوم‌ها ذراتی به قطر ۵۰۰ تا ۲۰۰۰ میکرون و سرشار از RNA بودند که در آنها آنزیم‌های مختلفی مثل گلوکز -۶- فسفاتاز، سیتوکروم C - ردوکتاز شناخته شد. این ذرات که از خرد شدن قطعات شبکه آندوپلاسمی ضمن اولتراسانتریفوگاسیون ایجاد می‌شوند می‌توانند حتی در شرایط آزمایشگاهی اسیدهای امینه رادیواکتیو را به سرعت در ساختمان پروتئین‌ها وارد کنند. برنارد[3] و همکارانش از ۱۹۵۴ نشان دادند که میکروزوم‌ها بر روی برش‌های بسیار نازک دیده نمی‌شوند و بنابراین نمی‌توان آنها را همانند مواد سازنده یاخته، یا به‌صورت اندامکی در نظر گرفت. با تهیه برش‌های بسیار نازک از توده‌های میکروزومی در نهایت مشخص شد که عده‌ای از این ذرات از دو بخش ساخته شده‌اند: یکی حفره‌های غشایی که از قطعات شبکه آندوپلاسمی ایجاد شده‌اند و دیگر ذرات کوچک و متراکمی که بر سطح این حفره‌ها چسبیده‌اند و همان ریبوزوم‌ها هستند (شکل ۱۳-۱).



شکل ۱۳-۱. نمای برشی نازک از تودهٔ میکروزومی در مشاهده با میکروسکوپ الکترونی که قطعات شبکه آندوپلاسمی و ریبوزوم‌های چسبیده بر سطح آنها را نشان می‌دهد. (برگرفته از کارهای G.E.Palade)

1- Palade 2- Claude 3- Bernhard

ریبوزوم‌ها به اشکال مختلفی در یاخته‌ها دیده می‌شوند:

- ریبوزوم‌های آزاد سیتوپلاسمی که در سیتوپلاسم یاخته‌های پروکاریوتی از نوع ۷۰S (دارای ضریب رسوبی ۷۰ S) و در سیتوپلاسم یاخته‌های یوکاریوتی از نوع ۸۰S یعنی بزرگ‌تر و سنگین‌ترند.
- ریبوزوم‌های چسبیده به غشاء شبکه آندوپلاسمی خشن (RER) که این حالت تنها در یاخته‌های یوکاریوتی که شبکه آندوپلاسمی دارند دیده می‌شود. همان‌طور که در فصل ۸ آمده است در این یاخته‌ها نسبت ریبوزوم‌های آزاد سیتوپلاسمی به ریبوزوم‌های چسبیده به غشاء شبکه، به حسب شرایط فیزیولوژیکی یاخته تغییر می‌کند و هرچه سنتز پروتئین‌های ترشحی و پروتئین‌های ساختمانی ویژه‌ای که در ساختمان غشاء شبکه آندوپلاسمی، غشاء کیسه‌های گلژی، لیزوزوم‌ها و پلاسمالم وجود دارند بیشتر باشد، نسبت ریبوزوم‌های چسبیده به غشاء شبکه نیز بیشتر می‌شود.

در یاخته‌های ترشحی آسینی‌های باز لوزالمعده که آنزیم‌های گوارشی مختلف را می‌سازند و یاخته‌های خونی که ایمنوگلوبین‌ها را می‌سازند تا ۹۰٪ ریبوزوم‌ها به غشاء شبکه آندوپلاسمی چسبیده‌اند، برعکس در رتیکولوسیت‌ها، بافت‌های مریستمی گیاهان و یاخته‌های عصبی رویانی بیشتر ریبوزوم‌ها آزادند. در یاخته‌های هِلا که نوعی از یاخته‌های سرطانی هستند تنها ۱۵٪ ریبوزوم‌ها به غشاء شبکه چسبیده‌اند.

- ریبوزوم‌های موجود در اندامک‌هایی مثل ریبوزوم‌های میتوکندری و ریبوزوم‌های کلروپلاستی: این ریبوزوم‌ها نیز تنها در یاخته‌های یوکاریوتی وجود دارند ضریب ته‌نشینی آنها برحسب گونه یاخته‌ها متفاوت است. (در میتوکندری‌های پستانداران حدود ۵۵S) و به هر حال سبک‌تر و کوچک‌تر از ریبوزوم‌های سیتوپلاسمی یاختهٔ مربوط هستند. از نظر ساخت و کار، حساسیتشان نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و بیش از آن ابعادشان، به ریبوزوم‌های پروکاریوتی شبیه‌اند.

ریبوزوم‌های سیتوپلاسمی، اندامکی و ریبوزوم‌های چسبیده به غشاء آندوپلاسمی می‌توانند به حالت منفرد (مونوزوم[1]) یا به حالت چندتایی (پلی زوم[2] = پلی‌ریبوزوم[3]) باشند. (مجموع حدود ۵ تا ۸۰ ریبوزوم را که به مولکولی از mRNA چسبیده‌اند، پلی‌زوم یا پلی‌ریبوزوم نامند). ریبوزوم‌ها تنها وقتی که به حالت پلی‌زوم باشند سنتز پروتئینی دارند. گاهی در سیتوپلاسم پلی‌زوم‌ها حالت مارپیچی یا حلزونی به خود می‌گیرند. فراوانی این نوع پلی‌زوم‌ها در یاخته را نشانه نوعی اختلال در فرآیند سنتز پروتئین می‌دانند.

تعداد ریبوزوم‌های یک یاخته تا حدود پانصدهزار می‌رسد. این تعداد در یاخته‌های مختلف و نیز در شرایط مختلف زیستی و فیزیولوژیکی در یک یاخته تغییرات زیادی دارد. در یک یاختهٔ باسیل‌کولی حدود ده‌هزار تا پانزده‌هزار ریبوزوم موجود است. در اغلب پروکاریوت‌ها حدود $۱۰^{۴}$، در یوکاریوت‌ها حدود $۱۰^{۵}$ تا $۱۰^{۷}$ و در اووسیت‌ها به‌طور معمول بیش از $۱۰^{۱۲}$ ریبوزوم وجود دارد.

عمر متوسط ریبوزوم‌ها در حدود ۶ ساعت است بنابراین بازسازی پیوسته آنها ضرورت دارد سرعت بازسازی در یاخته‌های مختلف ۱۰ تا ۱۰۰ ریبوزوم در هر ثانیه است. بازسازی ریبوزوم‌ها در یاخته‌های پروکاریوتی در سیتوپلاسم و بی‌تردید ضمن رونویسی از ژن‌های rRNA و در یاخته‌های یوکاریوتی به ترتیبی که خواهیم دید در ارتباط با هستک صورت می‌گیرد. ترکیبات بازدارنده رونویسی و همچنین سمّ آمانیتین که در قارچ آمانیتا وجود دارد این بازسازی را متوقف می‌کنند.

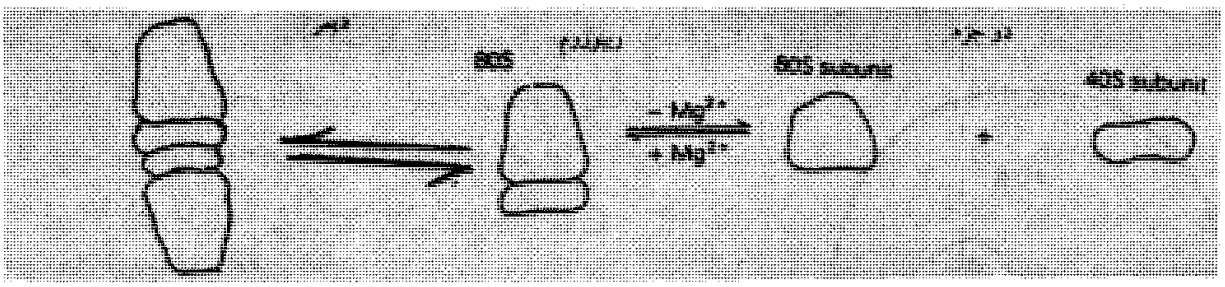
1- monosomes 2- polysomes 3- polyribosome

روش‌های جداسازی و مشاهده ریبوزوم‌ها

به روش‌های مختلف زیر می‌توان ریبوزوم‌ها را جداسازی و مشاهده کرد:

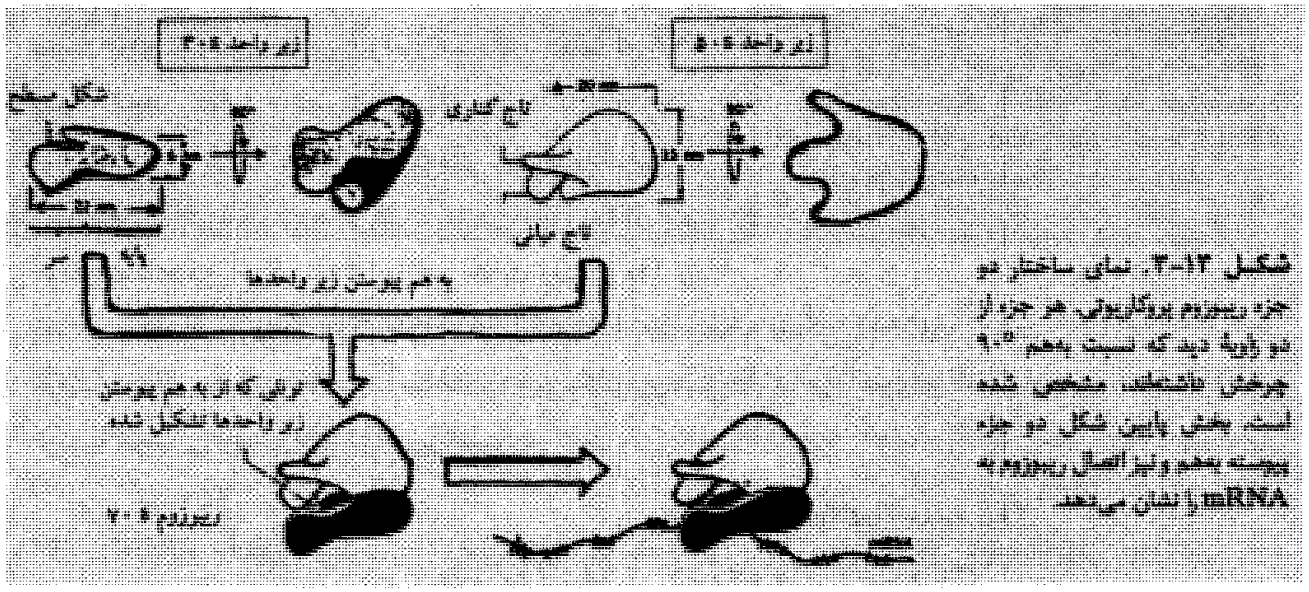
الف - ریبوزوم‌های آزاد سیتوپلاسمی را با استفاده از اولتراسانتریفوگاسیونِ عصاره همگن شده[1] یاخته در محلول ساکارز و حضور Mg^{++} جدا می‌کنند. اولتراسانتریفوگاسیون به مدت یک ساعت و g ۱۰۰۰۰۰ انجام می‌شود.

ب - برای جدا کردن ریبوزوم‌ها از غشاء شبکه آندوپلاسمی از دزوکسی کولات سدیم یا به کارگیری محلول‌های نمکی دارای غلظت مناسب و انجام اولترسانتریفوگاسیون استفاده می‌شود. تمام مراحل جداسازی بایستی با حضور غلظت مناسبی از یون‌های Mg^{++} صورت گیرد. این غلظت مناسب با استفاده از کلرورمنیزیم ۰/۰۱ مولکول‌گرم در لیتر تأمین می‌شود. در غلظت‌های زیاد آن (بیش از ۰/۱ مولکول‌گرم در لیتر) ریبوزوم‌ها به‌هم می‌چسبند و به حالت دیمر در می‌آیند و در غلظت ۰/۰۰۱ مولکول‌گرم در لیتر کلرورمنیزیم دو جزء ریبوزوم از هم جدا می‌شوند. شکل ۱۳-۲ نمای وضع ریبوزوم‌ها در غلظت‌های مختلف Mg^{++} را نشان می‌دهد.



شکل ۱۳-۲. نمایشی از وضع ریبوزوم در غلظت‌های متفاوتی از یون Mg^{++}. غلظت کم دو جزء مجزا هستند و با افزایش غلظت دو جزء به‌هم چسبیده و حتی دیمر ریبوزومی تشکیل می‌شود.

ریخت‌شناسی ریبوزوم‌ها خیلی پیچیده‌تر از آن است که قبلاً تصور می‌شده است. در باسیل‌کولی، بخش کوچک کشیده، خمیده و دارای دو انتهای متورم است. بخش کوچک در $\frac{1}{3}$ طول خود دارای دندانه‌ای کوچک است و مقابل به دندانه دارای قسمتی متراکم و پیچیده (Twist) است (شکل ۱۳-۳).



1- Homogena

بخش کوچک در گودی سطح فوقانی بخش بزرگ قرار گرفته است و حدود $\frac{1}{3}$ از حجم کل ریبوزوم را تشکیل می‌دهد (شکل ۱۳-۳).

بخش بزرگ که حدود $\frac{2}{3}$ از حجم کل ریبوزوم را شامل می‌شود دارای یک سطح گود (مقعر) و سه زائده (تاج) است. سطح مقعر جایگاه چسبیدن بخش کوچک ریبوزومی است. زوائد بخش بزرگ انگشت مانند، کوتاه و در انتها مدورند. زائده میانی بزرگ‌تر و زوائد جانبی کوچک‌ترند (شکل ۱۳-۳). بخش بزرگ ریبوزوم از نیمرخ حالتی شبیه صندلی راحتی با یک بخش پشتی و دو جای دست (ساعد) دارد.

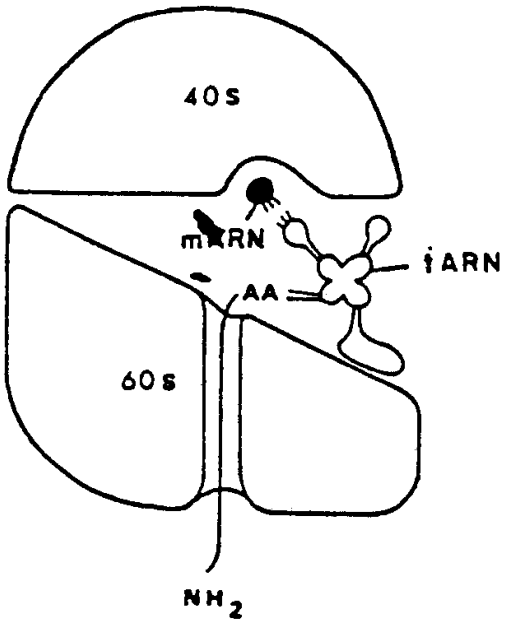
در یوکاریوت‌ها بخش بزرگ شبیه آن در باسیل‌کولی است امّا دارای یک زائده طویل است که به سوی سمت راستِ بخش بزرگ کشیده شده است.

ابعاد ریبوزوم‌ها: اندازه‌گیری ابعاد ریبوزوم‌ها به دلیل کوچکی آنها دشوار است. در پروکاریوت‌ها طول ریبوزوم‌ها ۲۹ و عرض آنها ۲۱ نانومتر است. در یوکاریوت‌ها، طول آنها ۳۲ و عرضشان ۲۲ نانومتر می‌باشد.

بخش بزرگ ریبوزوم دارای یک تونل است که توسط عده‌ای از پروتئین‌های این بخش احاطه (تشکیل) شده است. زنجیر پروتئینی در حال تشکیل از این تونل می‌گذرد (شکل ۱۳-۴).

با تأثیر آنزیم‌های تجزیه‌کننده پروتئین‌ها بر ریبوزوم‌های در حال سنتز پروتئین مشخص شده که این تونل می‌تواند بخش پپتیدی متشکل از ۳۰ تا ۴۰ اسیدامینه را بپوشاند و آن را در برابر عمل آنزیم‌ها محافظت نماید.

RNA پیک (mRNA) در فضای بین دو بخش ریبوزوم جا می‌گیرد، به نظر می‌رسد ریبوزوم بخشی از RNA پیک را که دارای ۲۵۰ نوکلئوتید است می‌پوشاند و آن را در برابر عمل تخریبی ریبونوکلئازها حفظ می‌کند.



شکل ۱۳-۴. نمایی از تونل جایگاه موقت زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی و جایگاه mRNA در بخش بزرگ ریبوزوم (برگرفته از کارهای D.D.Sabatini و G.Blobel) (شرح در متن آمده است).

در یاخته‌های رویانی جوجه که در دمای بالا قرار گرفته باشند، ریبوزوم‌های آزاد به‌صورت برگه‌هایی در می‌آیند که وضعیّتی بلور مانند دارند. تصور می‌شود که این بلورها از مجموعه‌ای از ریبوزوم‌های غیرفعّال ساخته شده که به RNA پیک نچسبیده‌اند و پروتئین سنتز نمی‌کنند. در برخی اووسیت‌ها نیز در شرایط عادی برگه‌های بلوری مشابهی از ریبوزوم‌های غیرفعّال دیده می‌شوند که در آغاز رشد و نمو مورد استفاده قرار می‌گیرند. اما در این حالت ریبوزوم‌ها آزاد نیستند و توسط زیرواحد بزرگ خود به غشاءهای زنده چسبیده‌اند (شکل ۱۳-۵).

ترکیب شیمیایی: ریبوزوم‌ها اساساً ساختمان ریبونوکلئوپروتئینی دارند. در باکتری‌ها که بیشتر مورد مطالعه بوده‌اند ترکیب شیمیایی ریبوزوم به شرح زیر است:

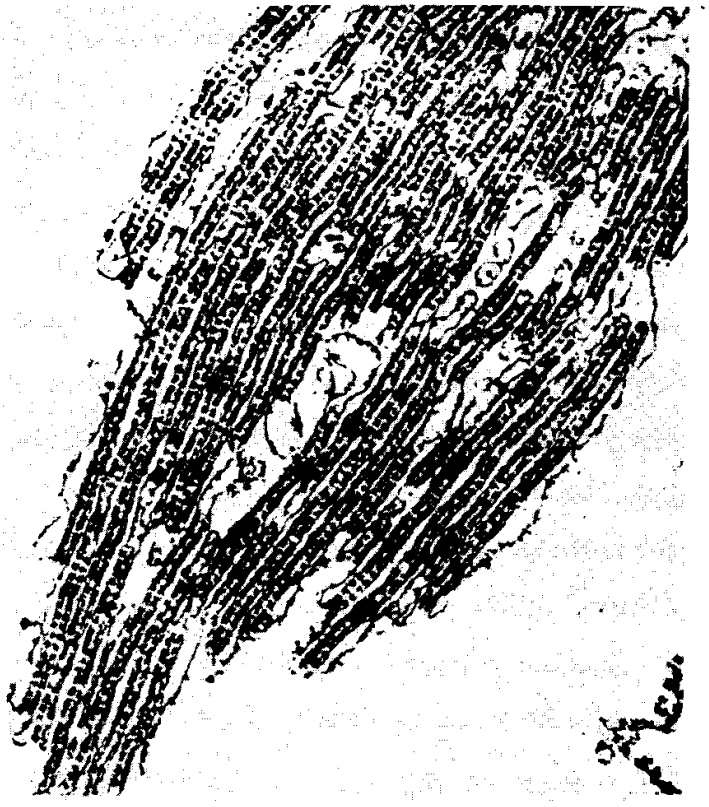
آب ۵۰٪

مواد جامد ۵۰٪ شامل:
- RNAها (rRnaها) حدود ۶۵٪
- پروتئین‌ها حدود ۳۵٪
- یون‌های Mg^{++} و Ca^{++}

در ریبوزوم‌های یوکاریوتی مقدار آب بیشتر و تا ۸۰ درصد وزن کل ریبوزوم می‌رسد. بررسی‌های جدید نشان می‌دهد که به‌طور کلی مقدار پروتئین‌ها و RNAها به ویژه در بخش بزرگ تقریباً برابر است.

جدول ۱-۱۳ اطلاعات بیشتری را در مورد ریبوزوم‌ها به‌دست می‌دهد.

مواد جامد اصلی سازنده ریبوزوم‌ها RNAها و پروتئین‌ها هستند که به مقادیر تقریباً مساوی در ریبوزوم‌های یوکاریوتی وجود دارند. ریبوزوم‌ها فاقد لیپید یا دارای مقدار کمی لیپید هستند. در ساختمان هر بخش ریبوزومی، RNAها در وسط و پروتئین‌ها در اطراف آنها قرار گرفته‌اند اما برخی بخش‌های RNA ریبوزومی برهنه مانده‌اند. بارهای مثبت پروتئین‌های ریبوزومی برای خنثی کردن بارهای منفی گروه‌های فسفات RNAهای آن کافی نیست و به همین دلیل ریبوزوم‌ها دارای بارهای منفی زیاد و به



شکل ۱۳-۵. میکروگراف الکترونی گرفته شده از یک اووسیت که بلورهای ریبوزومی را نشان می‌دهد. این ریبوزوم‌های غیرفعّال به غشاءها چسبیده‌اند و به منظور استفاده در اولین مراحل رشد و نمو مجتمع شده‌اند (برگرفته از کارهای P.N.Unwin).

جدول ۱-۱۳. این جدول برمبنای آگاهی‌های به‌دست آمده توسط وان‌هولد (Van Hold) است.

نوع ریبوزوم	ضریب ته‌نشینی	بخش‌ها	RNAها	تعداد انواع پروتئین
یوکاریوت‌ها	۸۰S	۶۰S ۴۰S	۵S و ۵/۸S و ۲۸S ۱۸S	۴۰ ۳۰
پروکاریوت‌ها	۷۰S	۵۰S ۳۰S	۵S و ۲۳S ۱۶S	۳۴ ۲۱
میتوکندری‌های پستانداران	۵۵S	۳۵S ۲۵S	۲۱S - ۳۱S ۲۱S	نامشخص

شدت بازوفیل (مثلاً پیرونیوفیل) هستند. آبی تولوئیدین و کاتیون‌ها را نیز به خود می‌گیرند.

RNAهای ریبوزومی: بیش از ۸۰ درصد کل RNAهای موجود در یاخته را تشکیل می‌دهند. فراوانی مقدار RNA در ریبوزوم‌ها موجب می‌شود که یاخته‌های دارای ریبوزوم زیاد به شدت به وسیلهٔ رنگ‌های بازی از جمله آبی‌تولوئیدین رنگ شوند.

ریبوزوم‌های پروکاریوتی دارای سه مولکول RNA هستند: RNAی ۱۶S در بخش کوچک و RNAهای ۲۳S و ۵S در بخش بزرگ هستند. در یوکاریوت‌ها، این RNAها درشت‌ترند (جدول ۱-۱۳). بخش کوچک دارای RNA۱۸S و بخش بزرگ دارای RNA۲۸S و ۵S است. به‌علاوه ریبوزوم‌های یوکاریوتی دارای RNA دیگری هستند

که مدت‌ها ناشناخته بود. وقتی RNA۲۸S به شدت گرم شود و یا به وسیلهٔ عامل دیگری از حالت طبیعی خارج شود، از آن بخش کوچکی جدا می‌شود که با پیوندهای غیرکووالانسی به‌هم متصل بوده‌اند. این RNA کوچک، RNA۵/۸S است که هنگام رونویسی RNA۱۸S و ۲۸S در هستک رونویسی می‌شود در حالی که سنتز RNA۵S در خارج از هستک صورت می‌گیرد (بیوسنتز ریبوزوم‌ها در بخش‌های بعدی خواهد آمد).

RNA ریبوزومی دارای ساختمان دوم بسیار پیچیده است. تقریباً ۷۰ درصد آن در نتیجهٔ جفت شدن بازها، دو زنجیره‌ای و مارپیچی است. این بخش‌های دو زنجیره‌ای به‌صورت (حلقه‌های سنجاق خوردهٔ مو) یا پنس هستند که در بین بخش‌های دیگر مولکول که حالت خطی دارند، قرار گرفته‌اند. ژن‌های RNA ریبوزومی دارای گوانین و سیتوزین زیادند و این ویژگی امکان می‌دهد تا آنها را در درجات غلظت کلرور منیزیم جدا کنیم.

RNAهای ریبوزومی علاوه‌بر دخالت در ساختمان ریبوزوم به دلیل ویژگی‌های طرز جفت شدن بازهایشان در سنتز پروتئین‌ها نیز سهم دارند. انتهای ´۳ در rRNA۱۶S دارای ترتیب مکمّلی از محّل اتصال اغلب RNAهای پیک پروکاریوتی به ریبوزوم‌ها است (چاین[1] و دالگارنو[2]، ۱۹۷۴).

عمل متقابل RNA ۱۶S و RNA پیک موجب تسهیل شناسایی سرابتدایی (نقطه شروع ترجمه) RNA پیک به وسیلهٔ بخش ۳۰S ریبوزوم هنگام چسبیدن RNA به این بخش می‌گردد.

RNA ۵S دارای ترتیب مکملی برای چهار نوکلئوتید (TψCG)(ψ= پزودویوراسیل) است که در همهٔ RNAهای ناقل وجود دارد و اساس اتصال RNA ناقل (tRNA) با ریبوزوم‌ها است.

وقتی این شناسایی انجام شد، tRNA، بر روی جایگاهی از RNA ۲۸S تثبیت می‌شود.

در غیاب RNA ۱۸S، بخش بزرگ نمی‌تواند به بخش کوچک ریبوزوم متصل شود. وجود RNA ۲۸S این اتصال را تسهیل می‌کند.

پروتئین‌های ریبوزومی: در باسیل‌کولی بخش کوچک ریبوزومی دارای ۲۱ پروتئین است که آنها را با علامت S (از Small = کوچک) و شماره‌های ۱ تا ۲۱ (S_1، S_2 ... S_{21}) نشان می‌دهند. بخش بزرگ دارای ۳۴ نوع پروتئین است که آنها را با علامت L (از large = بزرگ) و شماره‌های ۱ تا ۳۴ (L_1، L_2 ... ، L_{34}) مشخص می‌سازند. همهٔ این پروتئین‌ها متفاوتند. تنها پروتئین‌هایی که در هر دو زیرواحد مشابهند، S_{20} و L_{26} هستند. بنابراین ریبوزوم باسیل‌کولی در مجموع دارای ۵۴ پروتئین مختلف است. به جزء پروتئین S_1 که وزن مولکولیش ۶۵۰۰۰ است، بقیه پروتئین‌های ریبوزومی وزن مولکولی متفاوتی بین ۷۰۰۰ تا ۳۲۰۰۰ دالتون دارند.

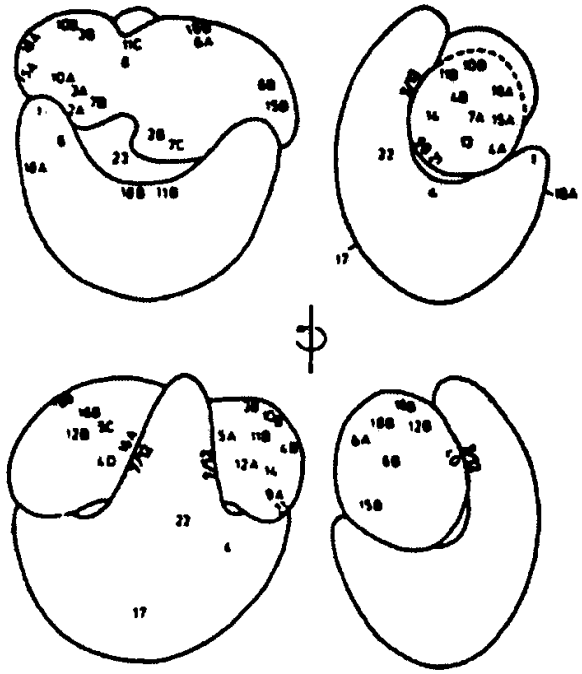
بیشتر پروتئین‌های ریبوزومی مقدار زیادی اسیدهای امینه بازی دارند و بنابراین دارای بارهای مثبت زیادند. تمام پروتئین‌های ریبوزومی تفکیک شده‌اند و پادتن‌های ویژه هر یک از آنها تهیه شده است و به کمک این پادتن و با استفاده از روش ایمنوفلوئورسانس، همچنین با استفاده از میکروسکوپ الکترونی و نیز به کارگیری معرف‌های شیمیایی، نقشه‌برداری از وضع پروتئین‌های هر زیرواحد و موقعیت آنها صورت گرفته و آگاهی‌های زیادی در این زمینه به‌دست آمده است (شکل ۱۳-۶).

این روش‌ها نشان داده است که، عده زیادی از پروتئین‌های هر بخش ریبوزومی به طرز مستقیم و با پیوندهای الکترواستاتیکی به نواحی ویژه‌ای از زنجیره‌های RNA ریبوزومی متصلند این پروتئین‌ها را پروتئین‌های اتصال اول نامند. شش پروتئین به RNA۱۶S، سه پروتئین به RAN۵S و یازده پروتئین به RNA۲۳S پیوسته‌اند.

پروتئین‌های اتصال اول به نوبه خود اتصال پروتئین‌های دیگری (پروتئین‌های اتصال دوّم) را با RNAهای

1- Shine 2- Dalgarno

ریبوزومی موجب می‌شوند. این اتصال براساس نظم دقیقی صورت می‌گیرد (ویتمن Witman، ۱۹۷۶ و کورلان Kurland، ۱۹۷۷).



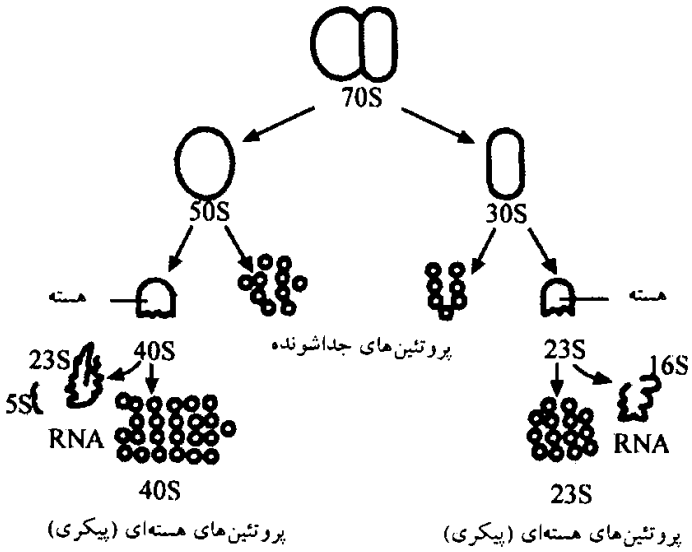
شکل ۱۳-۶. چهار حالت نمایی از ریبوزومِ باسیل‌کولی. شماره‌ها محل پروتئین‌های ریبوزومی را به صورتی که به وسیلهٔ ایمنومیکروسکوپی الکترونی مشخص شده است، نشان می‌دهد.

جداسازی و شناسایی پروتئین‌های ریبوزومی

از دیدگاه زیست‌شناسی یاخته‌ای و مولکولی، کارهای مربوط به جداسازی کلی یا جزئی پروتئین‌های ریبوزومی بسیار جالب توجه است. پژوهشگران به دنبال این جداسازی‌ها توانسته‌اند ساخت و کارشان را مشخص و بازسازی کنند. این بررسی‌ها موجب کشف نقش بسیاری از پروتئین‌های ریبوزومی شده است. برای مثال اگر ریبوزوم‌ها یا بخش‌های سازنده آنها در شیبی از کلرور منیزیم ۵ مولکول‌گرم در لیتر سانتریفوژ شوند، ۳۰ تا ۴۰ درصد از پروتئین‌هایشان را از دست می‌دهند. همچنین دو بخش ۵۰S و ۳۰S می‌توانند به دو ذرّه (یا دسته) غیرفعال تفکیک شوند که هر یک دارای RNA و چند نوع پروتئین (پروتئین‌های ویژه هر ذره یا پروتئین‌های هر دسته) هستند. همزمان با این تفکیک تعداد زیاد دیگری از پروتئین‌ها که آنها را پروتئین‌های جدا شونده (DP[1]) نامند از هر یک از دو ذره رها می‌شوند (شکل ۱۳-۷).

اگر برخی از این پروتئین‌ها مثل DP۵۰ و DP۳۰ به ذرّه مناسب با خود افزوده شود می‌تواند موجب بازسازی بخش فعال گردد. این بازسازی نسبی، سریع است و در ۳۷ درجه سانتیگراد می‌تواند در چند دقیقه صورت پذیرد.

به کمک تجربیات بازسازی که هر بار یک پروتئین در هر زیرواحد کسر بوده است، مشخص شده که بسیاری از پروتئین‌ها برای کار ریبوزوم لازمند. در بخش‌های آینده خواهیم دید که تحقیق در مورد کار ریبوزوم‌ها می‌تواند با مجموعه‌ای متشکل از: ریبوزوم‌ها، RNA پیک، اسیدهای امینه، عصاره یاخته‌ای دارای RNA ناقل و



شکل ۱۳-۷. نمای مراحل تفکیک دو جزء یک ریبوزوم ۷۰S. پروتئین‌ها را می‌توان به پروتئین‌های جداشونده و پروتئین‌های هسته‌ای (پیکری) تقسیم کرد. جزء ۵۰S دارای RNAهای ۲۳S و ۵S و جزء ۳۰S، RNA۱۶S را دارد.

1- Dissociated Proteins

آنزیم‌های فعال‌کنندهٔ اسیدهای امینه در خارج از یاخته انجام شود.

با افزودن RNAهای ریبوزومی ۱۶S به مخلوطی از پروتئین‌های به‌دست آمده از بخش ۳۰S توانسته‌اند. بخش ۳۰S فعالی را بسازند. چنین نتایجی با بخش ۵۰S نیز به‌دست آمده است (نومورا و هلد[1] ۱۹۷۴).

جالب است یادآور شویم که بازسازی کامل دو بخش ریبوزومی و ریبوزوم کامل به‌طور طبیعی (خودبه‌خودی) انجام می‌شود. این بازسازی بنا به اصل خودآرایی صورت می‌گیرد. تشکیل این اندامک با همه پیچیدگی‌های ساختمانی که دارد به وسیلهٔ میان‌کنش‌های سادهٔ فیزیکو - شیمیایی عده‌ای از ماکرومولکول‌های سازنده‌اش انجام می‌شود. این عمل در آزمایشگاه بدون کمک ساختارهای یاخته‌ای موجود از قبل، امکان‌پذیر است.

تفکیک بخش ۳۰S می‌تواند با استفاده از اوره ۴ مولکول‌گرم در لیتر و کلرورلیتیوم ۲ مولکول‌گرم در لیتر که همهٔ پروتئین‌ها را جدا می‌کنند، صورت پذیرد. اگر RNA۱۶S که به وسیلهٔ فنل جدا شده است در حضور ۲۰ پروتئین حاصل از بخش ۳۰S قرار گیرد، بازسازی بخش ۳۰S در دو مرحله صورت می‌گیرد: طرح زیر برای بیان این بازسازی پیشنهاد شده است.

بخش ریبوزومیِ ۳۰S فعّال $\xrightarrow{\text{پروتئین‌های S}}$ + ذرّاتِ IR*(فعّال) $\xrightarrow{\text{گرما}}$ ذرّاتِ IR غیرفعّال + RNA۱۶S $\xrightarrow[\text{پروتئین‌ها}]{R_1}$

در اولین مرحله که در دمایِ پایین انجام می‌شود، RNA۱۶S به تعدادی از پروتئین‌های ریبوزومی ۳۰S می‌پیوندد، و ذره IR را به وجود می‌آورد (این یک ذره بینابینی در بازسازی است) که فعال نیست. در مرحلهٔ دوّم ذرات IR تا ۴۰°C گرم شده‌اند. این عمل در حضور سایر پروتئین‌های باقیمانده در محیط است (که آنها را پروتئین‌های S می‌نامیم). به این ترتیب ذرات بینابینی فعال (IR) ایجاد می‌شوند. ظرف ۲۰ دقیقه زیرواحدهای ریبوزومی ۳۰S که کاملاً فعالند تشکیل می‌شوند. برخی پروتئین‌ها برای ترتیب و جایگزینی مناسب خود بایستی ابتدا به پروتئین‌های دیگری متصل شوند (به عبارت دیگر، به‌هم چسبیدن قبلی برخی پروتئین‌ها، اتصال با پروتئین‌های دیگر را تسهیل می‌کند). این روش تجزیه نشان داده است که برخی از پروتئین‌ها به احتمال نقشی ساختمانی در تشکیل ریبوزوم‌ها دارند در حالی که عده‌ای دیگر در کارهای ویژه ریبوزوم‌ها دخالت می‌کنند.

بررسی ساخت و کار ریبوزوم‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی نشان می‌دهد که این ریبوزوم‌ها شباهت ساختمانی خیلی زیادی ندارند اما کارشان شبیه است و هر دو، مجموعه واکنش‌های شیمیایی مشابهی را انجام می‌دهند.

رمز ژنتیکی برای تمام موجودات زنده یکی است و ریبوزوم‌های یوکاریوتی RNAهای پیک باکتریی را به دقت ترجمه می‌کنند. در عین حال، ریبوزوم‌های یوکاریوتی حجیم‌تر از ریبوزوم‌های پروکاریوتی هستند و بیشتر پروتئین‌هایشان متفاوت است. آنتی‌بیوتیک‌های زیادی از جمله کلرامفنیکل ریبوزوم‌های باکتری را از کار می‌اندازند اما بر ریبوزوم‌های یوکاریوتی اثری ندارند (این اختلاف اساس استفاده از عده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها در پزشکی است). سیکلوهگزامید سنتز پروتئین به وسیلهٔ ریبوزوم‌های یوکاریوتی را متوقف می‌سازد. ریبوزوم‌های میتوکندری و کلروپلاست با ریبوزوم‌های باکتری‌ها مشابهند و عمل آنها به وسیلهٔ کلرامفنیکل متوقف می‌شود. ریبوزوم‌های دو رگه‌ای که از به‌هم پیوستن یک بخش از ریبوزوم‌های باکتری و یک بخش از ریبوزوم‌های کلروپلاستی تشکیل شده باشند، از نظر سنتز پروتئین کاملاً فعالند. در یوکاریوت‌ها ریبوزوم‌هایی که از به‌هم پیوستن بخش‌های ریبوزومی گیاهان و پستانداران ایجاد شده باشند از نظر سنتز پروتئین فعّالند. اما اگر یکی از بخش‌ها، از ریبوزوم‌های باکتری

1- Nomura & Held

باشد غیرفعال می‌گردند. البته شباهت‌های ساختمانی نیز بین ریبوزوم‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی وجود دارد. تجربه‌های بازسازی ریبوزوم‌ها نشان داده است که پروتئین‌های L_7 و L_{17} باسیل‌کولی می‌تواند به وسیلهٔ پروتئین‌های همتای به‌دست آمده از ریبوزوم‌های پستانداران جایگزین شود. این قبیل تجربه‌ها نشان می‌دهند که شباهت کمی بین ریبوزوم‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی وجود دارد اما کار اصلی در همهٔ جانداران یکسان است (وایتمن، ۱۹۷۶ و ۱۹۷۷).

خلاصه

ریبوزوم‌ها ذرات کوچک‌تر از حدّ دید میکروسکوپ نوری هستند که از اسیدهای ریبونوکلئیک و پروتئین‌ها ساخته شده‌اند و در سنتز پروتئین‌ها نقش اساسی دارند. در پروکاریوت‌ها، ریبوزوم‌ها در سیتوپلاسم آزادند در حالی که در یوکاریوت‌ها عده‌ای از آنها به غشاء شبکه آندوپلاسمی چسبیده‌اند. این تعداد به حسب نوع یاخته متغیر است. در هر دو حال ذخیره‌ای از بخش‌های ریبوزومی در یاخته موجود است که هنگام هر دورهٔ سنتز پروتئین مورد استفاده قرار می‌گیرد.

در یوکاریوت‌ها، هر ریبوزوم تقریباً کروی و دارای قطری حدود ۲۳ نانومتر و ضریب ته‌نشینی ۸۰S است و از یک بخش بزرگ (۶۰S) و یک بخش کوچک (۴۰S) تشکیل شده است. در پروکاریوت‌ها، ریبوزوم‌ها کوچک‌ترند (۷۰S) و به دو بخش ۵۰S و ۳۰S تفکیک می‌شوند. هنگام سنتز پروتئین‌ها عدهٔ زیادی از ریبوزوم‌ها به یک مولکول RNA پیک می‌چسبند و یک پلی‌ریبوزوم یا پلی‌زوم را به وجود می‌آورند.

میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها دارای ریبوزوم‌هایی با ابعاد کوچک‌تر هستند (شکل ۱۳-۴ مدلی از ریبوزوم و شرح تفضیلی بخش‌های آن را نشان می‌دهد). RNA پیک در فضایی بین دو زیرواحد جا می‌گیرد و در آنجا شیار یا تونلی برای عبور زنجیرهٔ پروتئینیِ در حال تشکیل وجود دارد.

RNA ریبوزومی بیش از ۸۰ درصد کل RNA موجود در یاخته را شامل می‌شود. بخش بزرگ ریبوزوم یوکاریوتی دارای RNAهای ۲۸S، ۵/۸S و ۵S است. بخش کوچک دارای RNA۱۸S می‌باشد. تنها RNA۵S در خارج از هستک سنتز می‌شود.

حدود ۷۰ درصد از RNAهای ریبوزومی دو زنجیره‌ای و مارپیچی هستند. این بخش‌ها به‌صورت (حلقه‌های سنجاق خوردهٔ مو) یا پنس‌هایی هستند که در آنها، بازها با یکدیگر جفت شده‌اند. پروتئین‌ها به صورتی سازمان یافته به RNAهای مختلف ریبوزومی متصل شده‌اند. ژن‌های RNA ریبوزومی مقدار زیادی سیتوزین و گوانین دارند. RNAهای ریبوزومی در سنتز پروتئین‌ها نقش دارند؛ سر ′۳ در $tRNA$ی ۱۶S باکتری‌ها مکمل محل اتصال RNAهای پیک با ریبوزوم‌ها است و ترتیبی از بازها در RNA۵S مکمل ترتیب TψGC در RNA ناقل است.

در باسیل‌کولی بخش کوچک ریبوزومی دارای ۲۱ پروتئین (S_1 تا S_2) و بخش بزرگ دارای ۳۴ پروتئین (L_1 تا L_{34}) است. همه این پروتئین‌ها جز یکی از آنها در دو بخش متفاوت هستند و وزن مولکولی آنها بین ۷۰۰۰ تا ۳۲۰۰۰ دالتون است. محل بسیاری از این پروتئین‌ها در ریبوزوم شناخته شده است.

حدود ۴۰ درصد از پروتئین‌ها به راحتی از دو بخش ریبوزومی جدا می‌شوند (پروتئین‌های جداشونده) و ذرّه‌ای (هسته‌ای) را بر جای می‌گذارند که دارای RNAها و بقیّهٔ پروتئین‌ها است که، به‌طور فشرده‌تری به RNAهای ریبوزومی پیوسته‌اند.

بازسازی زیرواحدهای فعال با افزودن پروتئین‌های جداشونده به ذرّه (هسته) مرکزی به آسانی امکان‌پذیر است.

بازسازی کامل هر بخش با افزودن RNAی متناسب و مجموعه‌ای از پروتئین‌ها میسر است. بازسازی بخش ۳۰S به شرح زیر صورت می‌گیرد:

RNA۱۶S + $\xrightarrow[\text{پروتئین‌ها}]{R_1}$ ذرّاتِ IRغیرفعّال $\xrightarrow{\text{گرما}}$ ذرّاتِ IR(فعّال) $\xrightarrow{\text{S پروتئین‌ها}}$ ۳۰S

یکی از ذرات بینابینی (IR) در سرما تشکیل می‌شود، بازسازی نهایی با فعّال شدن این ذرّه به وسیلهٔ گرما صورت می‌گیرد. به کمک تجربیات بازسازی که در آنها تنها یک پروتئین در هر بار کسر بوده است، اطلاعاتی در مورد نقش هر یک از پروتئین‌ها در ریبوزوم به‌دست آمده است. بازسازی ریبوزوم‌ها مثال جالبی از پدیدهٔ خودآرایی است. از نظر طرز عمل ریبوزوم‌های یوکاریوتی با ریبوزوم‌های پروکاریوتی اختلاف ندارند اما ریبوزوم‌های یوکاریوتی درشت‌تر هستند و پروتئین‌هایشان متفاوت است. عمل برخی از بازدارنده‌ها نیز بر روی این ریبوزوم متفاوت است؛ به‌عنوان مثال کلرامفنیکل بر ریبوزوم‌های پروکاریوتی و سیکلوهگزامید بر عمل ریبوزوم‌های یوکاریوتی نقش بازدارندگی دارد. ریبوزوم‌های میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها شبیه ریبوزوم‌های باکتری‌ها هستند.

ریبوزوم‌های دو رگه حاصل از اتصال بخش‌های ریبوزومی باکتری‌ها و کلروپلاست‌ها و همچنین ریبوزوم‌های دو رگه حاصل از اتصال بخش‌های ریبوزومی گیاهان و پستانداران از نظر سنتز پروتئین فعالند. اما ریبوزوم‌های دو رگه حاصل از بخش‌های ریبوزومی پروکاریوتی و یوکاریوتی فعال نیستند.

بیوژنز ریبوزوم‌ها و نقش هستک

سنتز یک ریبوزوم یوکاریوتی پدیده‌ای پیچیده است که بخش‌های مختلف یاخته در آن به کارگرفته می‌شود. RNAهای ۱۸S و ۵/۸S و ۲۸S به‌صورت مولکول پیش‌سازی که خیلی طویل‌تر از مولکول اصلی است در هستک ساخته می‌شوند. RNA۵S روی کروموزوم‌های خارج از هستک و ۷۰ پروتئین ریبوزومی، در سیتوپلاسم ساخته می‌شوند. همه این مواد وارد هستک می‌شوند، در آنجا به‌صورت ریبوزوم مجتمع می‌شوند و سپس به سیتوپلاسم منتقل می‌گردند.

بیوژنز ریبوزوم‌ها مثال بارزی از هماهنگی موجود در حد یاخته‌ای و مولکولی است.

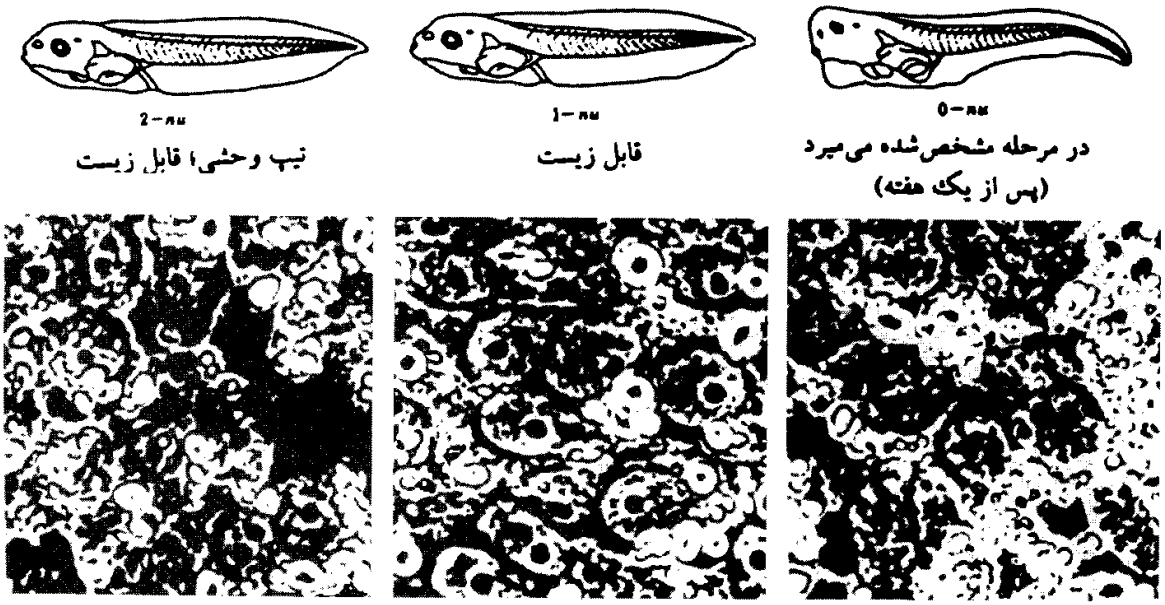
از نظر تاریخی، این پندار که هستک سازنده ریبوزوم‌ها است مربوط به کارهای سیتوشیمیایی کاسپرسُن[1] با جذب پرتوهای فرابنفش و کارهای براشه[2] با رنگ‌آمیزی اختصاصی اسیدهای ریبونوکلئیک می‌شود. این دو پژوهشگر وجود هستک‌های درشت و غنی از RNA را در یاخته‌های سنتزکننده پروتئین نشان داده‌اند.

کشف ریبوزوم‌ها و نقش آنها در سنتز پروتئین‌ها به سرعت موجب ارتباط بین هستک و این اندامک‌ها شده است.

سازمان‌دهندگان هستکی دارای DNA ریبوزومی هستند

هنگام میتوز هستک‌ها محو می‌شوند و در تلوفاز هستک‌های جدید از محل‌های ویژه‌ای از کروموزوم‌ها که آنها را سازمان‌دهندگان هستکی نامند (سازمان‌دهندگان هستکی در فشردگی‌های ثانویه برخی کروموزوم‌ها جای دارند) تشکیل می‌شوند. در حال حاضر می‌دانیم که این محل‌ها دارای ژن‌هایی هستند که RNAهای ریبوزومی ۱۸S، ۲۸S، ۵/۸S را رمزدار می‌کنند.

1- Caspersson 2- Brachet



شکل ۱۳-۸. تعداد هستک‌ها در جهش یافته‌های Xenspus Laevis. تیپ وحشی دارای دو هستک است (nu -۲)؛ جهش یافتهٔ هتروزیگوت یک هستک دارد (nu - ۱) و جهش یافتهٔ هموزیگوت فاقد هستک است (nu - ۰). تترادهای nu - ۰، RNA ریبوزومی را سنتز نمی‌کنند (برگرفته از کارهای J.B.Gurdon).

کشف نوع جهش یافته و فاقد هستکی از دوزیستان زنوپوس‌لویس[1] در ۱۹۶۴ که قادر به سنتز RNA ریبوزومی نبود دلیل مستقیمی از دخالت هستک در سنتز RNA ریبوزومی را به‌دست داد. شکل ۱۳-۸ نشان می‌دهد که یاخته‌های دیپلوئید تیپ وحشی این جانور دارای دو هستک هستند (nu - ۲)؛ جهش یافتهٔ هتروزیگوت تنها یک هستک دارد (nu - ۱) و جهش یافتهٔ هموزیگوت فاقد هسته است (nu - ۰)، وقتی دو هتروزیگوت (nu - ۱) آمیزش داده شوند، ۲۵ درصد جهش یافته‌های حاصل فاقد هستک (nu - ۰) هستند.

این وضع کشنده است و تترادها بعد از یک هفته می‌میرند. تا این مرحله، رویان‌ها از ریبوزوم‌های والدینی استفاده می‌کنند که از سیتوپلاسم یاخته تخم به ارث برده‌اند (یک یاخته تخم زنوپوس دارای $۱۰^{۱۲}$ ریبوزوم است).

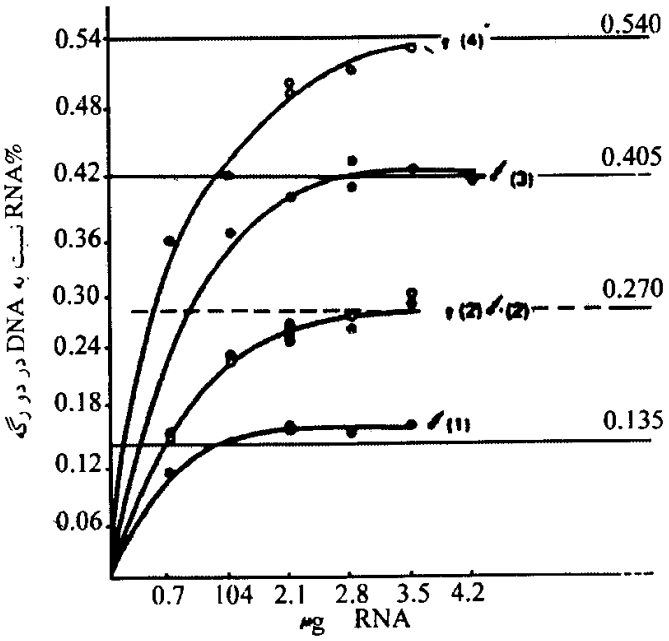
رویان‌های nu - ۰، RNAهای ۱۸S، ۲۸S، ۵/۸S را سنتز نمی‌کنند و تجربیات مربوط به دو رگه‌سازی DNA - RNA نشان می‌دهد که این رویان‌ها فاقد ژن‌های RNA ریبوزومی هستند. (در جهش یافته ژن‌های RNA ریبوزومی جدا شده‌اند). چون رویان‌های nu - ۰ می‌توانند RNA۵S را بسازند، بنابراین ژن‌های این RNA در خارج از سازمان‌دهندگان هستکی جای دارند. تجربیات مشابهی بر روی مگس سرکه انجام شده که در آن سازمان‌دهنده هستکی در بخشی از هتروکروماتین کروموزوم X یا کروموزم Y قرار گرفته است.

به کمک روش دو رگه‌سازی DNA - RNA، سوش‌های دارای یاخته‌هایی با سازمان‌دهندگان هستکی کمتر یا بیشتر از وضع عادی را بررسی کرده‌اند. همان‌طور که شکل ۱۳-۹ نشان می‌دهد، سطح اشباع برای نمونهٔ وحشی حدود ۰/۲۷ درصد است. در جهش یافته دارای یک سازمان‌دهنده هستکی، سطح اشباع برابر نصف تیپ وحشی است. ارزش‌های نسبی بیشتری در جهش یافته‌های مگس سرکه، که دارای سه یا چهار سازمان‌دهنده هستکی بوده‌اند به‌دست آمده است.

در هسته هاپلوئید تیپ وحشی، برای هر سازمان‌دهنده هستکی ۱۳۰ سیسترون rDNA شمارش شده است.

1- Xenspus Laevis

در جهش یافته‌ای در مگس سرکه، که بوبّد[1] نامیده می‌شود تعداد سیسترون‌های rDNA کاهش می‌یابد و می‌توان حدس زد که وقتی کمتر از ۴۰ سیسترون rDNA در سازمان‌دهنده هستکی موجود باشد موجب مرگ جهش یافته می‌شود.



شکل ۱۳-۹. تجربه‌ای که نشان می‌دهد که، DNAی مکمّل RNA ریبوزومی وابسته به سازمان‌دهندهٔ هستکی است. سطح(میزان) اشباع دو رگه‌های DNA − rRNA با افزایش تعداد سازمان‌دهندگان افزایش می‌یابد. پژوهشگران از روش‌های دارای ۱، ۲، ۳، ۴ سازمان‌دهنده هستکی استفاده کرده‌اند.

ژن‌های ریبوزومی به‌صورت پشت‌سرهم تکرار شده و به وسیلهٔ فواصلی از DNA از یکدیگر جدا شده‌اند.

جدول ۲-۱۳ نشان می‌دهد که تمام جانداران رونوشت‌های (کپی‌های) زیادی از ژن‌های rRNA دارند. در باکتری‌ها تعداد رونوشت‌ها تا حدّی زیاد است و در یوکاریوت‌ها، rDNA بسیار تکراری است.

در گزنوپوس هر سازمان‌دهنده هستکی دارای ۴۵۰ ژن RNA ریبوزومی است. این ژن‌ها

جدول ۱۳-۲. تشدید سیسترون‌های rRNA در جانداران متفاوت

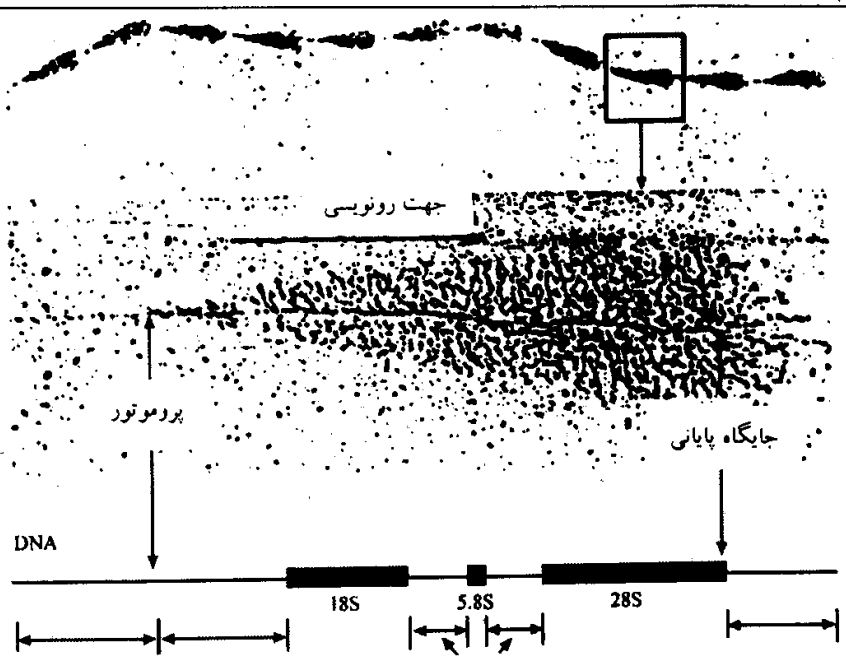
جاندار	٪rDNA	سیسترون‌های rDNA در ژنوم هاپلوئید
باسیل‌کولی	۰/۴۲ - ۰/۶۵	۸-۲۲
باسیلوس سوبتیلیس	۰/۳۸	۹-۱۰
یاخته‌های هلا	۰/۰۰۵ - ۰/۰۲	۱۶۰-۶۴۰
مگس سرکه (تیپ وحشی)	۰/۲۷	۱۳۰
گزنوپوس (تیپ وحشی)	۰/۲	۴۵۰

به‌صورت پشت‌سرهم (سربه‌دم[2]) در طول مولکول DNA تکرار شده‌اند و هر یک از دیگری به وسیلهٔ قطعهٔ جداکننده‌ای از DNA که رونویسی نمی‌شود جدا شده است. این تکرار خطی ژن‌ها به‌صورت واضحی در شکل ۱۳-۱۰ مشخص شده است.

این شکل یک سازمان‌دهنده هستکی راکه برای مشاهده با میکروسکوپ الکترونی گسترده شده، نشان می‌دهد. ژن‌های RNA ریبوزومی به‌صورت فعّالی رونویسی می‌شوند و زنجیره‌های RNA که به وجود می‌آیند به‌صورت عمود بر محور DNA گسترش می‌یابند.

هر ژن به‌صورت مولکول طویلی از RNA (ضریب ثابت ته‌نشینی در گونه‌های مختلف از ۴۰S تا ۴۵S متغیر است) رونویسی می‌شود که احتمالاً موجب تشکیل RNAهای ۱۸S، ۲۸S، ۵/۸S می‌گردد (به بحث‌های بعدی

1- bobbed 2- Tandem



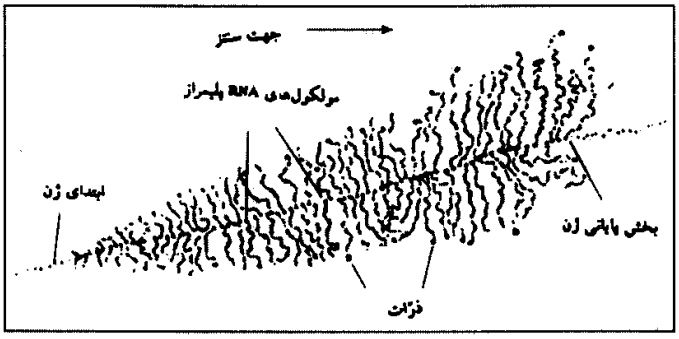
شکل ۱۳-۱۰. ژن‌های RNA های ریبوزومی به حالت پشت‌سرهم (سر به دم) تکرار شده و یکی از دیگری به وسیلهٔ فواصلی که رونویسی نمی‌شوند، مشخص می‌گردند یک سازمان‌دهنده هستکی به منظور مشاهده با میکروسکوپ الکترونی گسترده شده و یازده ژن متوالی از ژن‌های RNA هستکی دیده می‌شوند. منظره درخت نوئل یا (برگ سرخس) مولکول‌های پیش‌ساز در حال تشکیل RNA توجه نمایید مولکول طویل پیش‌ساز شامل RNAهای ریبوزومی ۱۸S ، ۵/۸S و ۲۸S است و به منظور تشکیل یک نوکلئوپروتئین به پروتئین‌ها چسبیده است. در پایین، نقشه ژنتیکی یک واحد rDNA دیده می‌شود (برگرفته از کارهای U.Scheer و M.Trendelen).

مراجعه شود).

چون هر ژن دارای یک بخش آغازی ثابت (پروموتر) و یک بخش پایانی ثابت است، رونوشت‌ها منظره خاصی پیدا می‌کنند که آن را (درخت نوئل) و یا (برگ سرخس) نامند.

ژن‌های rRNAهای هستکی به وسیلهٔ RNA پلیمراز I (آنزیم مقاوم نسبت به α آمانیتین) رونویسی می‌شوند. مولکول‌های پلیمراز I (تقریباً ۱۰۰ مولکول به ازای هر ژن) در ابتدای هر زنجیر RNA در حال تشکیل دیده می‌شود (شکل ۱۳-۱۱).

ژن‌های rDNA که به‌صورت پشت‌سرهم تکرار شده‌اند را می‌توان با استفاده از روش اولتراسانتریفوگاسیون بر بنای شیب (میزان) غلظت کلرورمنیزیم و دو رگه‌سازی با RNA ریبوزومی نشاندار شده با رادیوایزوتوپ‌ها جدا کرد



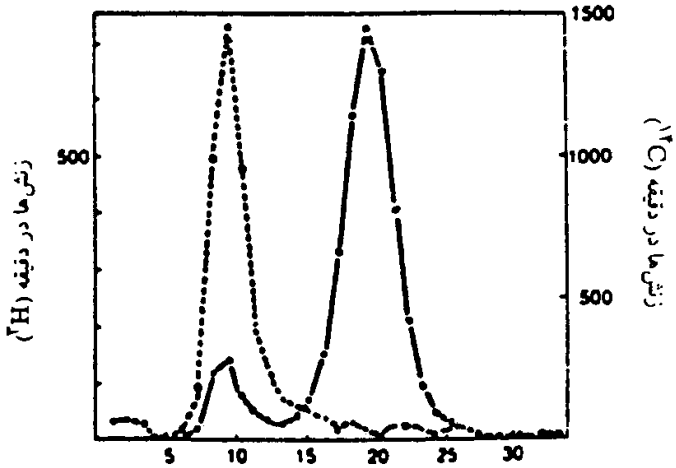
شکل ۱۳-۱۱. در بالا، ریزنگار الکترونی نشان‌دهندهٔ دو ژن هستکی در فرآیندهای رونویسی RNA ریبوزومی؛ در پایین، عنوان‌های شکل برای درک مطلب کافی هستند (برگرفته از کارهای L.Miller و B.R.Beatty).

(شکل‌های ۱۳-۱۰ و ۱۳-۱۱).

در گزنوپوس لویس می‌توان حضور قطعهٔ کوچکی از DNA را نشان داد که غلظت شناوری آن بیش از بخش‌های دیگر است (۱/۷۲۳ در قیاس با ۱/۶۹۸). این قطعه کوچک‌تر تنها ۲۰ درصد از کل DNA را شامل می‌شود و آن راماهواره DNA ریبوزومی می‌نامند. در جهش یافته بدون هستک گزنوپوس لویس این بخش وجود ندارد.

غلظت شناوری بیشتر این بخش از DNA به دلیل مقدار زیاد گوانوزین - سیتوزین (۷۰ درصد) DNA ماهواره‌ای است.

روش دیگر دو رگه‌سازی با RNA ریبوزومی مشخص کرده است که این دو رگه‌شدن با DNAی ماهواره‌ای متناسب است (شکل ۱۳-۱۲). نوع دیگری از DNAی ماهواره‌ای وجود دارد که با هتروکرماتین سانترومری مطابقت می‌کند.



شکل ۱۳-۱۲. تجربهٔ نشان‌دهندهٔ حضور RNA ریبوزومی در تخمدان گزنوپوس. خط‌های پُر نتیجهٔ حاصل از اولتراسانتریفوگاسیون DNAی نشاندار شده به وسیله ۱۴C در شیبی از غلظت کلرورسزیم را نشان می‌دهد به قلّهٔ اصلی و نیز قلّهٔ کوچک مربوط به ماهواره توجه نمایید. خط‌های نقطه‌چین تجربه‌های دو رگه‌سازی انجام شده با RNA ریبوزومی را نشان می‌دهند که با تریسیوم نشاندار شده است. با قلّه کوچک DNA تطبیق دارد (برگرفته از کارهای Gall، ۱۹۶۸).

تهیه rDNA خالص، بررسی‌های دقیق‌تری از ساختار آن را امکان‌پذیر ساخته است. این بررسی‌ها به ویژه به کمک استفاده از آندونوکلئازهای محدودکنندهٔ این DNA صورت گرفته‌اند. اگرچه درازای (طول) ژن (بخش رونوشت) ثابت است، اما درازای بخش رونویسی نشده (شکل ۱۳-۱۰) می‌تواند به میزان قابل توجهی در بین تکرارهای مجاور هم و در افراد مختلف گزنوپوس متغیر باشد.

در قطعه‌ای که در آن فاصله رونویسی نشده نیز از ردیف‌های کوتاه تکراری تشکیل شده، طول حدود ۵۰ جفت باز است و تغییرات در درازای این فاصله ناشی از اختلاف در تعداد این واحدهای تکراری است.

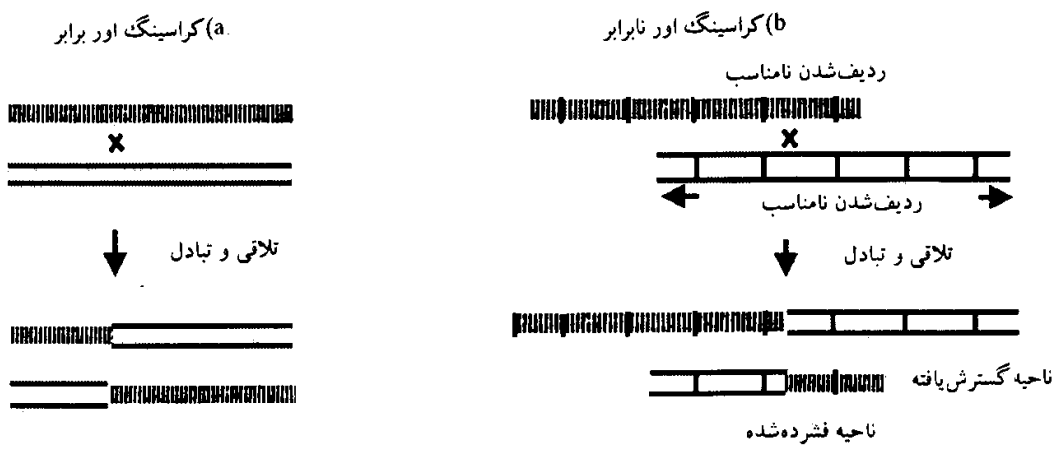
ناهمگنی این فواصل می‌تواند از تلاقی و تبادل (کراسینگ‌اور) نامساوی باشد (شکل ۱۳-۱۳).

ژن‌های 5S تکرارهای پشت‌سرهم با ردیف‌های فاصله، اما خارج از سازمان‌دهنده هستکی

ژن‌های رمزدارکننده RNA5S در هستک جای ندارند، بنابراین در جهش یافته بدون هستک گزنوپوس آسیب ندیده‌اند. ژن‌های 5S به‌صورت رونوشت‌های تکراری موجودند؛ گزنوپوس دارای ۲۴۰۰۰ ژن 5S است. با استفاده از روش دو رگه‌سازی در جایگاه خود به کمک RNA - 5S - ۳H نشان داده شده که این ژن‌ها در بخش‌های انتهایی (تلومرهای) اغلب کروموزوم‌های این جاندار قرار گرفته‌اند.

در مگس سرکه، تمام ژن‌های 5S به‌صورت یک توده در یکی از کروزوم‌های پیکری (اتوزوم‌ها) مجتمع شده‌اند. (در حالی که سازمان‌دهندگان هستکی در کروموزم‌های X و Y هستند).

ژن‌های 5S نیز همانند rRNA به‌صورت پشت‌سرهم قرار گرفته‌اند و به وسیلهٔ قطعات جداکننده DNA از هم



شکل ۱۳-۱۳. چگونگی امکان تحوّل DNA تکراری به وسیلهٔ تلاقی و تبادلِ (کراسینگ‌اور) نابرابر. الف - در کراسینگ‌اور برابر، مولکول‌های DNA به درستی ردیف شده‌اند. ب - در کراسینگ‌اورِ نابرابر، تکرارهای پشت‌سرهم (با خط‌های قائم نشان داده شده‌اند) به درستی ردیف نشده‌اند. از این وضعیت مولکول‌های نوترکیبی ایجاد می‌شوندکه دارای واحدهای تکرار شونده مضاعف شده یا حذف شده‌اند. با این مکانیسم، جهش‌های ترتیب‌های تکراری می‌توانند در ژنوم گسترش یابند و DNAی ماهواره‌ای می‌تواند در بین گونه‌های بسیار نزدیک، تنوع یابد (برگرفته از کارهای G.P و Smith، ۱۹۷۸).

فاصله دارند. بیشترین فاصله (یا تناوب) از قطعاتی تکراری، متشکل از یک ردیف کوتاه ۱۱۵ جفت باز ساخته شده است. این ردیف سرشار از A − T است و به همین دلیل DNA ۵S به‌صورت یک باند ماهواره‌ای سبک‌تر از DNA پایه‌ای در شیب‌های غلظت کلرروسزیم مشخص می‌شود. رونوشت‌های ۵S مجاور هم می‌توانند طول متفاوتی داشته باشند زیرا تعداد زیر رونوشت‌های ۱۵ جفت بازی موجود در هر تناوب متغیر است.

این تغییرات از تلاقی و تبادل‌های (کراسینگ‌اورهای) نابرابر ایجاد می‌شود. به نظر می‌رسد تکرارهای پشت‌سرهم ژن‌ها یکی از ویژگی‌های عمومی سازمان‌یافتگی مجموعهٔ ژنی (ژنوم) یوکاریوت‌ها باشد.

RNA ۵S به وسیلهٔ RNA پلیمراز III (آنزیم‌های حساس به مقادیر بالای α آمانیتین) رونویسی می‌شود و سپس به هستک‌ها منتقل شده و در آنجا به زیرواحد بزرگ که هنوز نابالغ است وارد می‌شود.

ژن‌های RNA ۵S برعکس ژن‌های رمزدارکننده RNAهای درشت ریبوزومی به هنگام اووژنز تشدید پیدا می‌کنند. اووسیت‌ها به منظور تشکیل ریبوزوم‌های مورد لزوم ۲۴۰۰۰ ژن مربوط به RNA ۵S را فعال می‌کنند (در یاخته‌های پیکری تنها بخشی از ژن‌های ۵S فعال می‌شوند که آنها را «ژن‌های پیکری» نامند؛ از سویی دیگر در اووسیت‌ها، ژن‌های «اووسیت‌های فعال» که دارای ترتیب نوکلئوتیدی کمی متفاوتند، نیز فعالند).

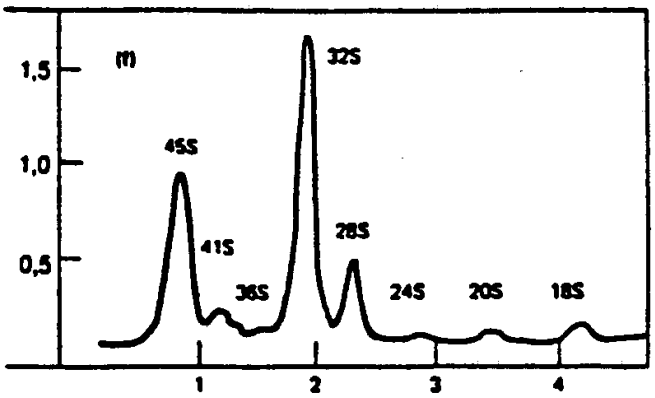
تشدید ژن‌های اختصاصی، پدیده‌ای عام نیست. به جز مورد rDNA اووسیت‌ها، تنها مثال دیگر در مورد تشدید مربوط به «پاف» در DNA مگس Sciarides می‌باشد. در هر مورد، مادهٔ تشدید یافته به نسل‌های یاخته‌ای آینده انتقال نمی‌یابد.

RNAهای ریبوزومی تغییرات پیچیده‌ای را در هستک می‌گذارند

بیوژنز rRNA بهترین مثال از تغییر و تبدیل‌های RNA است. همان‌طور که در شکل ۱۳-۱۰ مشخص شده است ژن‌های rRNA به‌صورت RNA پیش‌ساز بلندی رونویسی می‌شوند که بایستی به RNA ۱۸S، ۲۸S و ۵/۸S بریده شوند. در طول این تبدیل تقریباً ۵۰ درصد RNA پیش‌ساز در هسته تجزیه می‌شود.

جدا کردن هستک از یاخته‌های کشت شده، امکان بررسی بهتری از مراحل سنتز و تبدیل RNA ریبوزومی را به‌دست می‌دهد.

شکل ۱۳-۱۴ تنوع قطعات RNA ریبوزومی را که در این نوع هستک‌های جدا شده وجود دارند، نشان می‌دهند. بخش‌های غالب عبارتند از بخش‌های ۴۵S، ۳۲S و ۲۸S. همچنین مقدار بسیار کمی RNA۱۸S قابل تشخیص است. این وضع نشان می‌دهد که RNA۱۸S به سرعت به سیتوپلاسم انتقال می‌یابد و در هستک نمی‌ماند.



شکل ۱۳-۱۴. منحنی‌های مربوط به RNA ریبوزومی که در هستک یاخته‌های Hela مشاهده شده‌اند (به متن مراجعه شود). RNA هستکی بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمیدالکتروفورز شده است.

به منظور دنبال کردن مراحل تبدیل RNA در طول زمان، یاخته‌های کشت شده به دنبال یک نشانه گذاری سریع به وسیلهٔ RNA پیش‌ساز نشاندار شده (مثلاً با اوریدینِ تریسیوم‌دار)، در فواصل زمانی مختلفی مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

۱) اولین RNA ریبوزومی در یاخته‌های Hela مولکول درشت RNA۵S است که دارای ۱۴۰۰۰ نوکلئوتید می‌باشد (جدول ۳-۱۳). جانداران دیگر پیش‌سازهای کوچک‌تری دارند (۴۰S در گزنوپوس). در این مولکول rRNAها به وسیلهٔ قطعات جداکننده‌ای از یکدیگر جدا شده‌اند و ترتیب رونویسی به‌صورت زیر است:

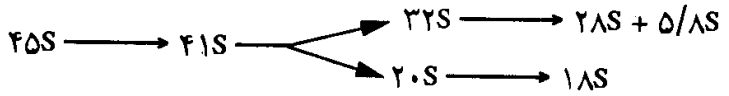
سر ´۵ —— ۱۸S —— ۵/۸S —— ۲۸S —— سر ´۳

در ژنی کاملاً فعال صد RNA پلیمراز به‌طور همزمان بر روی سیسترون DNA ریبوزومی در حال رونویسی هستند.

۲) RNA۴۵S در هستک به سرعت و حتی قبل از آن که رونویسی کامل شده باشد متیله می‌شود.

متیلاسیون‌ها به ویژه بر روی بخش ریبوز (با تشکیل ´۲ – O – متیل ریبوز) و تنها در ردیف‌هایی از RNAهای ۱۸S (۴۶ متیلاسیون) و ۲۸S (۷۱ گروه متیل) صورت می‌گیرند که حفظ خواهند شد در حالی که قطعاتی که تجزیه خواهند شد متیله نشده باقی می‌مانند.

۳) RNA۴۵S عمری حدود ۱۵ دقیقه دارد و بعد از آن بنا به طرح زیر به بخش‌های کوچک‌تری تقسیم می‌شود.



۴) RNA۲۰S به سرعت به RNA۱۸S تبدیل می‌شود و احتمالاً به همین دلیل که زیر واحدهای کوچک ریبوزومی قبل از زیرواحدهای بزرگ که در آنها RNA به آرامی (کندی) تغییر و تبدیل می‌یابد، پدیدار می‌شوند.

۵) RNA۳۲S حدود ۴۰ دقیقه در هستک باقی می‌ماند و سپس به RNA ۲۸S و RNA ۵/۸S می‌شکند. این RNAها قبل از انتقال به سیتوپلاسم همانند زیرواحد بزرگ ریبوزوم به مدت ۳۰ دقیقه در هستک باقی می‌مانند.

بر مبنای اطلاعاتی که در جدول ۳-۱۳ آمده است، روشن است که مولکول ۴۵S به هنگام تجزیه‌های تدریجی خود حدود نیمی از نوکلئوتیدهایش را از دست می‌دهد. این وضع در نواحی متیله نشده که دارای مقدار بیشتری GC هستند صورت می‌گیرد. بنابراین تغییر و تبدیل RNA ریبوزومی با افزایش گروه‌های متیله و کاهش GC همراه است.

جدول ۳-۱۳. وزن مولکولی تقریبی و تعداد نوکلئوتیدها در RNAهای ریبوزومی مختلف یاخته‌های Hela

RNA	وزن مولکولی تقریبی	نوکلئوتیدها
۴۵S	[illegible]	۱۳۰۰۰
۳۲S	[illegible]	۷۰۰۰
۲۸S	[illegible]	۵۰۰۰
۱۸S	[illegible]	۲۰۰۰
۵/۸S	[illegible]	۱۵۰

در باسیل‌کولی، RNAهای ۱۶S و ۲۳S نیز به‌صورت یک مجموعه رونویسی می‌شوند اما تبدیل آنها به حدی سریع است که rRNA پیش‌سازشان را نمی‌توان مشخص کرد. در عین حال یک ماده پیش‌ساز ۳۰S در جهش یافته‌های فاقد ریبونوکلئاز III، که آنزیم تغییر و تبدیل است جمع می‌شود.

در یوکاریوت‌ها، ریبوزوم‌ها در هستک سازمان می‌یابند. RNA۴۵S به سرعت به پروتئین‌ها می‌چسبد و ذره‌ای حدود ۸۰S را به وجود می‌آورد. تمام مراحل بین ۴۵S و ۲۸S و ۱۸S نهایی در ذرات ریبونوکلئوپروتئینی هستکی صورت می‌گیرد.

بیوژنز ریبوزومی را می‌توان با میکروسکوپ الکترونی دنبال کرد

اغلب هستک‌ها دارای یک بخش دانه‌ای و یک بخش رشته‌ای‌اند که بخش رشته‌ای همانند آنچه به روشنی در شکل ۱۳-۱۵ دیده می‌شود یک هسته مرکزی را در این اندامک تشکیل می‌دهد سیتوشیمی تأیید می‌کند که ارتباط پویای زیر بین بخش‌های مختلف هستک برقرار است:

DNA هستکی ⟵ ناحیه رشته‌ای ⟵ ناحیه دانه‌ای

وقتی یاخته‌ها را به مدت ۵ دقیقه با اوریدین تریسیوم‌دار نشاندار کنیم و بعد اوریدین را ردیابی‌کنیم می‌بینیم که این مادهٔ پیش‌سازِ RNA، ابتدا در بخش رشته‌ای و بعد در بخش دانه‌ای یافت می‌شود.

بخش رشته‌ای دارای rDNA و RNA۴۵S تازه ساخت می‌باشد.

این بخش وقتی در زیر میکروسکوپ الکترونی گسترده شود (بهتر از وقتی که از آن برش تهیه گردد) حالتی دارد که در شکل ۱۳-۱۵ دیده می‌شود. روش تهیه برش‌های بسیار نازک در میکروسکوپی الکترونی امکان مشاهده ذرات متراکمی را بر روی هر دو سطح پوشش هسته‌ای به‌دست داده است. این حالت عبور ریبوزوم‌ها از هسته به سیتوپلاسم را تأیید می‌کند. عبور ذرات نوکلئوپروتئینی به راحتی در اووسیت‌های دوزیستان مشاهده شده است. در این یاخته‌ها می‌توان عبور ماده‌ای باخاستگاه هستکی از خلال منافذ پوشش هسته‌ای به سیتوپلاسم را مشاهده کرد (شکل ۱۳-۱۵).

خلاصه: (بیوژنز ریبوزوم‌ها)

بیوژنز ریبوزوم‌ها نتیجه گردهم‌آیی متناسب فرآورده‌های مولکولی مختلفی است که به سوی هستک می‌روند.

ژن‌های رمزدارکنندهٔ RNAهای ۱۸S و ۲۸S و ۵/۸S در سازمان‌دهندگان هستکی و ژن‌های ۵S در بخش‌های دیگر ژنوم قرار دارند؛ پروتئین‌های ریبوزومی در سیتوپلاسم ساخته می‌شوند.

فرآورده‌های ژن ۵S و پروتئین‌ها به هستک رفته و در آنجا پس از تغییرات لازم با بخش‌های دیگر سازنده

شکـــل ۱۳-۱۵. ریزنگار الکترونی یک اووسیت Rana clamitans نشان‌دهندهٔ یکی از هستک‌های حاشیه‌ای (با DNA تشدید شده). این هستک‌ها دارای یک بخش مرکزی رشته‌ای (F) و یک بخش پیرامونی دانه‌ای (g) هستند. پیکان‌ها ماده‌ای را که از راه منافذ هسته‌ای وارد سیتوپلاسم می‌شود نشان می‌دهند.

ریبوزوم مجتمع می‌شوند و به‌صورت ریبوزوم‌های فعال در می‌آیند.

کشف نوعی جهش یافتهٔ بدون هستک از گزنوپوس‌لویس، دلیل مستقیمی (آشکاری) را در تأیید نقش هستک در تشکیل ریبوزوم‌ها به‌دست داده است. جهش یافته‌های مگس سرکه نیز دارای تعداد متفاوتی از ژن‌های ریبوزومی با مقادیر متنوعی از سازمان‌دهندگان هستکی‌اند.

باکتری‌ها دارای الگوهای کمی از ژن‌های rRNA هستند در حالی که در یوکاریوت‌ها، این ژن‌ها تکراری‌اند، به‌صورت پشت‌سرهم قرار گرفته‌اند و به وسیلهٔ فواصلی که رونویسی نمی‌شوند از یکدیگر مجزا هستند. پدیدهٔ رونویسی را می‌توان با میکروسکوپی الکترونی مشاهده کرد (شکل ۱۳-۱۵). ژن‌های rDNA را به دلیل مقدار زیاد GC که دارند می‌توان به وسیلهٔ شیب غلظتی از کلرورسزیم جدا کرد. فاصله این ژن‌ها از ترتیب‌های کوتاه تکراری تشکیل شده و طول آن می‌تواند به حسب افراد مختلف تغییر کند.

در گزنوپوس هر سازمان‌دهنده هستکی دارای ۴۵۰ ژن rRNA است. در این گونه، ژن‌های RNA۵S در تلومرهای اکثر کروموزوم‌ها قرار دارند. تعداد این ژن‌ها به ۲۴۰۰۰ می‌رسد که حالت پشت‌سرهم (سربه‌دم) دارند و به وسیلهٔ فواصلی غنی از نوکلئوتیدها دارای A − T از یکدیگر مجزا هستند.

RNA۵s به وسیلهٔ RNA پلیمراز III رونویسی می‌شود و سپس به هستک می‌رود.

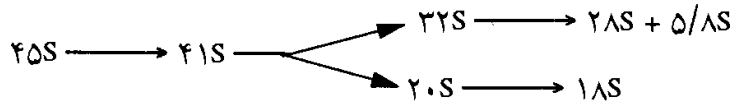
ازدیاد تشدید ژنی پدیده‌ای است که به وسیلهٔ آن مجموعه‌ای از ژن‌ها به‌طور انتخابی تکثیر می‌شوند. این پدیده برای rDNA در اووسیت دوزیستان اتفاق می‌افتد که بایستی تعداد زیادی ریبوزوم را به منظور استفاده در مراحل

اولیه رشد و نمو تخم در خود جمع‌آوری کنند. در طول پاکی تن، تکثیر فعال سازمان‌دهندگان هستکی صورت می‌گیرد و rDNA ۱۰۰۰ بار تکثیر می‌شود. یک یاخته تخم دارای ۲۵ پیکوگرم DNAی اضافه بر سازمان و ۲۰۰۰۰۰۰ ژن rDNA است که در ۱۰۰۰ تا ۱۵۰۰ هستک جای دارند. این DNA اضافی در طول رشد و نمّو تحلیل می‌رود.

ژن‌های rDNA ۵S به هنگام اووژنز تکثیر نمی‌شوند و همهٔ ۲۴۰۰۰ ژن اصلی برای پاسخ به نیاز ریبوزومی فعال می‌شوند. تغییر و تبدیل rRNA در هستک انجام می‌شود. ابتدا رونوشت‌های طویل rRNA تشکیل می‌شوند و سپس بخش‌هایی از آنها تجزیه می‌شود. تنها یک پیش‌ساز برای rRNA۱۸S، ۲۸S و ۵/۸S ساخته می‌شود که دارای ۱۴۰۰۰ نوکلئوتید و ضریب ثابت ته‌نشینی ۴۵S است (جدول ۳-۱۳).

در rDNA رونویسی بنا به ترتیب زیر صورت می‌گیرد:

سر ´۵ ——— ۱۸S ——— ۵/۸S ——— ۲۸S ——— سر ´۳ و هر rRNA به وسیلهٔ بخش حدّ واسطی از دیگری جداست. پیش‌ساز ۴۵S در بخش‌هایی که حفظ خواهند شد متیله می‌شود و عمری حدود ۱۵ دقیقه دارد؛ سپس به‌صورت زیر شکسته می‌شود:



تغییر و تبدیل rRNA۲۰S به ۱۸S سریع است و زیرواحد کوچک ریبوزوم قبل از زیرواحد بزرگ در سیتوپلاسم پدیدار می‌شود. RNA۳۲S قبل از تبدیل به RNA ۲۸S + ۲۸S + ۵/۸S حدود ۴۰ دقیقه در هستک باقی می‌ماند. RNA ۲۸S + ۵/۸S قبل از آن که به‌صورت زیرواحد بزرگ ریبوزومی وارد سیتوپلاسم شود حدود ۳۰ دقیقه پایدار می‌ماند.

سیتوشیمی امکان بررسی مراحل مختلف و تغییر و تبدیل ریبوزوم‌ها در نواحی رشته‌ای و دانه‌ای هستک را به‌دست می‌دهد. میکروسکوپ الکترونی نه تنها مشاهده رونویسی، بلکه مشاهده چگونگی انتقال زیرواحدهای ریبوزومی به سیتوپلاسم را امکان‌پذیر ساخته است.

۱۴ هسته[1]

بخش عمده ماده ژنتیکی سلول‌های یوکاریوتی در مجموعه سازمان یافته‌ای به نام هسته جای دارد. در کلیهٔ سلول‌های یوکاریوتی (انسانی، جانوری و گیاهی) هسته دارای پوشش مشخصی است که به دلیل قدرت پراش نوری زیادی که دارد از سال‌ها قبل به راحتی به وسیله میکروسکوپ‌های نوری شناخته شده است. هسته سلول‌های یوکاریوتی با مجموعه‌ای از ویژگی‌های ساختمانی، فراساختمانی، محل، تعداد و نقش‌های زیستی مهمی که دارد شناخته می‌شود.

هسته در ۱۸۳۱ به وسیله رُبرت‌براون[2] در سلول‌های اپیدرمی ثعلبیان کشف شد و به‌عنوان بخشی متراکم، پایدار و موجود در همه سلول‌ها در نظر گرفته شد. در پژوهش‌های بعدیِ محققان، هسته در سلول‌های اسپرمی انواعی از ماهی‌ها و دیگر سلول‌های جانوری و نیز در سلول‌های انسانی شناخته شد.

شکل: در بیشتر سلول‌ها هسته کروی یا کم‌وبیش بیضی شکل است، اما در سلول‌های جانوران مختلف هسته تنوع شکل زیادی دارد. در سلول‌های پارانشیمی بالغ، عدسی شکل، در سلول‌های عضلانی مخطط و در سلول‌های پروکامبیومی گیاهان، استوانه‌ای شکل است. گاهی هسته شکل نامنظم به خود می‌گیرد برای مثال در سلول‌های آبکشی در حال تمایز یا یاخته‌های انگل‌زده، در عده‌ای از سلول‌ها هسته چندبخشی است مثل گویچه‌های سفید چندهسته‌ای، سلول‌های استخوان‌خوار و هسته‌های منشعب در غده‌های سازنده تار در کرم ابریشم.

محل: در بسیاری از سلول‌ها و به ویژه سلول‌های جوان، هسته به‌طور معمول در وسط سلول قرار گرفته است. وقتی سلول‌ها تمایز می‌یابند و به ویژه در سلول‌های گیاهی که تمایز آنها به‌طور معمول با گسترش سیستم واکوئلی همراه است، هسته به طرف کناره‌های سلول رانده می‌شود. در برخی سلول‌ها که تمایز و فعالیت خاصی دارند، هسته محل ویژه‌ای دارد برای مثال در سلول‌های عضلانی مخطط هسته‌ها اغلب در بخش‌های کناری و بیشتر در اطراف محل صفحه محرک مجتمعند. در جلبک استابولار یا هسته در بخش ریزوئیدی (ریشه نما) یا مجاور به آن قرار دارد.

تعداد: اغلب سلول‌ها دارای یک هسته هستند. با وجود این برخی جانداران ابتدایی و یا سلول‌های جانداران پیشرفته بیش از یک هسته دارند. برای مثال حدود ۲۰ درصد از سلول‌های کبدی و یا عده زیادی از سلول‌های ریسه قارچ‌ها دو هسته‌ای هستند. سلول‌های عضلانی مخطط، پیکر برخی قارچ‌ها مثل میکسومیست‌ها و برخی لوله‌های شیرابه‌ای مشبک ساختمان سنوسیتی[3] دارند یعنی در سیتوپلاسمی مشترک چندین هسته پراکنده است. این ساختمان‌ها در ابتدا یک هسته‌ای بوده‌اند که به دلیل تقسیمات مکرر هسته، بدون آن که سیتوپلاسم تقسیم شود، به حالت سنوسیتی درآمده‌اند.

اندازه: ابعاد هسته در سلول‌های جانداران مختلف و حتی در یک سلول برحسب سن سلولی بسیار متفاوت است. چند مثال از ابعاد هسته به شرح زیر است:

کفک‌ها، مخمرهای دارای هسته‌های بسیار کوچک	۱ تا ۲ میکرون
گیاهان عالی دارای هسته‌هایی با اندازه متوسط	۱۰ تا ۵۰ میکرون

1- Nucleous 2- Robert Brown 3- Coenocytic

جانوران (به‌طور معمول)	۱۰ تا ۳۰ میکرون
سلول تخمزا در برخی بازدانگان مثل زامیا و نمونه‌هایی از کاج‌ها	۱۰ تا ۳۰ میکرون

در یک گونه مشخص، ابعاد هسته متناسب با ابعاد سلول است و این تناسب همان نسبت نوکلئوسیتوپلاسمی هرتویگ[1] است:

$$\text{نسبت نوکلئوسیتوپلاسمی (RNP)} = \frac{\text{حجم هسته}}{\text{حجم سیتوپلاسم}}$$

این نسبت برای سلول‌هایی از یک نوع که در مرحله یکسانی از رشد و در شرایط مشابه فیزیولوژیکی باشند ثابت است. در سلول‌های مریستمی این نسبت بالاست (۰/۵ یا بیشتر)، در سلول‌های تمایز یافته این نسبت کاهش می‌یابد و ضمن تمایززدایی و نوجوانی سلول‌ها، دوباره افزایش می‌یابد.

طی مراحل مختلف زیست سلول هسته دستخوش تغییرات و تحولات زیادی می‌شود به‌طور معمول و از آنجا که این تغییرات بیشتر مربوط به وضع، کروماتین درون هسته می‌شود، متناسب با تغییرات کروماتین، دو حالت یعنی هسته انترفازی (گاهی تحت عنوان در حال آرامش) و هسته به حال تقسیم در نظر می‌گیرند. هنگام تقسیم سلولی از تحولات و تغییرات کروماتین، رشته‌های رنگ‌پذیر کروموزوم‌ها پدیدار می‌شوند.

ساختمان عمومی هسته

برای بررسی ساختمان عمومی هسته می‌توان از میکروسکوپ‌های نوری و الکترونی استفاده کرد. مطالعه هسته در سلول‌های زنده با استفاده از رنگ‌آمیزی‌های زیستی و برای مثال به وسیله محلول رقیق بنفش دالیا[2] و یا با میکروسکوپ فاز متضاد انجام می‌شود. در سلول‌های تثبیت شده به وسیله فیکساتورهایی مثل فیکساتور کارنوی، بوئن، مایع فلمینگ از رنگ‌کننده‌های مناسب مثل هماتوکسیلین، سافرانین، سبزمتیل و یا پیرونین استفاده می‌شود. این بررسی‌ها و نیز مشاهدات انجام شده با میکروسکوپ‌های الکترونی گذاره نشان داده است که در ساختمان هسته بخش‌های زیر وجود دارند:

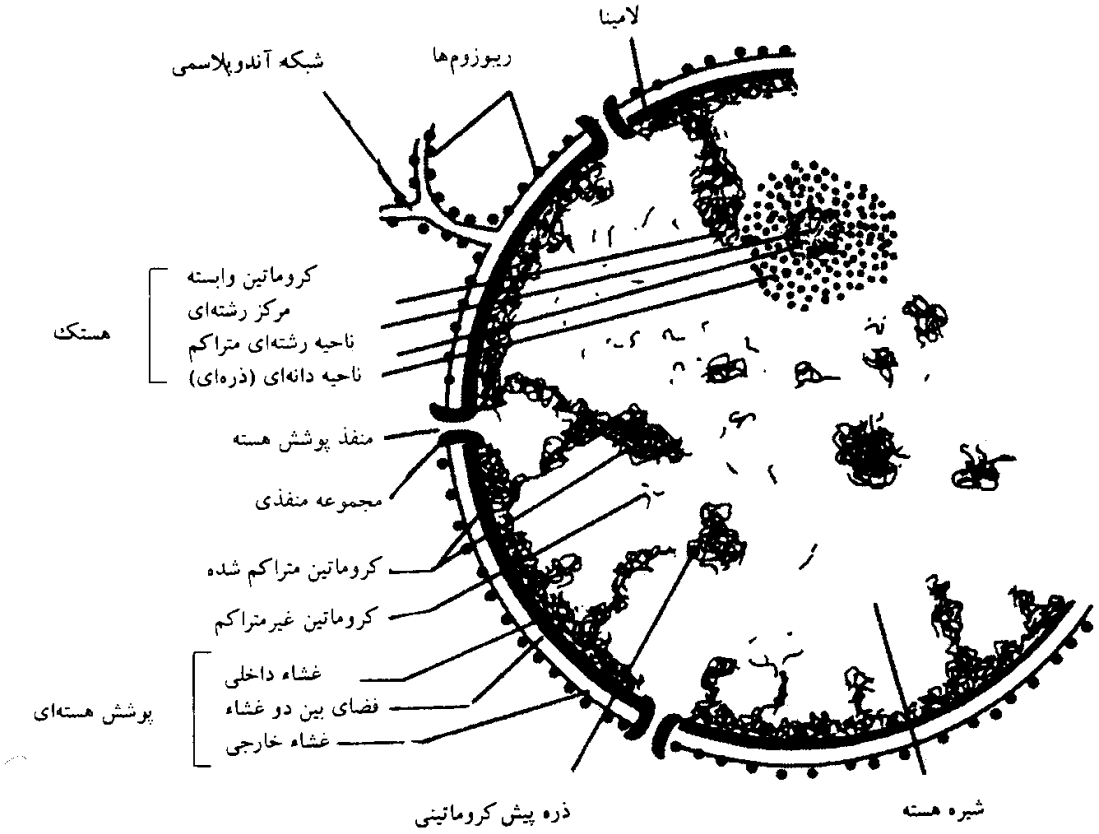
پوشش هسته‌ای[3] شیره هسته (نوکلئوپلاسم یا کاریولنف)، اسکلت هسته‌ای، کروماتین و هستک یا هستک‌ها.

پوشش هسته‌ای: اطراف هسته سلول‌های یوکاریوتی را پوشش هسته‌ای شامل غشاء بیرونی، غشاء درونی، فضای بین دو غشاء و منافذ هسته‌ای پوشانیده است.

غشاء بیرونی یک غشاء زیستی متشکل از دو لایه فسفولیپیدی و پروتئین‌های پراکنده در بین آنها است که شباهت زیادی به غشاء آندوپلاسمی دارد و همانند غشاء شبکه خشن دارای تعدادی ریبوزوم است، ضخامت متوسط این غشاء حدود ۶۰ تا ۷۰ آنگستروم می‌باشد. بخش‌هایی از این غشاء در امتداد پیوستگی با غشاء شبکه آندوپلاسمی است.

فضای بین دو غشاء یا فضای دور هسته‌ای[4] فضایی به وسعت حدود ۶۰ تا ۱۰۰A° در بین دو غشاء هسته است که وسعت آن در همه جای پوشش هسته‌ای یکنواخت نیست، در برخی نواحی وسیع‌تر و در محل منافذ یا سوراخ‌های هسته‌ای که دو غشاء پوشش هسته‌ای به‌هم می‌رسند، وسعت فضای دور هسته‌ای به صفر می‌رسد. فضای دور هسته از ترکیبی بسیار سیال که در آن آب، نمک‌های کانی، یون‌ها، مواد آلی مختلف از جمله لیپیدها، پروتئین‌ها، ترکیبات گلوسیدی، نوکلئوتیدهای پرانرژی و مانند آن وجود دارد. فراوانی آب، لیپیدها و تاحدی پروتئین‌ها به حالت سیال محتویات بین دو غشاء کمک می‌کند. این مواد با ترکیبات فضای درون آندوپلاسمی پیوستگی دارند (شکل ۱۴-۱).

1- Hertwig 2- Violet dahia 3- Nuclear envelope 4- Space Prenuclear



شکل ۱۴-۱. نمای ساختمان عمومی هسته در سلول یوکاریوتی

غشاء داخلی: غشایی زیستی به ضخامت حدود ۶۰ تا ۷۰ انگستروم، شبیه غشاء شبکه آندوپلاسمی و فاقد ریبوزوم است. این غشاء با واسطه لایه نازک پروتئینی (پروتئین‌های لامینایی) با کروماتین ارتباط دارد.

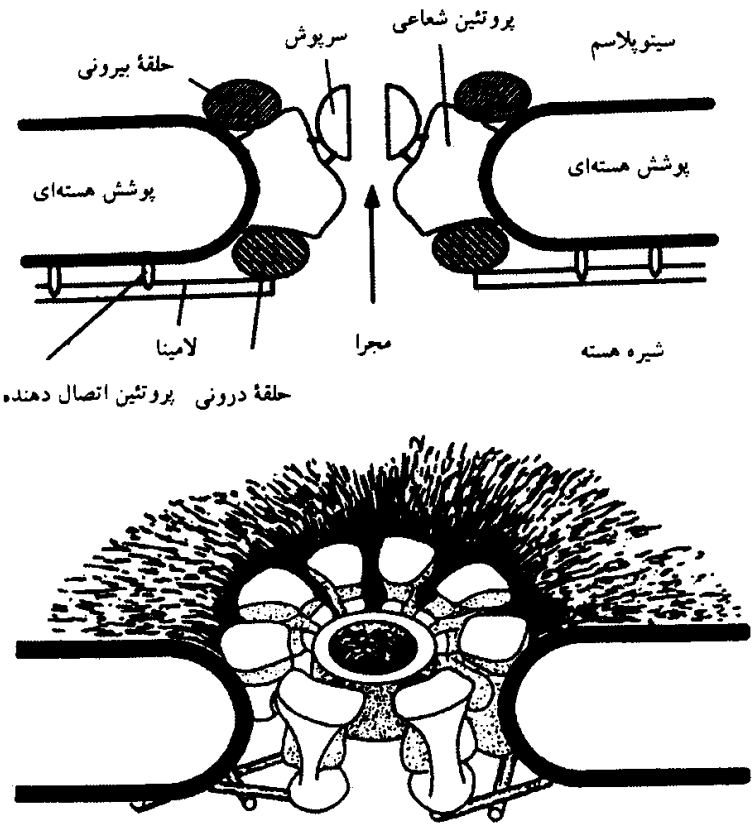
منافذ پوشش هسته‌ای: در پوشش هسته‌ای ساختمان‌های پروتئینی فعال و ویژه‌ای به اسم منافذ هسته‌ای وجود دارد. وجود این منافذ به وسیله هرتویگ در ۱۸۷۶ حدس‌زده شد. این ساختمان‌ها در حقیقت منافذ با غیرفعالی که همه مواد بتوانند از آنها بگذرند و بین هسته و سیتوپلاسم جابه‌جا شوند، نیستند بلکه گذرگاه‌های فعالی هستند که مبادله مواد بین هسته و سیتوپلاسم را کنترل می‌کنند. اگر مجموعه‌ای از پروتئین‌های هسته‌ای مثل هیستون‌ها را که در سیتوپلاسم سنتز می‌شوند و پروتئین‌های سیتوپلاسمی را نشاندار کنیم، تجربه نشان می‌دهد که برخی پروتئین‌هایی که باگذر از محل منافذ پوشش هسته‌ای به هسته وارد شده و در آن مجتمع می‌شوند دارای یک بخش نشانه می‌گردند که به کمک آن از بازگشتشان به سیتوپلاسم جلوگیری می‌شود و برای مثال مقدار هیستون‌ها در هسته به ۱۰۰ تا ۲۰۰ برابر سیتوپلاسم می‌رسد. همچنین بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که منافذ هسته‌ای عبور یون‌های منفی را کنترل می‌کنند. از طرفی منافذ هسته‌ای ساختمان‌های دایمی و پایداری نیستند و متناسب با نیاز سلول ایجاد می‌شوند یا تعدادی از آنها ناپدید می‌گردند. در سلول‌هایی که فعالیت متابولیکی زیادی دارند و مبادله مواد از جمله RNAها و پروتئین‌ها بین هسته و سیتوپلاسم زیاد است تعداد منافذ هسته‌ای زیاد می‌شود و در مجموع وسعتشان تا ۳۶٪ از سطح کل پوشش هسته‌ای هم می‌رسد. برعکس در سلول‌هایی که مبادلات هسته و سیتوپلاسم کم باشد از جمله سلول‌های هلا، تعداد منافذ هسته‌ای کاهش می‌یابد و تنها حدود ۵٪ از سطح کل پوشش هسته‌ای را اشغال می‌کنند.

در فراساختار منافذ هسته‌ای با میکروسکوپ الکترونی مشخص شده است که در محل هر منفذ دو غشاء هسته

[illegible] می‌رسد و فضای دور هسته‌ای به [illegible] می‌رسد. هر منفذ به وسیله مجموعه‌ای از دوازده متراکم پروتئینی[1] احاطه شده است. این ساختمان‌های پروتئینی بر روی هم «مجموعه منفذی[2]» می‌نامند.

مجموعه‌های منفذی ساختمان‌های پروتئینی هستند که دهانه حفره منفذ هسته‌ای را احاطه می‌کنند و از دو حلقه که یکی در سطح سیتوزولی و دیگری در سطح نوکلئوپلاسمی (شیره هسته) قرار گرفته، تشکیل شده است. حلقه‌ها به پوشش هسته‌ای متصلند.

هر حلقه از ۸ جزء گویچه‌ای پروتئینی ساخته شده است. ۸ ساختمان پروتئینی شعاعی یا شعاع‌ها[3] که به دو حلقه پروتئینی پیوسته‌اند، بخش پیرامونی مجموعه منفذی را به یک ذرّه مرکزی یا در پوش متصل می‌کنند (شکل ۱۴-۲).



شکل ۱۴-۲. نمای ساختمان یک منفذ هسته‌ای. در بالا، برش عرضی؛ در پایین دید از نیمرخ

در پوش دارای یک مجرای ۹ تا ۱۰ نانومتری است که محل اصلی عبور مواد است. قطر هر منفذ هسته‌ای حدود ۱۲۰ نانومتر و ضخامت مجموعه منفذی حدود ۷۰ نانومتر است. حلقه داخلی با پروتئین‌های لامینایی تماس دارد. مجموعه منفذی از حدود ۵۰۰ پروتئینی که هنوز به خوبی شناخته نشده‌اند و در ۱۰۰ تیپ مولکولی مختلف گروه‌بندی می‌شوند، تشکیل شده است. یکی از این تیپ‌های پروتئینی، گلیکوپروتئین تداخل یافته به غشاء هسته‌ای است که امکان اتصال مجموعه منفذی با غشاء هسته‌ای را فراهم می‌سازد.

تزریق پروتئین‌های نشاندار در یک سلول برای مثال اووسیت دوزیستان امکان می‌دهد نقش تنظیمی مهم این مجموعه‌های منفذی را بشناسیم. اگر پروتئین‌ها کوچک مولکول و دارای وزن مولکولی کمتر از ۲۰ کیلو دالتون باشند به هسته نفوذ می‌کنند و در کمتر از ۲۴ ساعت به حالت متوازنی بین هسته و سیتوپلاسم پراکنده می‌شوند. برعکس وقتی وزن مولکولی پروتئین‌ها بیش از ۵۰ کیلو دالتون باشد وضع متفاوت است. برای مثال اگر هیستون‌ها و آلبومین سرم گاو (BSA) به‌طور همزمان به سلولی تزریق شده باشند، تنها هیستون‌ها در هسته جمع می‌شوند؛ بنابراین انتقال انتخابی است. یک پروتئین هسته‌ای به نام نوکلئوپلاسمین (پروتئینی اسکلتی که برای پیوستن هیستون‌ها هنگام تشکیل نوکلئوزوم‌ها وارد عمل می‌شود) امکان داده است که چگونگی عمل را بهتر درک کنیم. پس از تزریق نوکلئوپلاسمین به اووسیت، این پروتئین به سرعت به هسته نفوذ می‌کند مگر آن که ۱۰ تا ۱۵ اسیدامینه موجود در بخش N - انتهایی آن برداشته شده باشد. بنابراین یک ترتیب نشانه وجود دارد.

1- Annulus 2- Poral Complex 3- Rayons

بررسی‌های بیشتر بر روی پروتئین‌هایی که به سرعت به هسته نفوذ می‌کنند امکان داده است ویژگی‌هایی را برای این نشانه در نظر بگیریم: ۱) این نشانه دارای ۱۰ اسیدامینه است؛ ۲) دارای تعداد زیاد اسیدهای امینه باردار (آرژینین و لیزین) است؛ ۳) ممکن است هنگام عبور در هر بخشی از پروتئین قرار گرفته باشد؛ ۴) پس از نفوذ پروتئین به درون هسته حذف نمی‌شود (شکل ۱۴-۳).

از آنجا که ترتیب‌های نشانه متفاوتی می‌تواند وجود داشته باشد چنین نتیجه‌گیری شده است که حدّ منفذ گیرندهٔ اختصاصی ویژه‌ای وجود ندارد. تصوّر کنونی بیشتر اینست که یک پروتئین سیتوزولی وجود دارد که می‌تواند این ترتیب‌های نشانه را بشناسد و خود دارای ترتیبی از اسیدهای امینه قابل شناسایی به وسیله یکی از پروتئین‌های مجموعه منفذی است و بنابراین اتصال با مجموعه منفذی از راه پروتئینی رابط صورت می‌گیرد. اما از وقتی که پروتئین منتقل شونده با مجموعه منفذی متصل شود، به‌طور مستقیم تحت کنترل مجموعه منفذی قرار می‌گیرد. با تزریق پروتئین‌های نشاندار به سلولی که در آن سنتز ATP مهار شده است، مشخص شده که مولکول‌های پروتئینی در محل منفذ جمع می‌شوند اما به هسته نفوذ نمی‌کنند؛ تزریق ATP موجب به راه افتادن انتقال به وضع عادی می‌شود. تصور می‌شود که منافذ برای امکان عبور پروتئین‌ها آب جذب می‌کنند و این وضع موجب تغییر شکل فضایی مولکول‌های مجموعه منفذی می‌شود؛ تغییر شکلی که هنوز به خوبی شناخته نشده است. اما تصوری که بیشتر متداول است اینست که منفذ به حالتی شبیه دیافراگم عمل می‌کند که تحت تأثیر نشانه، باز می‌شود.

شکل ۱۴-۳. a) راه‌های گوناگون مبادله مواد بین هسته و سیتوپلاسم؛ b) تعدادی از منافذ هسته‌ای (پیکان‌ها) در برش مشاهده شده با میکروسکوپ الکترونی گذاره؛ ER، شبکه آندوپلاسمی؛ M، میتوکندری؛ C، سیتوزول؛ ج) پوشش هسته‌ای و منافذ آن در نمونه تهیه شده با فن انجماد و ایجاد شکاف دیده می‌شود.

تمام موادی که بین هسته و سیتوپلاسم مبادله می‌شوند به‌طور الزامی از منافذ هسته‌ای نمی‌گذرند. برخی مولکول‌های کوچک و یون‌ها به سهولت از هر دو غشاء عبور می‌کنند. مولکول‌های درشت‌تر و برخی ذرات با

تشکیل حفره‌هایی (ویزیکول‌هایی) که از فضای دور هسته‌ای عبور می‌کنند و مواد خود را در طرف دیگری از پوشش هسته تخلیه می‌کنند، مبادله می‌شوند.

شیرهٔ هسته (کاریولنف = نوکلئوپلاسم)

مایعی است از نظر کلی شبیه سیتوزول و کمی متراکم‌تر از آن به دلیل فراوانی اسیدهای نوکلئیک PH اسیدی دارد. از نظر ترکیب شیمیایی بخش اعظم آن را آب تشکیل می‌دهد، همچنین مواد کانی و آلی مختلفی در آن قرار دارند. از مهم‌ترین مواد کانی آن می‌توان Ca^{++}، K^{++}، Na^{++} و مانند آن را نام برد. از مواد آلی مقدار کمی لیپید و از قندها، گلوسیدهای مؤثر در تشکیل نوکلئوتید مثل (ریبوز و دزوکسی‌ریبوز) در آن وجود دارند.

مواد پروتئینی موجود در شیره هسته به دو گروه تقسیم می‌شوند:

الف - پروتئین‌های آنزیمی که مهم‌ترین آنها عبارتند از: DNA سنتتازها (RNA پلیمراز I و II و III) RNA سنتتازها (RNA پلیمراز I و II و III)، لیگازها که عامل اتصال نوکلئوتیدها به‌هم و تشکیل قطعات پلی‌نوکلئوتیدی ضمن عمل همانندسازی[1] هستند.

آنزیم‌های آندونوکلئاز و اگزونوکلئاز که بخش‌های آسیب‌دیده DNA را می‌بُرند و اصلاح می‌کنند و در ترمیم بخش‌های آسیب‌دیده DNA مؤثرند. در اثر پرتوهای شدید آفتاب به پوست نوعی جهش ایجاد می‌شود که اگر توسط این آنزیم اصلاح نگردد، پایدار می‌شود.

آنزیم‌های فسفریلاز که بیشتر نوکلئوزید فسفریلاز هستند و موجب فسفری شدن نوکلئوزیدها و تبدیل آنها به نوکلئوتیدهای فسفریله می‌شود (نوکلئوزید = قند + بازآلی).

فسفاتازهای اسیدی که گروه‌های فسفات اضافی را از نوکلئوتیدهای‌تری فسفات به هنگام اتصالشان به یکدیگر جدا می‌کنند.

ب - *پروتئین‌های ساختمانی:* از مهم‌ترین پروتئین‌های ساختمانی موجود در شیره هسته هیستون‌ها هستند که به ویژه در سلول‌های بدنی فراوانند و پروتامین‌ها که در هسته سلول‌های جنسی زایشی وجود دارند پروتئین‌های غیرهیستونی[2] که به مقدار زیاد در شیره هسته وجود دارند. به‌طوری که خواهیم دید این پروتئین‌ها که حالت اسیدی دارند در تمایز سلول‌ها و بافت‌ها نقش اساسی دارند.

در شیره هسته شبکه کروماتین و هستک یا هستک‌ها وجود دارند.

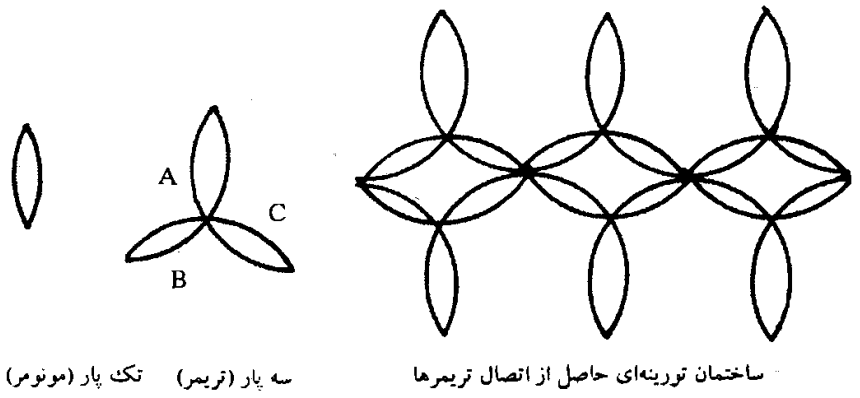
اسکلت هسته‌ای[3]

در سال‌های اخیر با استفاده از روش‌های دقیق الکتروفورز، کروماتوگرافی و نیز به کارگیری میکروسکوپ‌های الکترونی شبکه سازمان‌یافته پروتئینی ویژه‌ای در شیره هسته شناخته شد که آن را به دلیل نقشی که در پایداری شکل هسته و کروماتین دارد، اسکلت هسته‌ای نامیدند.

اسکلت هسته‌ای زیربنای پروتئینی دارد و از پروتئین‌های خاصی به اسم لامین یا لامینا[4] ساخته شده است. این پروتئین‌ها به حالت تریمرهایی متشکل از سه منومر در اسکلت هسته‌ای دیده می‌شوند. منومرهای لامینایی را با حرف A، B، C یا a، b، c معرفی می‌کنند. هر منومر وزن مولکولی حدود ۶۰ تا ۷۰ کیلو دالتون دارد. منومر A و C

1- Replication 2- Non Histons Proteins 3- Nuclear Squeleton
4- Lamina

بسیار شبیه هستند و حتی تصور می‌شود ژن‌های مشابه یا مشترکی داشته باشند. تریمرهای لامینایی که از مجموعه سه منومر A، B و C ساخته شده‌اند همانند شبکه تورینه‌ای به‌هم می‌پیوندند و اسکلت هسته‌ای را می‌سازند (شکل ۱۴-۴). بخش محیطی اسکلت هسته‌ای تراکم بیشتری دارد و بخش درونی آن کم‌تراکمتر و دارای حالت اسفنجی است (شکل ۱۴-۴ و شکل ۱۴-۵).



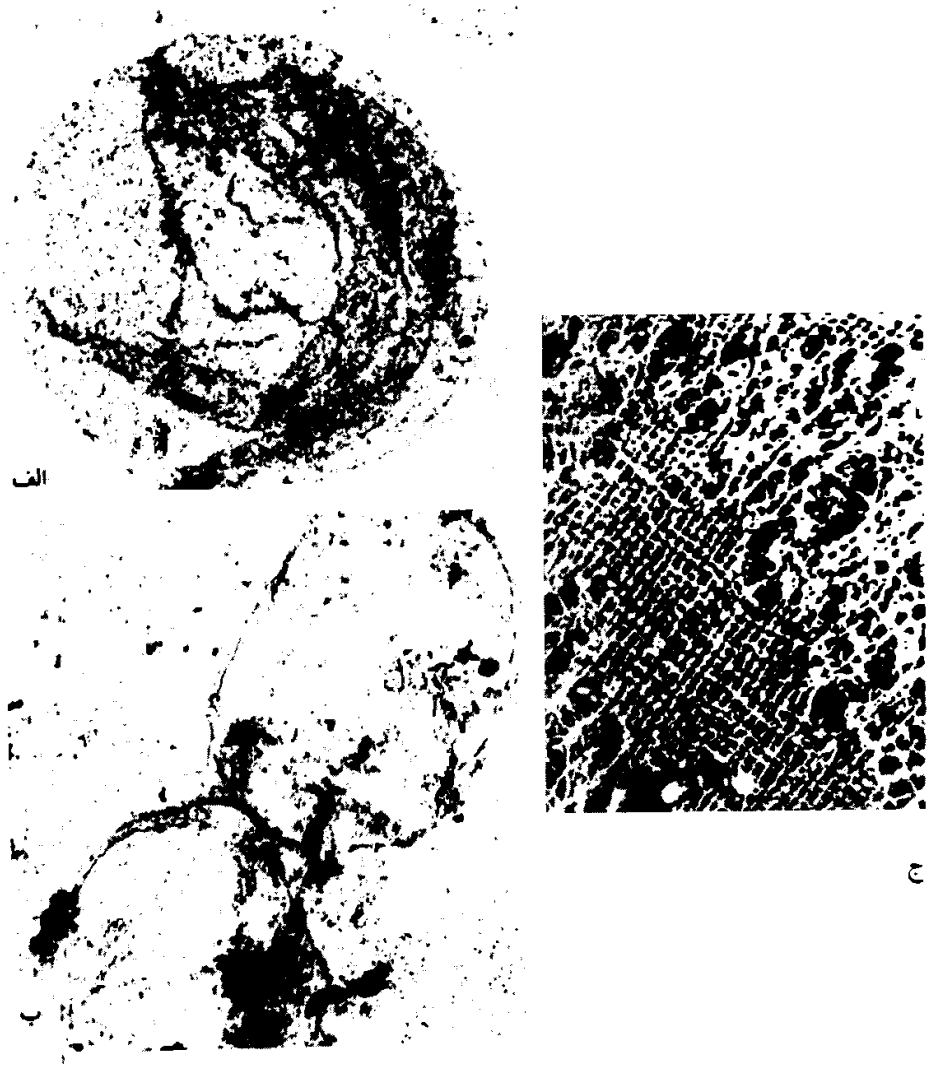
شکل ۱۴-۴. نمایی از تریمرهای لامینایی و تورینهٔ حاصل از پیوستگی آنها

با آگاهی‌های جدیدتر برای اسکلت هسته‌ای مفهوم تازه‌ای در نظر گرفته شده و «مجموعه منفذی» شبکه لامینایی و اسکلت هسته‌ای درونی را بر روی هم اسکلت هسته‌ای می‌گویند. ویژگی‌های «مجموعه منفذی» در صفحات قبل بررسی شد. شبکه لامینایی را شبکه اغلب بسیار ظریفی می‌دانند که در مقابل سطح درونی پوشش هسته‌ای قرار گرفته و با «مجموعه‌های منفذی» اتصال‌هایی دارد. شبکه لامینایی ساختمانی ظریف اما چسبنده است که پس از حذف پوشش هسته‌ای و حل کردن پروتئین‌ها و DNAی موجود در کروماتین، به‌صورت پاکت نازکی باقی می‌ماند و اندازه و حالت هسته را حفظ می‌کند (شکل ۱۴-۵ a، b و c).

لامین نقش ساختمانی مهمی را در تعیین شکل و وضعیت هسته بازی می‌کند. این ساختمان ویژه از اشتراک حداقل دو نوع پلی‌پپتید رشته‌ای تشکیل شده است. لامین‌ها مولکول‌هایی بسیار پایدارند. در پستانداران و پرندگان سه نوع لامین A، B و C و در دوزیستان حداقل پنج نوع و در برخی مهره‌داران تنها دو نوع از آنها شناخته شده است. به حسب وضع لامین‌ها در طول تقسیم سلولی دو نوع لامین در نظر می‌گیرند: لامینایی که همیشه چسبیده به پوشش هسته‌ای باقی می‌ماند (لامین B در پستانداران) و آنهایی که هنگام تقسیم در سیتوپلاسم حل می‌شوند (لامین A و C در پستانداران).

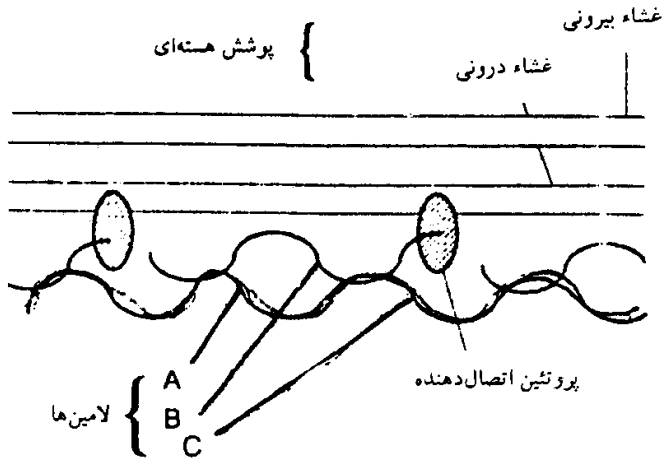
لامین‌ها به اندازه کافی بخش‌های آب‌گریز برای نفوذ به دو لایه لیپیدی غشاء داخلی هسته را ندارند اما با واسطه یک نوع از پروتئین‌های درون غشایی، به آن متصلند (شکل ۱۴-۶). این پروتئین با گروهی متشکل از چهار اسیدامینه که در سر C انتهایی لامین B قرار دارد متصل می‌شود (شکل ۱۴-۶).

اسکلت هسته‌ای درونی ساختمانی است که هنوز اهمیت واقعی و حتی وجود آن مورد بحث است. وقتی هسته‌های جداشده از سلول بتدریج به وسیله نوکلئازها (که DNA و RNAها را حذف می‌کنند) و محلول‌های نمکی قوی (که پروتئین‌های گویچه‌ای را حل می‌کنند) تیمار شوند. چسبیده به لامین یک شبکه سه بعدی درون هسته‌ای باقی می‌ماند که قابل مشاهده با میکروسکوپ الکترونی است و در مجموعه شیره هسته پراکنده است. این ساختمان را اسکلت هسته‌ای درونی یا ماده زمینه‌ای درون هسته‌ای نامند. اگر تیمار هسته با نوکلئازها و محلول‌های نمکی قوی، خیلی مخرّب نباشد، قطعات کوتاهی از ترتیب‌های DNAی، چسبیده به این اسکلت باقی می‌ماند. به نظر می‌رسد که این شبکه اسکلتی، پشتیبانی برای سازمان‌بندی کروماتین باشد.



شکل ۱۴-۵. بخش‌هایی از اسکلت هسته‌ای. a) منظرهٔ عمومی لامین جداشده از سلول سرطانی و b) از سلول‌های مریستمی لوبیا. درشت‌نمایی ۲۰۰۰۰ c) نمایی از روبروی لامینای منفک، مشاهده با میکروسکوپ الکترونی پس از فن سایه‌دهی. لامین‌ها شبکه‌ای را می‌سازند که در برخی قسمت‌ها حالت بافته شده‌ای دارند زیرا موقعیت مولکول‌های رشته‌ای Y بسیار منظم است. درشت‌نمایی ۱۲۰۰۰×۰ (گرفته شده از رُبرت ۱۹۹۴).

هم‌اکنون تصور می‌شود که دو نوع ساختار در تشکیل ماده زمینه‌ای هسته سهم دارند: رشته‌های ضخیم با حالت چندشکلی و متنوع از سلولی به سلول دیگر، این رشته‌ها با محلول‌های قوی نمکی حذف می‌شوند؛ نوع دیگر رشته‌های بسیار نازک و بسیار مقاوم در برابر عوامل استخراج‌کننده‌ای که به هسته اثر داده می‌شوند. این رشته‌ها ماده زمینه‌ای اصلی را تشکیل می‌دهند.



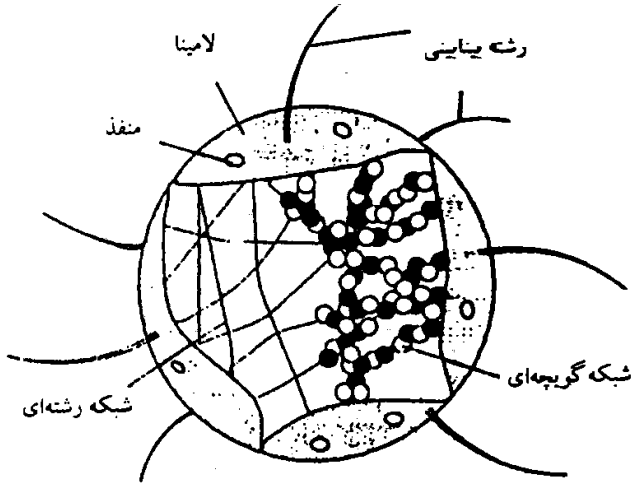
شکل ۱۴-۶. پیوستگی لامین با پوشش هسته‌ای، یک پروتئین اتصال‌دهنده، لامین B را با غشاء داخلی متصل می‌کند.

به این ترتیب به نظر می‌رسد اسکلت هسته‌ای درونی از دو شبکهٔ بر روی هم تشکیل شده است: یکی رشته‌ای و دیگری دانه‌ای (شکل ۱۴-۷).

شبکه اول از پروتئین‌های رشته‌ای ساخته شده و نقش پشتیبان را برای شبکه دوم دارد. شبکه دوم از پروتئین‌های گویچه‌ای ساخته شده که بین آنها ساختمان‌های چند آنزیمی دخالت‌کننده در رونویسی و همانندسازی وجود دارد.

هستک[1]

هستک از اجزای ساختمانی سلول است که به‌صورت یک اندامک درون هسته‌ای و بدون غشاء در شیره هسته قرار دارد. هستک در ۱۷۸۱ به وسیله فونتانا[2] کشف شد. تعداد آن به‌طور معمول ۱ یا ۲ هستک در هسته هر سلول، گاهی تا چند عدد و در هسته اووسیت دوزیستان تعداد زیادی هستک وجود دارد. هستک‌ها اغلب کروی شکل و به‌صورت ذراتی متراکم هستند. با میکروسکوپ نوری اغلب به‌صورت ذراتی متراکم و همگن دیده می‌شوند و گاهی در آنها بخش‌هایی روشن با تراکم کمتر و یا برعکس بخش‌هایی متراکم‌تر دیده می‌شود. بین درشتی هستک و فعالیت بیوسنتزی پروتئینی سلول وابستگی وجود دارد و به‌طور معمول سلول‌های دارای سنتز پروتئین بیشتر مثل اووسیت‌ها، سلول‌های ترشحی و نورون‌ها، هستک‌های درشت‌تری دارند. در اسپرماتیدها، بلاستومرها و سلول‌های عضلانی هستک‌ها کوچکند. هستک‌ها به راحتی با پیرونین رنگ می‌گیرند (مایل به قرمز می‌شوند) و پرتوهای فرابنفش با طول موج ۲۶۰ نانومتر را به خوبی جذب می‌کنند. این ویژگی‌ها نشانه فراوانی RNA در آنها است. یک منطقه کروماتینی متراکم و کم‌وبیش حلقه‌وار اطراف هستک را احاطه کرده است که با روش فولگن رنگ قرمز می‌گیرد.



شکل ۱۴-۷. نمایی از مواد زمینه‌ای هسته‌ای (لامین‌ها + اسکلت هسته‌ای درونی) وارتباط آن با ریزرشته‌های بینابینی اسکلت سلولی. بخش رشته‌ای تنها در طرف چپ طرح و بخش رشته‌ای و دانه‌ای در طرف راست نشان داده است (برگرفته از Dacheng HE و همکاران، ۱۹۹۰).

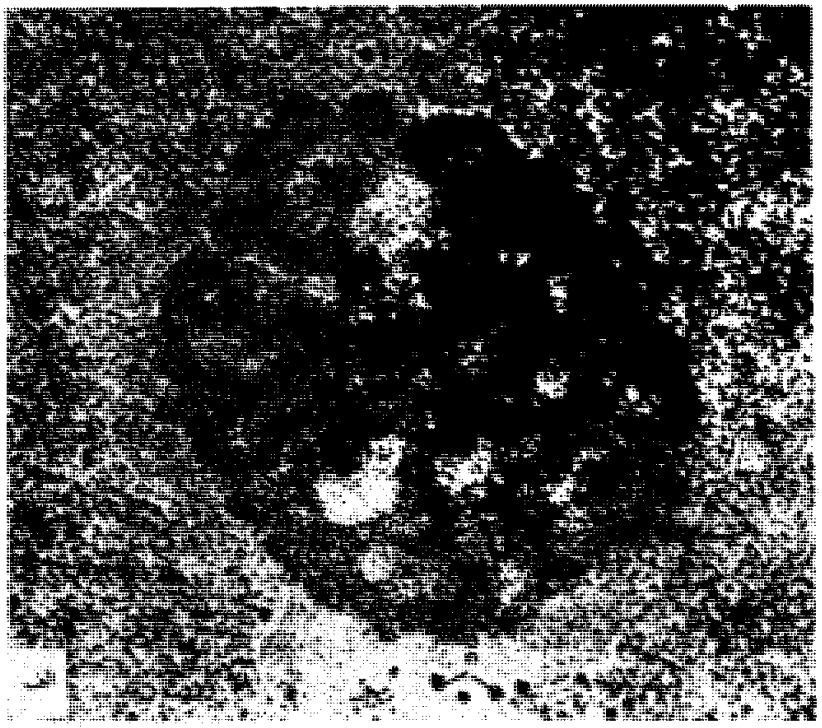
در فراساختمان هستک با میکروسکوپ‌های الکترونی وجود بخش‌های زیر مشخص شده است:

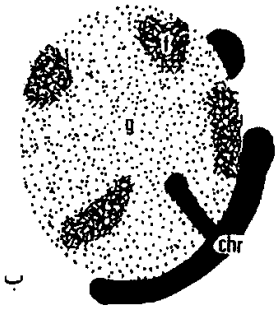
۱- ***بخش دانه‌ای***[3]: از ذرات متراکم کروی یا کم‌وبیش منشوری و متراکمی به قطر حدود ۱۵۰ تا ۲۵۰ انگستروم ساخته شده که ساختمان ریبونوکلئوپروتئینی دارند و با مراحل مختلفی از تکامل ریبوزوم‌ها مطابقت می‌کنند. بخش دانه‌ای بیشتر نواحی بیرونی هستک را اشغال کرده است (شکل ۱۴-۸ الف و ب). برخی از این ذرات در واقع پیش ریبوزوم‌ها[4] هستند که به طور موقت در هستک باقیمانده و سپس با عبور از منافذ هسته‌ای وارد سیتوپلاسم می‌شوند و به‌صورت ریبوزوم‌های فعال عمل می‌کنند.

۲- ***بخش رشته‌ای***[5]: از رشته‌های باریک ریبونوکلئوپروتئینی به طول حدود ۱۰۰ تا ۸۰۰ انگستروم و ضخامت ۵۰ تا ۲۰۰ انگستروم تشکیل شده است. بخش رشته‌ای در قسمت‌های درونی هستک قرار دارد (شکل ۱۴-۸ ب). بخش رشته‌ای همانند بخش دانه‌ای توسط ریبونوکلئازها خراب می‌شود. بخش رشته‌ای دارای DNA (ژن‌های) ریبوزومی و اولین نتایج رونویسی آنها یعنی RNA۴۵S می‌باشد.

۳- ***کروماتین وابسته***[6]: در بیشتر سلول‌ها اطراف هستک به وسیله بخش متراکم و کم‌وبیش حلقه‌واری از کروماتین احاطه شده که قسمت‌های هتروکروماتینی برخی کروموزوم‌ها است و آن را کروماتین وابسته به هستک می‌نامند. از این بخش‌ها دنباله‌هایی به درون هستک کشیده می‌شود (شکل ۱۴-۸ الف) و به همین دلیل برای

1- Nucleole 2- Fontana 3- Pars Granulosa 4- Proribosomes 5- Pars Fibrosa
6- Nucleolar Associted Chromatin





شکل ۱۴-۸. الف) ساختمان‌های هستک در یکی از سلول‌های کبدی موش، پس از رنگ‌آمیزی برش با استات‌اورانیل و EDTA. این تیمار DNA را بی‌رنگ می‌کند (درشت‌نمایی ۶۰۰۰۰ برابر). ب) نمای فراساختمان هستک. f: بخش رشته‌ای؛ g: بخش دانه‌ای؛ ac و chr: کروماتین وابسته؛ Pc: ذرات پیش کروماتینی

کروماتین هستکی دو بخش در نظر گرفته می‌شود یکی بخش دور هستکی (پیرامونی) و دیگری بخش درون هستکی. بر روی قسمت‌هایی از کروماتین وابسته، به نام سازمان‌دهندگان هستکی[1] است، که ژن‌های مسئول بیوسنتز RNAهای ریبوزومی جز rRNA۵S، قرار گرفته‌اند. سازمان‌دهندگان هستکی در ارتباط با بخش‌های هتروکروماتینی به ویژه فشردگی‌های ثانویه عده‌ای از کروموزوم‌ها هستند.

بررسی‌های اتورادیوگرافی نشان داده است که اوریدین تریسیوم‌دار ابتدا به ناحیه رشته‌ای و سپس به بخش دانه‌ای تداخل پیدا می‌کند. این وضع ارتباطی به‌صورت: DNA هستکی - بخش رشته‌ای - بخش دانه‌ای را القا می‌کند.

۴- ***بخش بی‌شکل***[2]: زمینه پروتئینی است که بخش‌های دیگر در آن قرار گرفته‌اند. در مورد ماهیت و وجود بخش بی‌شکل اتّفاق نظر وجود ندارد.

هنگام میتوز، هستک‌ها دارای تحولات دوره‌ای (چرخه‌ای) هستند. هستک‌ها در اطراف حلقه‌های DNA تشکیل می‌شوند که از سازمان‌دهندگان هستکی گسترش یافته‌اند. در این محل‌ها ممکن است چندین هستک تشکیل شود که اغلب به‌هم ادغام شده و به‌صورت یک یا چند هستک (تعداد کمتری از تعداد اولیه) در می‌آیند. در اواخر پروفاز، حلقه DNAی که دارای ژن‌های rRNA است به‌تدریج متراکم شده و به‌صورت به‌هم پیچیده‌ای در سازمان‌دهنده هستکی کروموزوم مربوط جا می‌گیرد. از آنجا که این DNA برای سنتز مقدار قابل توجهی از RNA ریبوزومی به کارگرفته می‌شود و گسترش زیادی دارد، ناحیه سازمان‌دهنده هستکی یکی از آخرین بخش‌هایی است که متراکم می‌شود و به این ترتیب یک فشردگی ثانویه را روی کروموزوم به وجود می‌آورد. بخش‌های رشته‌ای و دانه‌ای به‌تدریج در شیره هسته پراکنده می‌شوند، در تلوفاز، پیچیدگی DNAی سازمان‌دهنده هستکی باز می‌شود و

1- Nucleolar Organizers 2- Pars Amorphe

هستک(ها) دوباره پدیدار می‌شوند.

به‌طور خلاصه، ساختمان اصلی دارای RNA در هسته، هستک است. هستک اندامکی بسیار متراکم و پراش‌دهنده پرتوها است. در ساختمان هستک مقدار زیادی پروتئین وجود دارد. مقدار RNAهای آن از ۳ تا ۱۰ درصد ماده خشک هستک می‌رسد. در اغلب موارد هستک به وسیله حلقه‌ای از هتروکروماتین احاطه شده که می‌تواند به درون هستک نفوذ کند. در ساختمان ظریف هستک دو بخش اساسی قابل تشخیص است: نواحی رشته‌ای و نواحی دانه‌ای (شکل ۱۴-۸).

این بخش‌ها از ریبونوکلئوپروتئین ساخته شده و با تشکیل ریبوزوم‌ها وابسته‌اند. هستک در اطراف ناحیه سازمان‌دهنده هستکی کروموزوم‌ها، ناحیه‌ای که دارای ژن‌های رمزدارکننده RNAهای هستکی (جز RNA۵S) می‌باشد، تشکیل می‌شود. بخش رشته‌ای دارای rRNA و فراورده‌های بنیادی رونویسی آن یعنی RNA۴۵S می‌باشد. بخش دانه‌ای دارای پیش‌سازهای ریبوزومی در مراحل مختلف سازمان‌یافتگی است. هستک در طول تکثیر سلولی دارای تغییرات چرخه‌ای است. در اواخر پروفاز ناپدید می‌شود و دوباره در تلوفاز پدیدار می‌شود.

نقش زیستی هستک

هستک جایگاه تشکیل ریبوزوم‌ها است. بیوژنز ریبوزوم‌های یوکاریوتی پدیده پیچیده‌ای است که به فعالیت و هماهنگی بخش‌های مختلفی از سلول نیاز دارد. در نتیجه رونویسی از ژن‌های نواحی سازمان‌دهنده هستکی ابتدا یک RNA۴۵S ایجاد می‌شود که ضمن مراحل مختلف پردازش (در بحث رونویسی شرح داده شده) به rRNA ۲۸S، ۱۸S و ۵/۸S تبدیل می‌شود. rRNA ۵S از ژن‌هایی است که بر روی سایر بخش‌های رشته‌های کروماتینی (جز نواحی سازمان‌دهنده هستکی) قرار دارند و در خارج از هستک رونویسی می‌شود و به هستک می‌رسد. پروتئین‌های جزء کوچک و جزء بزرگ ریبوزوم نیز در سیتوپلاسم و توسط ریبوزوم‌های سیتوپلاسمی سنتز شده با عبور از منافذ پوشش هسته‌ای به هسته و هستک می‌رسند. تمام این اجزا در هستک که جایگاه سازمان‌دهی ریبوزوم‌ها است، تشکّل پیدا کرده و به پیش ریبوزوم‌ها تبدیل می‌شوند پیش ریبوزوم‌ها در مسیر مهاجرت خود به سیتوپلاسم، تغییرات نهایی را پیدا کرده، پس از رسیدن به سیتوپلاسم به‌صورت ریبوزوم‌های فعال عمل می‌کنند.

در نمونه‌ای از دوزیستان به اسم زنوپوس‌لویس[1] (از قورباغه‌های افریقای جنوبی)، تیپ وحشی در هسته سلول‌های خود دارای دو هستک است، برخی جهش‌یافته‌های هتروزیگوت تنها دارای یک هستک و برخی دیگر که حالت هموزیگوت دارند فاقد هستک هستند. آمیزش دو قورباغه هتروزیگوت موجب می‌شود که ۲۵٪ لاروهای حاصل فاقد هستک شوند. این لاروها تنها تا حدود یک هفته و با استفاده از ریبوزوم‌های والدی که از سیتوپلاسم تخمک به ارث رسیده زنده می‌مانند و بعد چون توانایی سازمان‌دهی ریبوزوم‌های جدید را ندارند می‌میرند.

در هستک آنزیم‌های مختلفی وجود دارند که در واکنش‌های بیوشیمیایی مربوط به بیوسنتز و یا بلوغ RNAهای ریبوزومی دخالت دارند. هستک دارای:

RNA پلیمراز وابسته به DNA است که سنتز RNA را تسهیل و رهبری می‌کند. کونورتاز که در پردازش RNA۴۵S دخالت دارد و موجب تبدیل آن به rRNA۳۲S و سپس ۲۸S می‌شود؛ متیلازها (عامل تثبیت CH_3 – بر روی مولکول RNA)؛ ریبونوکلئازها (عامل باز کردن تصالح‌های فسفودی‌استری RNAها) و پلی‌ریبوآدنیلات سنتتاز اسید که سنتز اسید پلی‌ریبوآدنیلیک را در هستک رهبری می‌کند از آنزیم‌های هستکی هستند.

1- Xenopous lowis

در جهش یافته‌های فاقد هستکِ زنوپوس‌لویس، ژن‌های rRNA5S به‌طور طبیعی رونویسی می‌شوند زیرا این ژن‌ها در هستک قرار ندارند.

یکی از نقش‌های زیستی دیگری که برخی محققان برای هستک در نظر می‌گیرند، دخالتش در میتوز است. تابانیدن UV به هستک و تخریب آن در G_2 موجب عدم تقسیم سلولی می‌شود.

کروماتین[1]

ترکیب اصلی هسته، کروماتین است، شبکه کروماتین از درهم رفتن رشته‌های کروماتینی تشکیل شده و این رشته‌ها در حقیقت حالت بسیار کم‌تراکم شده‌ای از کروموزوم‌ها هستند.

ترکیب شیمیایی: رشته کروماتین یا کروموزم انتر فازی، مجموعهٔ مولکولی پیچیده‌ای است که در آن DNA، دارای اطلاعات ژنتیکی و پروتئین‌های مختلف وابسته به آن که نقش ساختمانی یا عملی دارند و نیز مقداری از RNAها وجود دارد.

الف - DNA: مقدار DNA موجود در هسته یک سلول یوکاریوتی بسیار بیشتر از DNA موجود در ساختمان هسته‌نما(نوکلئوئید) یک سلول پروکاریوتی است. برای مثال در انسان، DNA موجود در یک سلول پیکری دارای حدود 6×10^9 جفت باز است که اگر تمامی نوکلئوتیدهای سازنده آن در یک ردیف پشت‌سرهم قرارگیرند طولی حدود دو متر خواهد داشت. در حقیقت در مجموعهٔ ژنی انسان DNA در ۴۶ واحد که هر یک با یک رشته کروماتینی مطابقت دارد پراکنده است. در سلول‌های جنسی این تعداد به نصف کاهش‌یافته و این سلول‌ها ۲۳ کروموزومی هستند و آنها را سلول‌های هاپلوئید[2] نامند. هنگام لقاح یک سلول جنسی نر (اسپرماتوزوئید با سلول جنسی ماده (اوول) ترکیب می‌شود و سلول تخم را به وجود می‌آورد که دارای ۴۶ کروموزوم و دیپلوئید[3] است. تمام سلول‌های پیکری سازنده جاندار بالغ که از تقسیمات میتوزی این سلول تخم منشأ می‌گیرند همان تعداد کروموزوم (۴۶) را دارند.

روش‌های مختلفی نشان داده است که در رشتهٔ کروماتینی در مرحله انترفاز و قبل از همانندسازی، DNA به‌صورت یک مولکول دو زنجیره‌ای است که با یک ماکرومولکول مطابقت دارد. مقدار DNA در هر سلول دیپلوئیدی و برای هرگونه از جانداران، مقداری مشخص است و از گونه‌ای به گونه دیگر تفاوت زیادی دارد.

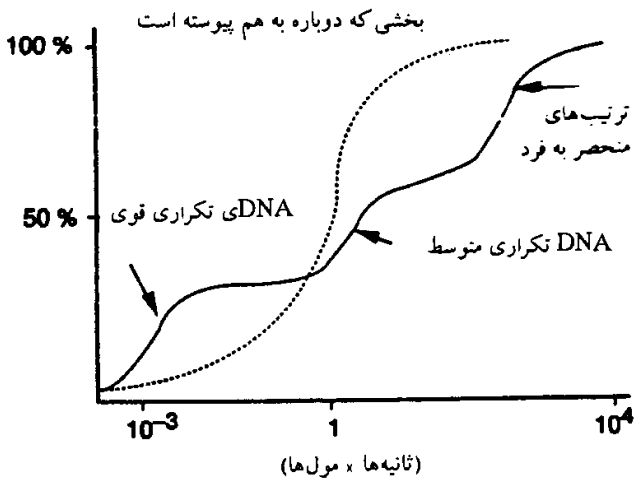
دو زنجیره پلی‌نوکلئوتیدی هر مولکول DNA را می‌توان به کمک گرما از هم جدا کرد. این پدیده همان غیرطبیعی شدن[4] است. دو زنجیره می‌توانند دوباره و به همان وضع اول به یکدیگر بپیوندند این پدیده را بازگشت به وضع طبیعی[5] نامند. پدیده بازگشت به وضع طبیعی به درصد پیوندهای بین دو زنجیره وابسته است، هرچه تعداد پیوندها بیشتر باشد، بازگشت به وضع طبیعی سریع‌تر خواهد بود. DNA ویروس‌ها و باکتری‌ها که از ترتیب‌های به نسبت کوتاهی از نوکلئوتیدها ساخته شده است، تعداد کمی قطعات نوکلئوتیدی متفاوت به وجود می‌آورد و پس از غیرطبیعی شدن، به‌صورت ساده‌ای، به سرعت به وضع طبیعی برمی‌گردد (شکل ۱۴-۹).

DNAی سلول‌های یوکاریوتی، که به‌صورت قطعات نسبتاً کوتاه نوکلئوتیدی بریده شده باشد (۱۰۰۰ جفت باز) وضعیت ویژه‌ای را برای بازگشت به حالت طبیعی نشان می‌دهد. برخی قطعات پدیده بازگشت به حالت طبیعی سریعی دارند (این قطعات تعدادشان زیاد است) و برخی دیگر طبیعی شدنشان کُند است (این قطعات

1- Chromatine 2- haploide 3- Diploide 4- Denaturation 5- Renaturation

در مخلوط کمتر مشخص هستند): بنابراین DNA سلول یوکاریوتی ناهمگن[1] است. تجزیهٔ دقیق‌تر منحنی مربوط به دوباره طبیعی شدن امکان می‌دهد که برای DNA سه بخش در نظر گرفته شود:

بخش اول از قطعات نسبتاً کوتاهی دارای ۱۰ تا ۲۰۰ جفت باز تشکیل شده و دارای قدرت دوباره طبیعی شدن بسیار سریع است و به تعداد چندصد تا چندهزار و حتی تا چند میلیون نمونه (تکرار) در مجموعهٔ ژنی (ژنوم) از آن وجود دارد. این بخش DNA بسیار تکراری (DNA تکراری قوی) را تشکیل می‌دهد که ۱۵ تا ۲۰٪ ژنوم را شامل می‌شود.



شکل ۱۴-۹. سینتیک دوباره طبیعی شدن DNA در کولی‌باسیل (نقطه چین) و DNA سلول پستانداران (خط پُر). DNA کولی‌باسیل به‌صورت ساده‌ای به وضع اول برمی‌گردد. در حالی که برای سلول پستاندار بازگشت پیچیده و نشانه‌ای از ناهمگنی DNA می‌باشد.

بخش دوم با قدرت دوباره طبیعی شدن نسبتاً سریع که از چندصد تا چندهزار تکرار (نسخه) ساخته شده و DNA تکراری متوسط را می‌سازد که ۳۰ تا ۳۵٪ ژنوم است.

بخش سوم از ترتیب‌های منحصر به فرد یا با تکرار کم تشکیل شده است (DNA تکراری ضعیف)؛ در این بخش، احتمال اتصال بین پلی‌نوکلئوتیدی‌های جدا شده ضعیف است و بنابراین دوباره طبیعی شدن کند است. این بخش، ۵۰٪ ژنوم است.

DNA تکراری قوی، رونویسی نمی‌شود و در هسته انترفازی بخشی از کروماتین را می‌سازد که همیشه به حالت متراکم (هتروکروماتین) باقی می‌ماند. این نوع DNA در برخی نواحی کروموزوم‌ها مثل دو انتهای کروموزوم (تلومرها) و یا در سانترومرها که محل اتصال دو کروماتید هر کروموزوم در شروع میتوز هستند فراوان است. مقدار DNA تکراری قوی به‌طور قابل توجهی از گونه‌ای به گونه متفاوت است (در برخی گونه‌ها ۶۰٪ ژنوم و در برخی دیگر کمتر از ۱۵٪) اما دلیل این تفاوت به خوبی روشن نیست.

بخشی از DNA تکراری متوسط ترتیب‌های نوکلئوتیدی است که رونویسی نمی‌شوند و بخش دیگر آن‌ژن‌هایی است که تا چندصد تکرار از آنها وجود دارد؛ ژن‌های رمزدارکنندهٔ آکتین، هیستون‌ها و RNAهای ریبوزومی در این محدوده هستند.

ژن‌های رمزدارکننده اغلب پروتئین‌ها در DNA دارای ترتیب‌های منحصر به فرد (در واقع با دو تکرار در هر سلول دیپلوئید) هستند. در حقیقت ژنوم پستانداران دارای مقدار کافی DNA برای رمزدار کردن ۳ میلیون پروتئینی است که در آنها وجود دارد امّا به نظر می‌رسد در سلول‌های یک جاندار بیش از ۶۰ هزار نوع پروتئین مختلف موجود نباشد. به این ترتیب در یوکاریوت‌ها مقدار زیادی اطلاعات منتظر وجود دارد که انسان هنوز نقش آنها را نمی‌شناسد.

ب - پروتئین‌ها: در ساختمان کروماتین دو گروه از پروتئین‌ها وجود دارد. یک گروه از پروتئین‌هایی که بسیار همگن

1- Heterogene

هستند و تنها در ۵ تیپ مولکولی در ساختمان کروماتین سلول‌های یوکاریوتی وجود دارند. این گروه هیستون‌ها از پروتئین‌های بازی هستند؛ گروه دوم پروتئین‌هایی که از نظر شیمیایی و فیزیولوژی بسیار متنوعند و دارای نقش‌های آنزیمی، ساختمانی، تنظیم‌کنندگی و مانند آن هستند. این پروتئین‌ها را پروتئین‌های غیرهیستونی نامند.

هیستون‌ها پروتئین‌هایی کوچکند که وزن مولکولی آنها بین حدود ۱۰ تا ۲۰ کیلو دالتون است. تجزیه کلی آنها نشان می‌دهد که این پروتئین‌ها به ویژه سرشار از دو اسیدامینه بازی یعنی لیزین و آرژینین هستند.

این پروتئین‌ها دارای بار مثبت قابل توجهی هستند و بنابراین می‌توان آنها را با روش الکتروفورز جدا کرد. از عصاره خام هیستون‌ها، ۵ بخش متفاوت جدا شده است (شکل ۱۴-۱۰). هیستون‌ها مولکول‌هایی گویچه‌ای هستند که دارای یک بخش مرکزی آب‌گریز و بخش‌های انتهایی N و C غنی از اسیدهای آمینه قطبی و باردار می‌باشند و در محیط‌های آبی گسترش زیادی پیدا می‌کنند.

H_1 = بخش بسیار سرشار از لیزین (۲۱۶ اسید آمینه - ۲۱KD)

H_3 = بخش سرشار از آرژینین (۱۳۵ اسید آمینه - ۱۵/۳KD)

H_{2B} = بخش غنی از لیزین (۱۲۵ اسید آمینه - ۱۳/۷KD)

H_{2A} = بخش غنی از لیزین (۱۲۹ اسید آمینه - ۱۳/۹KD)

H_4 = بخش غنی از آرژینین (۱۰۲ اسید آمینه - ۱۱/۲KD)

شکل ۱۴-۱۰. پس از جابه‌جایی بر روی ژل، هیستون‌ها در پنج نوار از هم جدا می‌شوند

هیستون‌ها را به دو گروه به شرح زیر تقسیم‌بندی می‌کنند

هیستون‌های اصلی: هیستون‌های اصلی که حالت اکتامر (۸ مونومر با نسبت برابر) در ساختمان پیکر یا قلب نوکلئوزوم‌ها (واحدهای ساختمانی رشته‌های کروماتینی) وجود دارند و عبارتند از H_{2A}، H_{2B}، H_3، H_4. از ویژگی‌های مهم این هیستون‌ها پایداری (عدم تنوع) ترتیب‌های ساختمانی آنها در جانداران مختلف است یعنی ضمن روندهای تحول و تکامل این پروتئین‌ها دستخوش تغییر زیادی نشده‌اند. برای مثال H_3 جداشده از سلول‌های جنینی جوجه و سلول‌های نخود تنها در دو اسیدامینه تفاوت دارند و یا H_4 که همیشه از ۱۰۲ اسیدامینه ساخته شده در تیموس گوساله و نخود تنها در دو اسیدامینه متفاوتند. یک فرضیه در مورد علت این پایداری این است که همه اسیدهای امینه موجود در ساختمان این پروتئین‌ها نقش مهم و اساسی دارند به نحوی که تغییر هر کدام از آنها می‌تواند موجب تغییر شکل فضایی مولکول هیستونی و عدم کارآیی آن شود. این وضع می‌تواند موجب مرگ جهش یافته‌هایی باشد که در آنها این هیستون‌ها دستخوش تغییر شده باشند.

هیستون‌های فرعی: هیستون فرعی H_1 است که در ساختمان پیکر نوکلئوزوم‌ها وجود ندارد بلکه در حد واسط آنها

قرار گرفته است. H_1 در همه سلول‌های جانداران یکسان نیست و تنوع ساختمانی دارد. مطالعات سال‌های اخیر نقش بسیار مهم و اساسی را برای H_1 از نظر شکل فضایی کروماتین، به‌هم پیوستگی واحدهای ساختمانی آن (نوکلئوزوم‌ها) و ایجاد پیچیدگی‌ها و تابیدگی‌های رشته‌های کروماتینی، مشخص ساخته است. H_1 دارای زیر واحدهایی مثل A، B، C و D است که از نظر ترتیب مشابه ولی از نظر لیزین نابرابر هستند. H_{1A} در تراکم DNA نقش بیشتر و H_{1C} نقش کمتری دارد.

علاوه بر هیستون‌هایی که تاکنون شرح داده شد، هیستون‌های دیگری مثل H_5 و H_I از بافت‌های اختصاصی تفکیک شده‌اند. H_5 را از اریتروسیت‌های جوجه و برخی ماهی‌ها جدا کرده‌اند. این هیستون غنی از اسیدهای آمینه بازی است و شباهت زیادی به H_1 دارد امّا مقدار آرژینین آن بیشتر است و وزن مولکولی آن به حدود ۳۵ KD می‌رسد. H_5 همانند H_1 از هیستون‌هایی است که در خارج از اکتامر نوکلئوزومی و در بخش رابط بین نوکلئوزوم‌ها وجود دارد. H_I در برخی یاخته‌های خفته که تقسیم نمی‌شوند وجود دارد، توالی آن شبیه H_5 است.

غیرهیستون‌ها: بخشی از ساختمان کروماتین را پروتئین‌های غیرهیستونی تشکیل می‌دهند که خود شامل غیرهیستون‌های آنزیمی و ساختمانی هستند. غیرهیستون‌ها در سلول‌های مختلف و نیز در جانداران مختلف، تنوع زیادی دارند؛ و تاکنون حدود ۴۰۰ نوع از آنها را در سلول‌های جانداران مختلف شناسایی کرده‌اند.

مهم‌ترین غیرهیستون‌های آنزیمی شامل: RNA پلیمرازها (مسئول رونویسی انواع RNAها)، DNA پلیمرازها (مسئول همانندسازی مولکول DNA)، اگزونوکلئازها و آندونوکلئازها (برای ترمیم بخش‌های آسیب دیده DNA)، توپوایزومرها (برای شناسایی موقعیت فضایی مولکول DNA و بردن آن به حالت مناسب برای رونویسی یا همانندسازی)، هلیکازها (برای گسستن پیوندهای هیدروژنی بین دو زنجیره DNA)، لیگازها (برای اتصال قطعات کوچک DNAای یا قطعات اُکازاکی که هنگام همانندسازی تشکیل می‌شوند) هستند. پروتئین‌های غیرهیستونی در تمایزهای سلولی و تشکیل بافتها نقش اساسی و زیادی دارند.

پروتامین‌ها: در ساختمان کروماتین در هسته سلول‌های جنسی گروه ویژه‌ای از پروتئین‌ها به نام پروتامین‌ها وجود دارند که در تمایز این سلول‌ها از سلول‌های پیکری (غیرجنسی) اهمیت دارند.

RNAها: بخش دیگری از ترکیب شیمیایی کروماتین را مولکول‌های RNAای تشکیل می‌دهند که در حال رونویسی از برخی ژن‌ها هستند و چون رونویسی آنها تمام نشده است، بخشی از سر ´3 آنها هنوز به مولکول DNA چسبیده است. فراوانی همین RNA در برخی بخش‌های DNA که دارای رونویسی زیاد است منظره «درخت کریسمس» را ایجاد می‌کند.

فراساختمان کروماتین

بررسی محققانی چون کورنبرگ[1]، ویلکینز[2] و لوزاتی[3] نشان داد که کروماتین در هسته انترفازی به‌صورت رشته‌های به ضخامت حدود ده تا ۳۰ نانومتر و با واحدهای ساختمانی تکرار شونده‌ای است که هر واحد را نوکلئوزوم نامند. تعداد رشته‌های کروماتینی موجود در هسته انترفازی برابر با تعداد کروموزوم‌های گونه جاندار و برای مثال در انسان ۴۶، در مگس سرکه ۸ و در توتون ۴۸ است. رشته‌های کروماتینی در هسته انترفازی حالت در هم رفته‌ای دارند و مجموعه آنها شبکه کروماتین را به وجود می‌آورند. مضاعف شدن ماده ژنتیکی هر رشته کروماتینی در مرحله S (بخشی از مراحل قبل از تقسیم سلولی در چرخه سلولی) و به‌هم پیچیدگی و تابیدگی تدریجی رشته‌های کروماتینی موجب تشکیل تدریجی کروموزوم‌های دو کروماتیدی در پروفاز و متافاز می‌شود.

1- Korenberg 2- Wilkins 3- Lozzati

هم‌اکنون گاهی رشته‌های کروماتینی را در مقایسه با کروموزوم‌های متافازی یا کروموزوم‌های تک کروماتیدی آنافازی، کروموزوم‌های انترفازی می‌نامند زیرا در حقیقت هر رشته کروماتینی پس از همانندسازی تدریجی و پیچیدگی‌هایی که پیدا می‌کند، کوتاه و ضخیم شده به یک کروموزوم دو کروماتیدی تبدیل می‌شود.

شناخت فراساختمان کروماتین و تحولات آن در طول چرخه سلولی برای درک ساختمان کروموزوم، چگونگی تقسیم سلولی و نحوهٔ انتقال اطلاعات ژنتیکی سلولی لازم است. آگاهی‌های کنونی بیشتر بر بنای مجموعه دانش‌هایی است که به روش‌های تجربی در بین سال‌های ۱۹۶۰ تا ۱۹۷۰ به‌دست آمده است.

الف - داده‌های تجربی

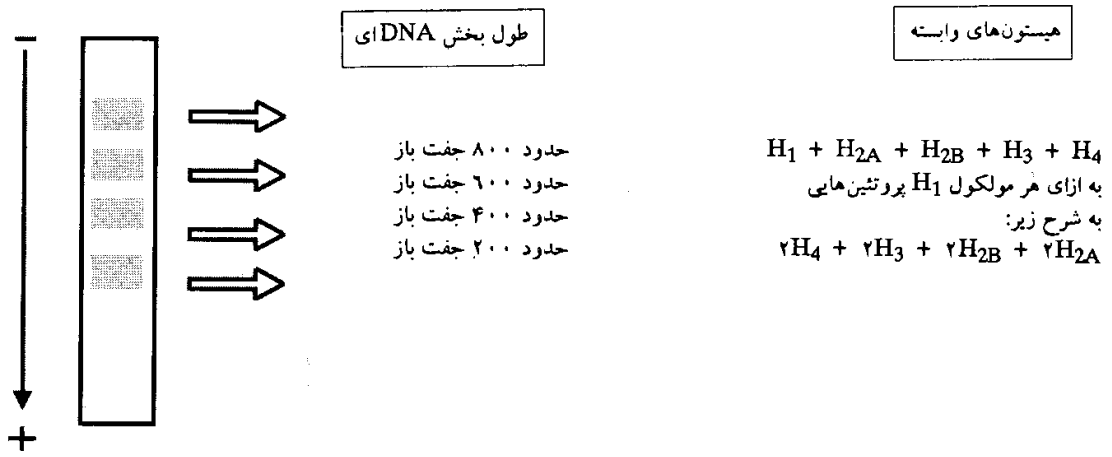
تجزیه‌های انجام شده با پراش پرتوهای X. ویلکینز و لوزاتی از ۱۹۵۹ با استفاده از پراش پرتوهای X نشان دادند که کروماتین ساختمانی تناوبی دارد که گرچه تا حد سازمان یک بلور منظم نیست اما دارای تشکل مولکولی تکراری است که حدود هر ۱۰ نانومتر یکبار تکرار شده است. همین نتیجه در شرایط «در شیشه» از افزودن هیستون‌ها به DNA ایجاد می‌شود اما با DNAی تنها چنین سازمان‌یافتگی‌های تکراری دیده نمی‌شود. بنابراین ساختمان‌های تناوبی‌از اشتراک هیستون‌ها و DNA ساخته شده است.

عمل نوکلئازها: در سال‌های دهه ۱۹۶۰، دو نوع دزوکسی ریبونوکلئاز جداسازی شدند: آندونوکلئازها که ترتیب‌های نوکلئوتیدی را روی هر دو زنجیره مولکول DNA می‌شناختند از محل‌هایی کمی دور از سر ´5 تا سر ´3 زنجیره‌ها را قطع می‌کردند. برای مثال به حالت زیر:

↓
5´T – A – T – G – A – C – G3´
5´A – T – A – C – T – G – C5´
↑

این آنزیم‌ها مولکول DNA را به قطعات کوچک پلی‌نوکلئوتیدی یعنی اولیگونوکلئوتیدها تجزیه می‌کنند. برعکس اگزونوکلئازها، مولکول DNA را به صورتی منظم از یکی از دو انتها و با جدا کردن تک‌تک نوکلئوتیدها تجزیه می‌کنند.

تجربه اول: با افزودن آندونوکلئاز (برای مثال نوکلئاز به‌دست آمده از میکروکوک) برای زمانی کوتاه بر کروماتین انجام شد. قطعات کروماتینی به‌دست آمده به وسیله سانتریفوژ با شیب غلظت جدا شدند و به این ترتیب بخش‌های زیاد و قابل تفکیکی به‌دست آمدند. برای هر بخش با استفاده از الکتروفورز، طول بخش پلی‌نوکلئوتیدی و ماهیت پروتئین‌های سازنده آن را مشخص کردند (شکل ۱۴-۱۱).

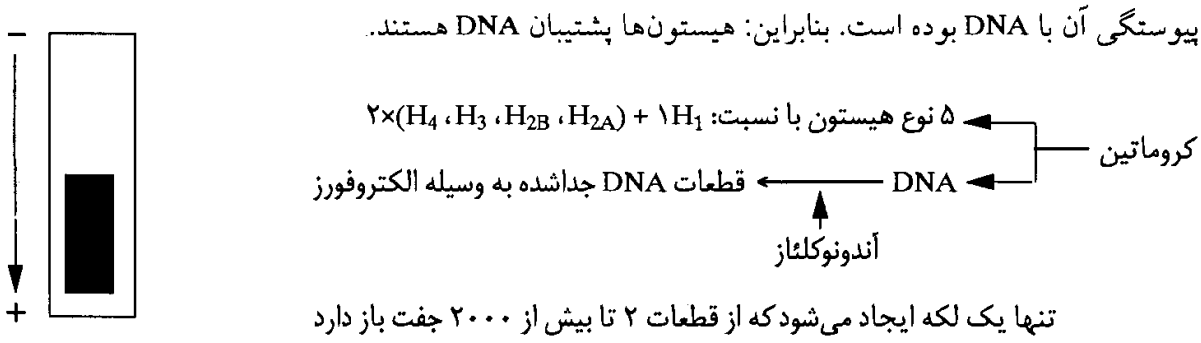


شکل ۱۴-۱۱. پراکنش قطعات کروماتینی از اثر کوتاه مدت آندونوکلئاز و ترکیب DNA و پروتئین‌های هر قطعه

با توجه به نتایج تجربه اول می‌توان در نظر گرفت که آندونوکلئاز، رشته کروماتینی را به تناوب‌های منظم ۲۰۰ جفت بازی یا ضریبی از ۲۰۰ جفت باز می‌بُرد.

تجربهٔ دوم: با اثر دادن همان نوع آندونوکلئاز بر کروماتینی انجام شد که ابتدا پروتئین‌ها و DNAی آن از هم جدا شده بود. پس از انجام الکتروفورز مشخص شد که گرچه پروتئین‌ها همان پروتئین‌های هیستونی شناخته شده در تجربه اول هستند اما قطعات DNAای به‌دست آمده اندازه‌ای متفاوت از ۲ جفت تا ۲۰۰۰ جفت باز دارند.

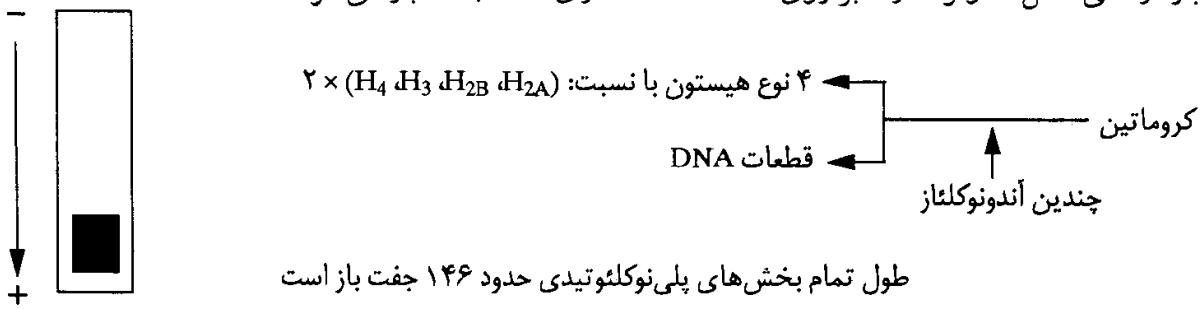
این تجربه نشان می‌دهد که آندونوکلئاز می‌تواند DNA را از نقاط بسیار نزدیک به‌هم ببرد (اگر چنین حالتی در تجربه اول ایجاد نشده و بریدن DNA در فواصل منظمی انجام شده است به دلیل وجود هیستون‌ها و اشتراک و پیوستگی آن با DNA بوده است. بنابراین: هیستون‌ها پشتیبان DNA هستند.



شکل ۱۴-۱۲. تجربه‌ای که نشان می‌دهد پشتیبانی DNA در برابر آندونوکلئاز نتیجه اشتراکش با هیستون‌ها است.

تجربه سوم: اگر به کروماتین، آندونوکلئازهای دارای محل‌های برش مختلف را برای مدت طولانی اثر دهیم تنها یک نوع قطعات کروماتینی قابل تفکیک با سانتریفوگاسیون به‌دست می‌آید. پس از جداسازی این قطعات، تیمارهای آنزیمی تکمیلی، شناسایی پروتئین‌ها و اندازه‌گیری قطعات پلی‌نوکلئوتیدی مشخص شده است که دو تیپ سازمانی در این کروماتین وجود دارد. یکی با طول DNAای معادل حدود ۲۰۰ جفت باز و وابسته به ۵ هیستون با نسبت $۱H$، $۲H_{2A}$، $۲H_{2B}$، $۲H_3$ و $۲H_4$ و دیگری با DNAای حدود ۱۴۶ جفت نوکلئوتید و وابسته به ۸ مونومر هیستونی با نسبت $۲H_{2A}$، $۲H_{2B}$، $۲H_3$ و $۲H_4$ و بدون H_1 (شکل ۱۴-۱۳).

سؤالی که مطرح می‌شود وضعیت DNA و هیستون‌ها نسبت به‌هم است و این که وابستگی آنها موجب نوعی بازدارندگی عمل آندونوکلئازها بر روی قطعات DNA دارای ۱۴۶ جفت باز می‌شود.



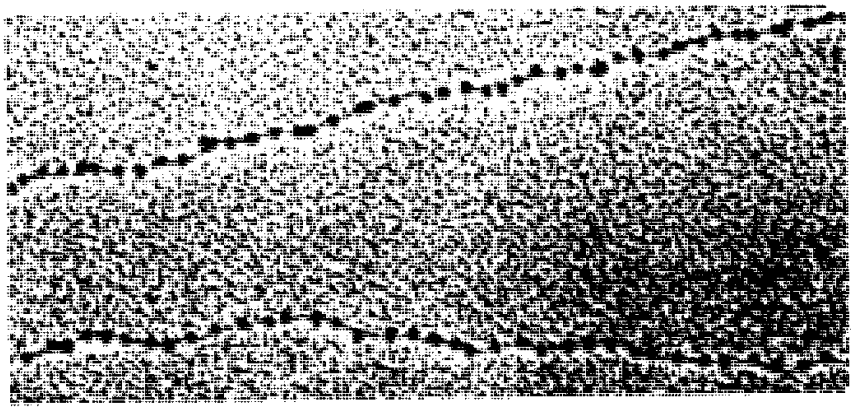
شکل ۱۴-۱۳. تیمار طولانی مدت کروماتین به وسیله مخلوطی از آندونوکلئازها و وضع قطعات به‌دست آمده

تجربه چهارم: اگر کروماتین را با دزوکسی ریبونوکلئاز I پانکراسی که تنها یکی از دو زنجیره DNAای را می‌بُرد تیمار کنیم، ۵ نوع هیستون در محیط رها می‌شوند و DNA به قطعات زیاد حدود ۱۰ نوکلئوتیدی تجزیه می‌شود. این وضع نشان می‌دهد که آندونوکلئاز می‌تواند DNA را به قطعات کوچک ببُرد مگر در نواحی که یکی از

پلی‌نوکلئوتیدها به پروتئین‌ها چسبیده باشد. بنابراین DNA به‌طور موضعی و در جایگاه‌های ویژه‌ای در برابر عمل آنزیم‌ها پشتیبانی می‌شود و نه در تمام طول مولکول.

تفکیک پروتئین‌ها: وقتی با تأثیر تدریجی آنزیم‌ها، پروتئین‌های هیستونی را به آرامی از DNA جدا کنیم نه تنها H_3 و H_4 بلکه دیمرهای $H_3.H_4$ و تترامرهای $H_3.H_4.H_3.H_4$ جدا می‌شوند. بنابراین تترامرها به راستی با مدل ساختمانی پایه‌ای مطابقت دارند. نسبت موجود بین هیستون‌ها از یک سو و وجود واقعی تترامرهای $H_3.H_4$ از سوی دیگر راهنمایی برای تصور وجود اکتامر هیستونی ($2H_{2A}$، $2H_{2B}$، $2H_3$ و $2H_4$) بوده است که DNA در اطراف آن پیچیده است.

بالاخره روش جداسازی، گسترش و سایه‌دهی کروماتین که هم‌اکنون برای مشاهده فراساختمان کروماتین و به ویژه نوکلئوتید باکتری‌ها به کارگرفته می‌شود، نشان می‌دهد که کروماتین از توالی ساختمان‌های کم‌وبیش گویچه‌ای تشکیل شده که به وسیله رشته‌ای به ضخامت ۲ نانومتر به‌هم پیوسته‌اند (شکل ۱۴-۱۴). این تصاویر «سازمان گردن‌بند مرواریدی» را که برای رشته کروماتینی به وسیله کورنبرگ پیشنهاد شده است، تأیید می‌کند.



شکل ۱۴-۱۴. کروماتین گسترده شده و سایه‌دهی شده. مشاهده با میکروسکوپ الکترونی گذاره.

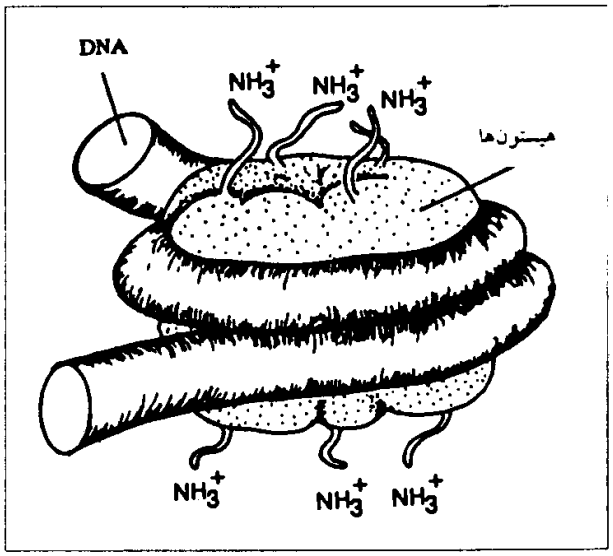
ب - سازمان نوکلئوزوم

مدل ساختمانی نوکلئوزوم که در ۱۹۷۴ به وسیله کورنبرگ پیشنهاد شد هم‌اکنون مدلی پذیرفته شده است. رشته کروماتینی به ضخامت ۱۰ نانومتر از توالی دانه‌هایی به نام نوکلئوزوم تشکیل شده است. هر نوکلئوزوم از مجموعه یک اکتامر هیستونی و بخشی از مولکول دو زنجیره‌ای DNA ساخته شده است. اکتامر هیستونی موجود در نوکلئوزوم دارای ۸ مونومر از هیستون‌های اصلی با نسبت مونومری برابر یعنی شامل ۲ مونومر از هر یک از هیستون‌های H_{2A}، H_{2B}، H_3 و H_4 می‌باشد. شکل مونومرها مکمل یکدیگر است و مونومرها با پیوندهای آب‌گریز به‌هم وابسته شده‌اند و از مجموعه آنها قلب نوکلئوزوم تشکیل شده است که به نظر می‌رسد جزء مرکزی آن تترامر $2(H_3.H_4)$ باشد. بارهای مثبت آرژینین و لیزین در سطح قرار گرفته‌اند (شکل ۱۴-۱۵)، با بارهای منفی گروه‌های فسفاتِ DNA برهم‌کنش دارند و پیوندهای الکتروستاتیکی برقرار می‌کنند. به‌علاوه بین هیستون‌های تشکیل‌دهنده قلب نوکلئوزوم با DNAای که حدود دو دور یا بهتر ۱/۷۵ تا ۱/۹ دور در اطراف اکتامر پیچیده است پیوندهای هیدروژنی و نیز اتصال فیزیکی برقرار است.

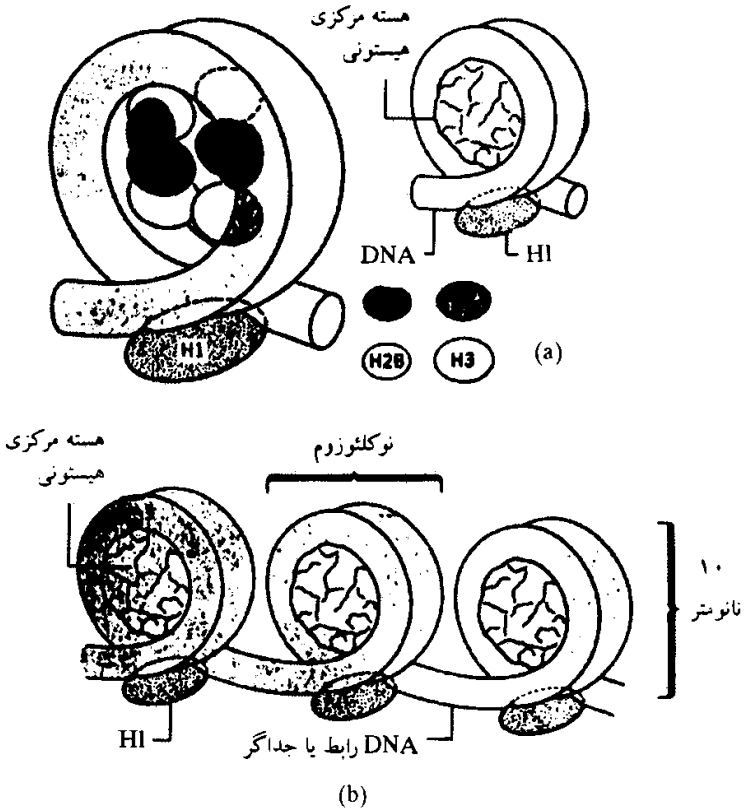
عقیده بر این است که هیستون‌های H_3 و H_4 حلقه‌های اصلی DNA را نگه می‌دارند و هیستون‌های H_{2A} و H_{2B} با ترتیب‌هایی از نوکلئوتیدهای DNA مجتمع می‌شوند که در هر کدام از دو انتهای حلقه‌ها مجتمع می‌شوند. هیستون H_1 محل‌های ورود و خروج DNA به هسته مرکزی هیستونی را می‌بندد (شکل ۱۴-۱۶).

به هر نوکلئوزوم تنها یک مولکول H_1 متصل است. هسته آب‌گریز H_1 واقعاً به اکتامر هیستونی چسبیده و N و C انتهایی آن به محل‌های جداکننده دو نوکلئوزوم مجاور متصل است.

بخشی از مولکول دو زنجیره‌ای DNA که نزدیک به دو دور (۱/۷۵ تا ۱/۹ دور) در اطراف اکتامر هیستونی پیچیده است دارای حدود ۱۴۶ جفت باز است. مجموعه اکتامر هیستونی (قلب نوکلئوزوم) و DNA متصل شده به آن را **هسته نوکلئوزومی** نامند. در حد هسته نوکلئوزومی و با واسطه پیوندهای مختلفی که شرح داده شد، DNA به‌صورت فشرده‌ای با هیستون پیوند شده و به سختی آنزیم‌ها را به خود می‌پذیرد.



شکل ۱۴-۱۵. نمایی از ساختمان هستهٔ یک نوکلئوزوم (گرفته شده از Grunsten، ۱۹۹۲)



شکل ۱۴-۱۶. a) نمایی از ساختمان نوکلئوزوم. بخشی از مولکول DNA که دارای حدود ۱۴۰ تا ۱۴۶ جفت نوکلئوتید است نزدیک به دو دور (۱/۷۵ تا ۱/۹ دور) در اطراف اکتامر هیستونی به نام قلب نوکلئوزوم[1] یا هسته مرکزی آن پیچیده است. H_1 در محل ورود و خروج DNA بر روی نوکلئوزوم دیده می‌شود. b) نوکلئوزوم‌های متوالی به وسیله بخشی از DNA که آن را DNA رابط یا جداگر نامند و به‌طور معمول دارای ۶۰ جفت نوکلئوتید است به یکدیگر متصل هستند.

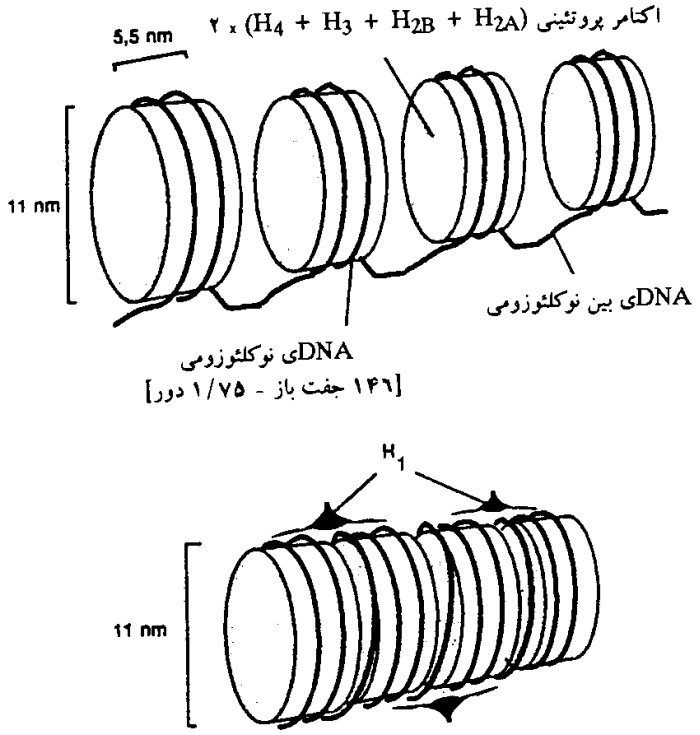
به‌طور معمول نوکلئوزوم‌ها را به‌صورت استوانه‌هایی نسبتاً کوتاه در نظر می‌گیرند که قطر یا عرض آنها حدود یازده نانومتر و ضخامت هر کدام ۵ تا ۶ نانومتر است (شکل ۱۴-۱۷).

بین دو هسته نوکلئوزومی مجاور، بخشی از مولکول DNA که نسبت به نوکلئازها بسیار حساس است، قرار گرفته و خط بین نوکلئوزومی را می‌سازد. طول این DNA رابط یا جداگر[2]، متغیر و به‌طور متوسط دارای ۶۰ جفت نوکلئوتید است. آندونوکلئازها در حدّ همین DNA رابط عمل می‌کنند و موجب جدا شدن قطعات ۲۰۰ جفت

1- nucleosome core particle
2- Linker or Spacer DNA

نوکلئوتیدی کروماتین می‌شوند.

اکتامر هیستونی (قلب نوکلئوزوم) و DNA متصل شده به آن (DNA نوکلئوزومی) با هم،هسته نوکلئوزومی را می‌سازند و مجموعه هسته نوکلئوزومی با DNA رابط بین دو نوکلئوزوم و H_1 واحدی را به وجود می‌آورند که آن را مونونوکلئوزوم یا کروماتوزوم نامند. در یک کروماتوزوم کامل محل‌های ورود و خروج DNA به هسته مرکزی نزدیک یکدیگر قرار گرفته ، H_1 همانند قفلی این محل‌ها را می‌گیرد و ارتباط فشرده‌ای را با هسته نوکلئوزومی برقرار می‌کند. اگر H_1 را با اثر پروتئازهای اختصاصی هضم و استخراج کنیم نوکلئوزوم‌ها از یکدیگر فاصله می‌گیرند (ساختمان مجازی رشته کروماتینی که در بررسی‌های اولیه به وسیله کورنبرگ مطرح شده بود).



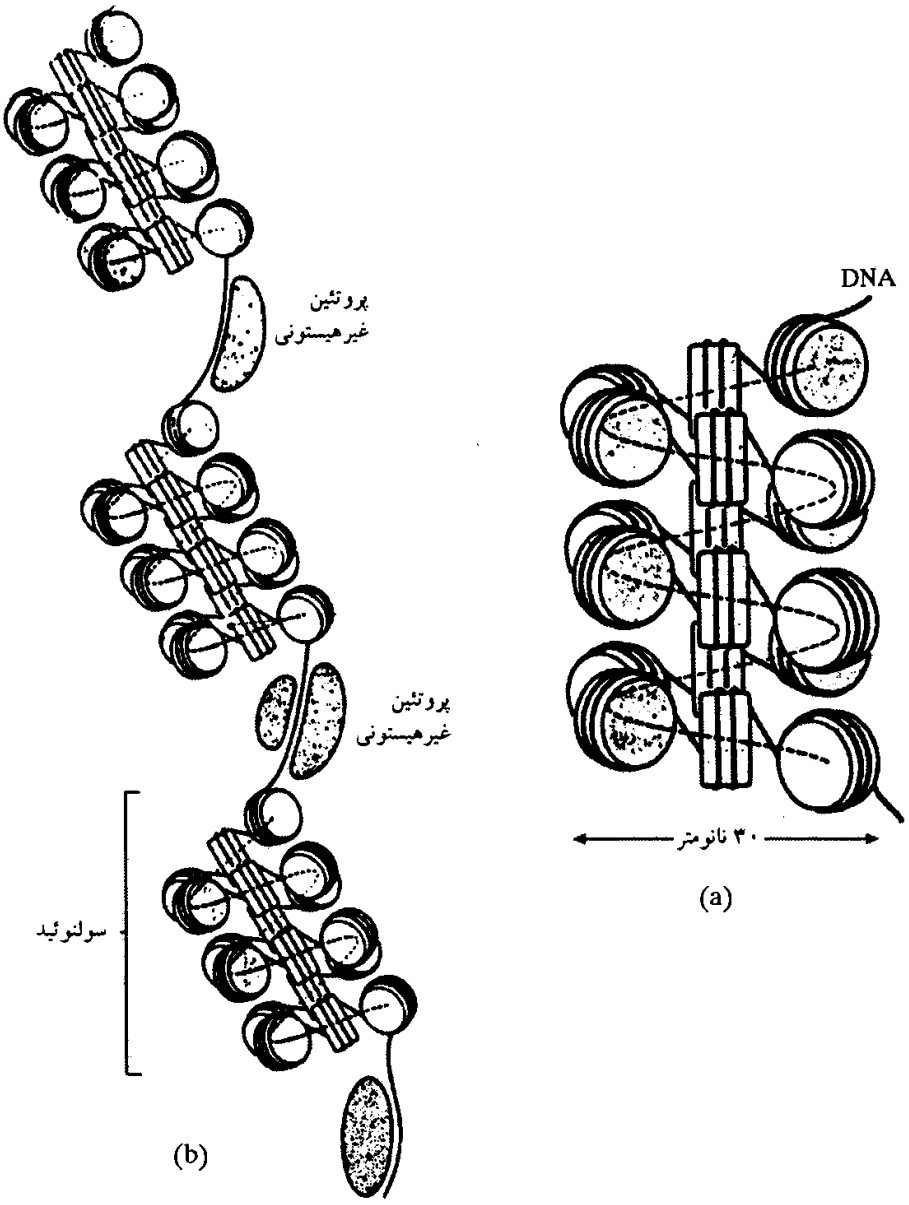
شکل ۱۴-۱۷. رشته نوکلئوزومی باز شده (شکل بالا) و فشرده به‌هم (شکل پایین)

تعداد نوکلئوزوم‌ها در رشته کروماتینی بافت‌های مختلف یکسان نیست ولی تعداد جفت نوکلئوتیدهای موجود در قطعه DNAی وابسته به اکتامر هیستونی در سلول‌های مختلف یکسان است. طول DNA رابط یا جداگر نیز در گونه‌های مختلف و حتی در بافت‌های مختلف یک گونه تفاوت‌هایی دارد. ممکن است اصلاً وجود نداشته باشد (برای مثال در سلول‌های مخمر که تعداد نوکلئوزوم‌ها زیاد است) و یا طولی تا ۸۰ جفت نوکلئوتید داشته باشد (سلول‌های سپرم توتیای دریایی). اهمیت این گوناگونی هنوز به خوبی مشخص نیست.

وجود H_1 برای تشکیل نوکلئوزوم‌ها الزامی نیست، برای مثال در مخمر نان که تعداد نوکلئوزوم‌ها زیاد است H_1 وجود ندارد. به نظر می‌رسد که H_1 بیشتر برای پایداری ساختمان نوکلئوزوم‌ها لازم است تا تشکیل آنها. همچنین وجود H_1 و نوع آن در پیچیدگی‌های رشته کروماتینی و تشکیل رشته ۳۰ نانومتری اهمیت دارد.

مشاهدات انجام شده با میکروسکوپ الکترونی وجود دو نوع رشتهٔ کروماتینی در هستهٔ انترفازی را نشان داده است یکی رشته‌های با ضخامت ۱۰ یا حدود ۱۱ نانومتر (نوکلئوفیلامان ۱۱ نانومتری) که از ترتیب خطی نوکلئوزوم‌ها تشکیل شده‌اند و دیگری رشته‌های ۳۰ نانومتری که از به‌هم پیچیدگی و تابیدگی رشته‌های ۱۰ نانومتری به وجود آمده‌اند (شکل ۱۴-۱۸). مدل‌های زیادی برای توضیح چگونگی تشکیل رشته‌های ۳۰ نانومتری از رشته‌های ۱۰ نانومتری پیشنهاد شده است. مدلی که هم‌اکنون بیشتر مورد توافق به نظر می‌رسد و با داده‌های تجربی سازگاری بیشتری دارد مدل سولنوئیدی[1] است (شکل ۱۴-۱۸). در این مدل رشته نوکلئوزومی به‌صورت مارپیچی فشرده پیچیدگی پیدا می‌کند و در هر دور آن ۶ تا ۷ نوکلئوزوم قرار می‌گیرد. پیچش‌های پی‌درپی، ساختاری نسبتاً متراکم را به وجود می‌آورد که آن را سولنوئید نامند (شکل ۱۴-۱۸).

1- Solenoide



شکل ۱۴-۱۸. a) مدل سولنوئیدی برای بخشی از یک رشته کروماتینی نوکلئوزومی. هر دور سولنوئید دارای شش نوکلئوزوم است (به متن مراجعه شود). b) بین واحدهای سولنوئیدی بخش‌های بدون نوکلئوزوم با پروتئین‌های کروماتینی غیرهیستونی همراه می‌باشد.

حالت ساختاری خطی یا سولنوئیدی نوکلئوزوم‌ها در رشته کروماتینی استخراج شده از سلول، به توان و غلظت یونی محیط وابسته است. در تراکم و توان یونی کم، نوکلئوزوم‌ها آرایش خطی دارند و برعکس در تراکم و توان یونی زیاد، حالت سولنوئید به خود می‌گیرند. این تغییرات بر میزان فعالیت و امکان رونویسی یا همانندسازی رشته‌های کروماتینی اثر دارد.

برای ایجاد حالت سولنوئیدی رشتهٔ کروماتینی، H_1 نقش مهمی دارد و وجودش الزامی است اما هنوز چگونگی عمل آن به خوبی روشن نیست. تصور می‌شود که H_1 محل مرکزی سولنوئید را اشغال می‌کند و سرهای پایانی N، دُم‌های هیستون‌های H_3 و H_4 نیز در ایجاد حالت سولنوئید دخالت دارند. استیلاسیون این پروتئین‌ها (تثبیت یک گروه استیل روی اسیدهای امینه بازی) سازمان رشته ۳۰ نانومتری را در هم می‌ریزد. پدیده‌های استیلاسیون و دِاستیلاسیون نقش بسیار مهمی را در چگونگی رونویسی، بروز ژن‌ها و همانندسازی DNA بازی می‌کنند.

در بین بخش‌های سولنوئیدی با ضخامت ۳۰ نانومتر بخش‌هایی از DNA پوشیده شده از پروتئین‌های غیرهیستونی وجود دارد که فاقد نوکلئوزوم است (شکل ۱۴-۱۸ b). این بخش‌ها نسبت به نوکلئازها و به ویژه

DNAaseI بسیار حساسند[1] و به احتمال نقش مهمی را در تنظیم فعالیت‌های کروماتین و بروز ژن‌ها عهده‌دار هستند، برخی داده‌های تجربی مؤید این نظر است. در رتیکولوسیت‌های پرندگان ژن‌های بیوسنتز زنجیره‌های گلوبین بروز می‌کنند ولی ژن‌های بیوسنتز او آلبومین خاموش هستند. برعکس در سلول‌های اویدوکت ژن‌های زنجیره‌های گلوبین خاموش و ژن‌های بیوسنتز او آلبومین بروز می‌کنند. اگر این سلول‌ها را با غلظت پایین DNAaseI تیمار کنیم مشاهده می‌شود که در رتیکولوسیت‌ها ژن‌های مربوط به زنجیره گلوبین به سرعت از بین می‌روند ولی ژن‌های او آلبومین باقی می‌مانند و برعکس در سلول‌های اویدوکت ژن‌های او آلبومین از بین می‌روند و ژن‌های زنجیره‌های گلوبین باقی می‌مانند. بنابراین در هر یک از این سلول‌ها نواحی بسیار حساس نسبت به نوکلئاز که بخش‌های فاقد نوکلئوزوم است به احتمال با ژن (ژن‌های) فعال در آن سلول تطبیق دارند. باید در نظر داشت که رشته با ضخامت ۳۰ نانومتر هنوز می‌تواند به حالت کروماتین دارای فعالیت رونویسی (یوکروماتین) باشد. پروتئین‌های غیرهیستونی که در بخش‌های DNA فاقد ساختمان‌های نوکلئوزومی دیده می‌شوند به احتمال در هدایت آنزیم‌های مسئول رونویسی یا همانندسازی برای اتصال به بخش‌های موردنظر DNAای نقش دارند.

برای کروماتین دو حالت در نظر می‌گیرند:

۱- ***یوکروماتین***[2]: بخش‌های کروماتینی است که پیچیدگی‌های آن کم است (به‌طور معمول تا حد رشته ۳۰ نانومتری) تراکم نوکلئوزوم‌ها در آن خیلی زیاد نیست. در مشاهدات میکروسکوپی رنگ روشنی دارد. ژن‌های سازنده آن دارای امکان رونویسی و بنابراین بروز هستند و به عبارت دیگر با بروز ژن‌ها در فعالیت‌های زیستی به ویژه فعالیت‌های متابولیکی سلول شرکت فعال دارد. در بخش‌های یوکروماتینی مقدار پروتئین‌های غیرهیستونی زیاد است و با فراوانی این پروتئین‌ها و برهم‌کنشی که با هیستون‌ها دارند، پیوندهای الکتروستاتیکی بین DNA و پروتئین‌های هیستونی، کاهش یافته به اصطلاح DNA به‌طور نسبی از هیستون‌ها رها می‌شود و آنزیم‌های رونویسی یا همانندسازی می‌توانند بر آن اثر کنند.

۲- ***هتروکروماتین***[3]: بخش‌های کروماتینی است که پیچیدگی‌ها و تراکم زیادی دارد. در مشاهدات میکروسکوپی تیره‌تر از بخش‌های یوکروماتینی است ژن‌های سازندهٔ آن رونویسی نمی‌شوند و بنابراین بروز نمی‌کنند. به عبارت دیگر بخش‌های هتروکروماتینی در فعالیت‌های متابولیکی سلول وارد نمی‌شوند هتروکروماتین به دو صورت در سلول وجود دارد. هتروکروماتین ساختمانی یا پایدار[4]: بخش‌های به شدت هتروکروماتینی است. که در طول نسل‌های سلولی (جز هنگام همانندسازی) به حالت هتروکروماتینی باقی می‌ماند و ژن‌های آن بروز ندارند. ژن‌های بسیاری از صفات اجدادی که در گونه‌های کنونی دیده نمی‌شوند به احتمال در بخش‌های هتروکروماتینی پایدار قرار دارند.

هتروکروماتین ناپایدار (هتروکروماتین اختیاری)[5]: بخش‌های هتروکروماتینی است که به حسب شرایط حاکم بر سلول به‌صورت یوکروماتین در می‌آید و ژن‌هایش رونویسی شده، بروز می‌کنند. ژن‌های بسیاری از ویژگی‌هایی که در طول حیات یک جاندار به‌تدریج در سن مشخصی بروز می‌کنند در نواحی هتروکروماتینی ناپایدار قرار دارند و به‌طور برنامه‌ریزی شده و نیز تحت تأثیر شرایط محیط به حالت فعال در می‌آیند.

1- DNAase - Hypersensitive Sites 2- Euchromatine 3- Heterochromatine
4- H. Constutitive 5- H. Facultative

کروموزوم‌ها[1]

واژه کروموزوم به مفهوم جسم رنگی در سال ۱۸۸۸ به وسیله والدیر[2] به کارگرفته شد. هم‌اکنون این واژه برای نامیدن رشته‌های رنگ‌پذیر و قابل مشاهده با میکروسکوپ‌های نوری به کار می‌رود که از همانندسازی و نیز به‌هم پیچیدگی و تابیدگی هر رشته کروماتینی انترفازی در سلول‌های یوکاریوتی تا رسیدن به ضخامت ۱۰۰۰ تا ۱۴۰۰ نانومتر، ایجاد می‌شود. در پروکاریوت‌ها نیز ماده ژنتیکی اغلب به حالت یک کروموزوم متراکم می‌شود. در برخی باکتری‌ها علاوه بر کروموزوم اصلی که اغلب ژن‌ها را شامل می‌شود، کروموزوم کوچک دیگری که به‌طور معمول آن را پلاسمید[3] می‌نامند، قابل تشخیص است. گرچه تعداد کمی از ژن‌ها بر روی پلاسمید قرار دارند اما از آنجا که در بیشتر موارد ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی آن جایگزین شده‌اند، از نظر پایداری و بقای نسل باکتری اهمیت زیادی دارد.

شکل، اندازه و تعداد کروموزوم‌ها در گونه‌های مختلف، متفاوت است. مجموعه ویژگی‌های شاخص کروموزوم‌های هر گونه را تیپ کروموزومی یا کاریوتیپ[4] نامند.

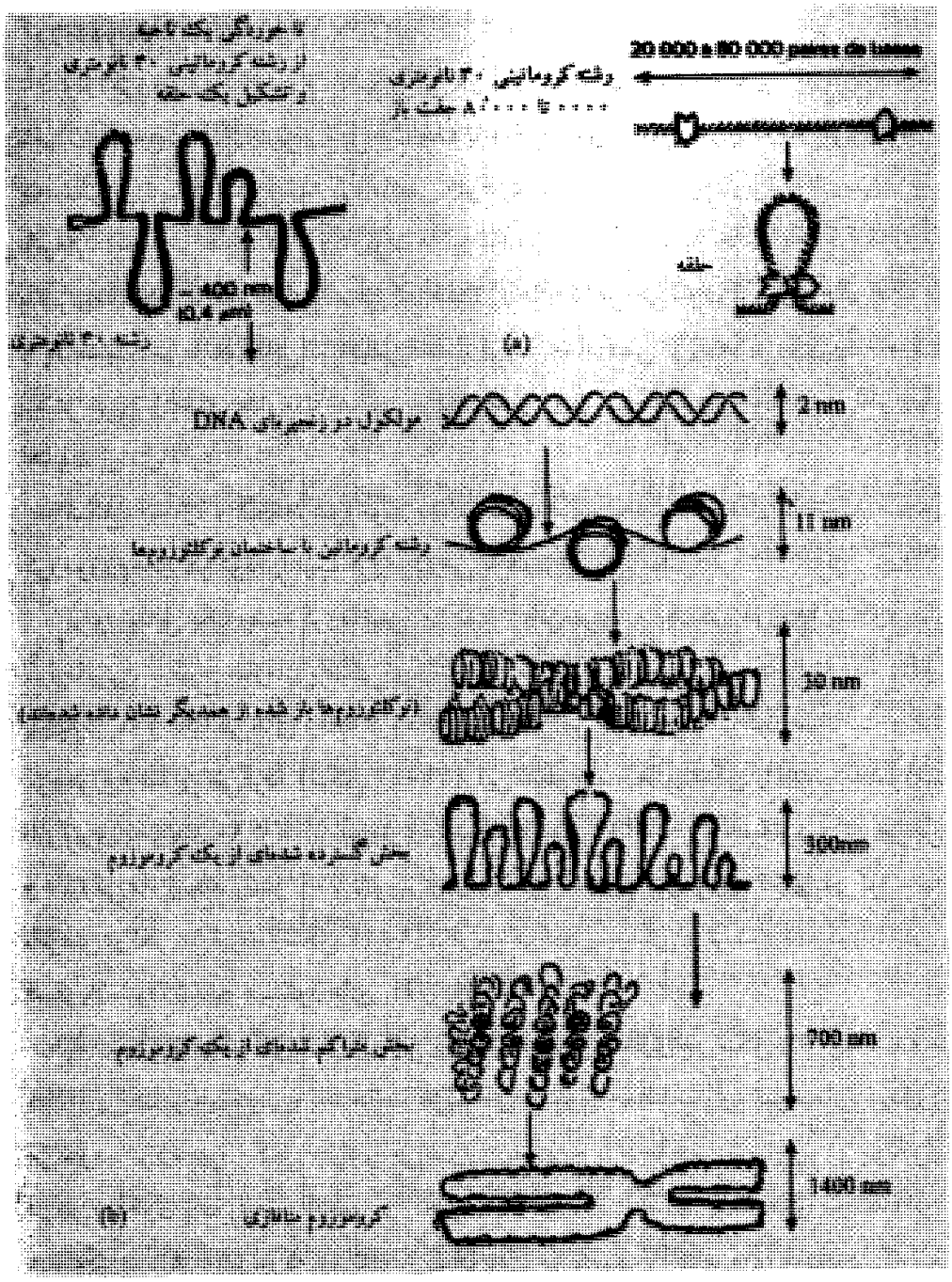
برای تبدیل یک رشته کروماتینی ۱۰ تا ۳۰ نانومتری به یک کروموزوم، علاوه بر لزوم همانندسازی رشته کروماتینی، سطوح سازمان یافتگی‌ای را در نظر می‌گیرند که ضمن آن با دخالت H_1، H_3 و پروتئین‌های غیرهیستونی پیچیدگی‌ها و تابیدگی‌های رشته کروماتینی افزایش می‌یابد، طول آن کم، ضخامت و تراکمش زیاد می‌شود و به کروموزوم تبدیل می‌گردد (شکل ۱۴-۱۹). این سطوح سازمان‌یافتگی را اغلب به‌صورت رسیدن از رشته ۱۰ تا ۳۰ نانومتری به رشته ۹۰ تا ۱۰۰ نانومتری، تشکیل رشته ۳۰۰ تا ۴۰۰ نانومتری و در مراحل بعد با افزایش پیچیدگی‌ها و تابیدگی‌ها، ایجاد رشته ۷۰۰ نانومتری و بالاخره تشکیل کروموزوم دارای دو کروماتید و با ضخامت تا ۱۴۰۰ نانومتر در نظر می‌گیرند (شکل ۱۴-۱۹). اولین مرحله پیچیدگی و تراکم رشته کروماتینی برای تبدیل به کروموزوم با فسفریلاسیون شدید هیستون‌های H_1 و H_3 همراه است.

تجسمی از چگونگی سازمان‌یابی یک کروموزوم متافازی در شکل ۱۴-۲۰ دیده می‌شود. پس از رها شدن DNA از اکتامر هیستونی، با دخالت آنزیم‌های مسئول همانندسازی، پیوندهای هیدروژنی بین دو زنجیره گسسته می‌شود، هر زنجیره مکمل خود را می‌سازد و به‌تدریج با ادامهٔ همانندسازی، دو مولکول DNA به وجود می‌آید که در هر مولکول یک زنجیره قدیمی و زنجیره دیگر نوساخت است. بخش‌های مختلف این دو مولکول DNA که نظیر همدیگر هستند به‌تدریج که همانندسازیشان پایان می‌پذیرد، با اکتامرهای هیستونی که نیمی از آنها اکتامرهای والدی و نیمی جدید هستند، به ساختمان نوکلئوزومی و تشکیل رشته (نوکلئوفیلامان) کروماتینی برمی‌گردند و به این ترتیب دو رشته کروماتینی ۱۰ نانومتری (رشته‌های نوع A) و سپس رشته‌های ۳۰ نانومتری (رشته‌های کروماتینی نوع B) ایجاد می‌شوند. هر رشته کروماتینی ۳۰ نانومتری سطوح سازمان‌یافتگی را که در صفحات قبل به آن اشاره شد، می‌گذارند، با مجموعه‌ای از پروتئین‌های غیرهیستونی زمینه‌ای یا اسکلتی آمیخته می‌شود و به یک کروماتید، تبدیل می‌شود. مجموع دو کروماتید نظیر هم که از محل سانترومر (به‌هم متصلند، کروموزوم متافازی ایجاد می‌شود.

اجزای ساختمانی کروموزوم

در متافاز که کروموزوم‌ها سازمان‌یافتگی بیشتری دارند، برای هر کروموزوم بخش‌های زیر در نظر گرفته می‌شود:

1- Chromosomes 2- Waldeyer 3- Plasmide 4- Karyotype



شکل ۱۴-۱۹. نمایی از یک بخش کروماتیدی یک کروموزوم و حلقه‌های تشکیل‌دهنده آن a) نمای مراحل مختلف سازمان یافتگی یک کروموزوم. b) تجسمی از چگونگی تاخوردگی رشته کروماتینی ۳۰ نانومتری و تشکیل حلقه‌های موجود در هر کروموزوم

۱-*کروماتیدها*[1]: هر کروماتید بخشی از کروموزوم متافازی است که نیمی از سراسر طول کروموزوم را می‌سازد. دو کروماتید هر کروموزوم از ناحیه سانترومر به‌هم متصلند. هر کروماتید از اَبَر پیچیدگی‌های[2] رشته کروماتینی و آمیختگی آن با پروتئین‌های غیرهیستونی اسکلتی یا زمینه‌ای به وجود آمده است.

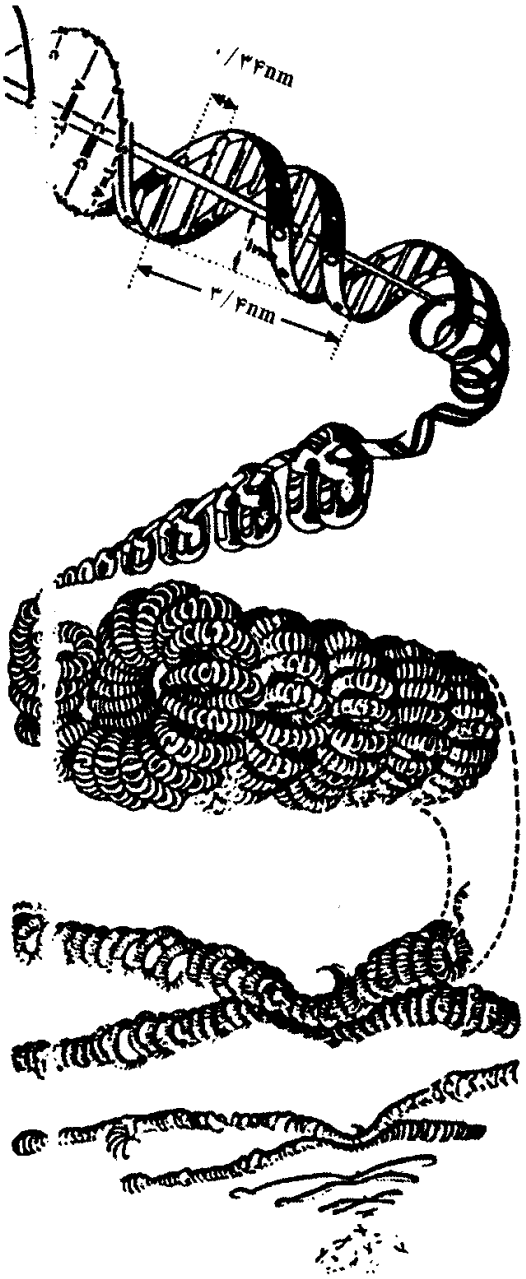
دو کروماتید هر کروموزوم متافازی را که در حکم تصویر آئینه‌ای یکدیگر هستند، کروماتیدهای خواهر یا کروماتیدهای نظیر می‌نامند. در پروفاز و گاهی در انترفاز، کروموزوم به‌صورت رشته‌های بسیار نازکی است که آنها را کروموناما[3] یا کروموناماتا[4] نامند. این رشته‌ها مراحل مقدماتی تراکم کروماتید را نشان می‌دهند. کروماتید و کروموناما، نامی برای مشخص کردن دو ساختمان یکسان اما با دو درجه سازمان‌یافتگی است.

کرومومرها: از تجمع ماده کروماتینی به‌صورت دانه‌های کروی، کرومومرها ایجاد می‌شوند که گاهی در طول

1- Chromatide 2- Supercoiling 3- Chromononema 4- Chromononemata

کرومونما قابل تشخیص هستند. کرومومرها تنها در کروموزوم‌های پلی‌تن[1] به خوبی قابل مشاهده‌اند. در این کروموزوم‌ها، کرومومرها در کنار هم ردیف می‌شوند و نوارهای (باندهای) کروموزومی را به وجود می‌آورند. این نواحی دارای چین‌خوردگی‌های فشرده و متراکمی از کرومونما می‌باشند و آنها را در حکم واحدهای عمل‌کننده ژنتیکیِ کروموزوم‌ها در نظر می‌گیرند. در متافاز که کروماتیدهای کروموزوم فشردگی زیادی دارند، کرومرها قابل تشخیص نیستند.

۲- ***سانترومر:*** محل اتصال دو کروماتید خواهر هر کروموزوم متافازی را سانترومر نامند. سانترومر بخش نازکی از کروموزوم است که جایگاه آن را فرورفتگی (فشردگی) اولیه[2] نیز می‌نامند. ناحیه سانترومر بسیار هتروکروماتینی است و به ویژه در بخش‌های کناری خود دارای ژن‌ها یا ترتیب‌های نوکلئوتیدی تکراری است. این بخش‌های هتروکروماتینی با رنگ‌های بازی بشدت رنگ می‌گیرند. در مورد وضع سانترومر نظریه‌های مختلفی مطرح است. نظری که بیشتر مورد تأیید بوده است این است که چون سانترومر هتروکروماتینی است همانندسازی آن با تأخیر انجام می‌شود و در اوایل آنافاز که همانندسازی آن پایان می‌یابد دو کروماتید خواهر از هم جدا می‌شوند. نظریه دیگر آن است که همانندسازی ماده ژنتیکی ناحیه سانترومر در مرحله S از چرخه سلولی انجام می‌شود اما بخش‌های همانندسازی شده در هم رفته باقی می‌مانند و توپوایزومرازها بازوها را در اواخر متافاز می‌بُرند و در نتیجه دو کروماتید از هم جدا می‌شوند.



شکل ۱۴-۲۰. نمایی از چگونگی سازمان‌یابی یک کروموزوم متافازی

هر کروموزوم علاوه‌بر سانترومر اصلی، ممکن است دارای سانترومر یا سانترومرهای فرعی در محل فشردگی‌های ثانویه[3] باشد. فشردگی‌های ثانویه با داشتن پیچیدگی‌های کمتر از فشردگی اولیه قابل تشخیصند.

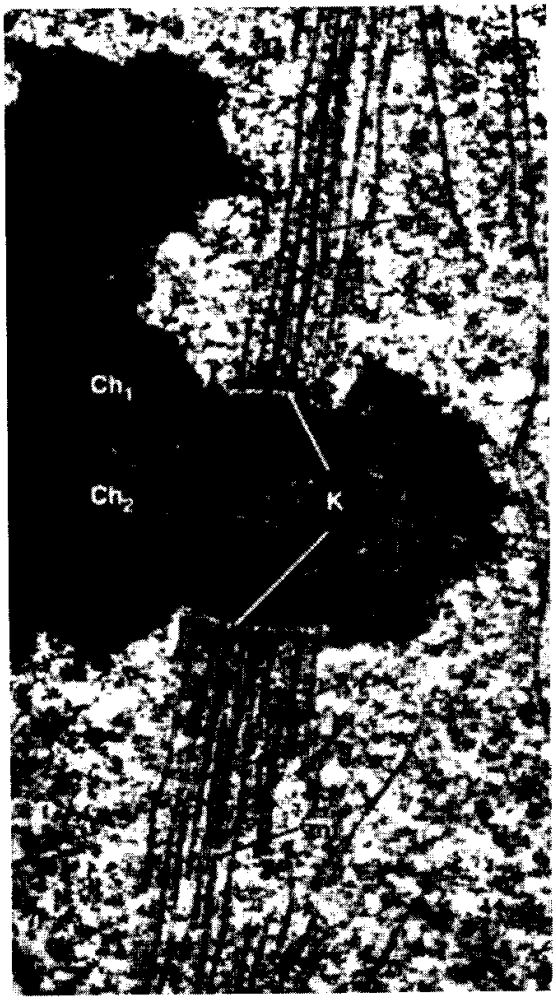
کروموزوم‌ها را به حسب تعداد سانترومر و نیز محل قرارگرفتن آن به انواع مختلفی تقسیم‌بندی می‌کنند.

۳- ***کینه‌توکور (سینه‌توکور[4])***: طرفین سانترومر کروموزوم را دو بخش پروتئینی پیاله مانند و متراکم به اسم کینه‌توکور می‌پوشاند. هر کینه‌توکور دارای سه بخش بیرونی، میانی و درونی است. در ساختمان هر بخش پروتئین‌های

1- Polytene 2- Primery Constriction 3- Secondary Constriction
4- Kinetochore

رشته‌ای با تراکم متفاوتی قابل تشخیص هستند. بخش بیرونی متراکم و بخش میانی کم‌تراکم است. بخش درونی به‌طور فشرده‌ای با سانترومر اتصال دارد. در بخش درونی علاوه‌بر رشته‌های پروتئینی، رشته‌های عرضی نیز وجود دارند که نسبت به پروتئازها مقاوم اما با DNAaseها تخریب می‌شوند. تصور می‌شود این رشته‌ها دنباله‌هایی از DNAی کروماتید مجاور هستند که به کینه‌توکور نفوذ کرده‌اند. به بخش بیرونی هر کینه‌توکور، رشته‌های دوکی کروموزومی یا رشته‌های دوکی کینه‌توکوری متصل می‌شود (شکل ۱۴-۲۱). این رشته‌ها کروموزوم را به قطب سلول اتصال می‌دهند و در کشیده شدن کروماتیدها یا بهتر کروموزوم‌های تک کروماتیدی در آنافاز به سوی قطبین نقش اساسی دارند. به بخش خارجی هر کینه‌توکور حدود ۴ تا ۴۰ رشته دوکی کینه‌توکوری متصل می‌شود (شکل ۱۴-۲۱).

کینه‌توکورها از مراکز سازماندهی میکروتوبول‌ها و رشته‌های دوک میتوزی هستند. وقتی کروموزوم‌های متافازی جداشده از سلول را در محلولی از توبولین در تامپونی مناسب قرار دهیم، میکروتوبول‌ها، چسبیده به کینه‌توکورِ همه کروموزوم‌ها دیده می‌شوند.



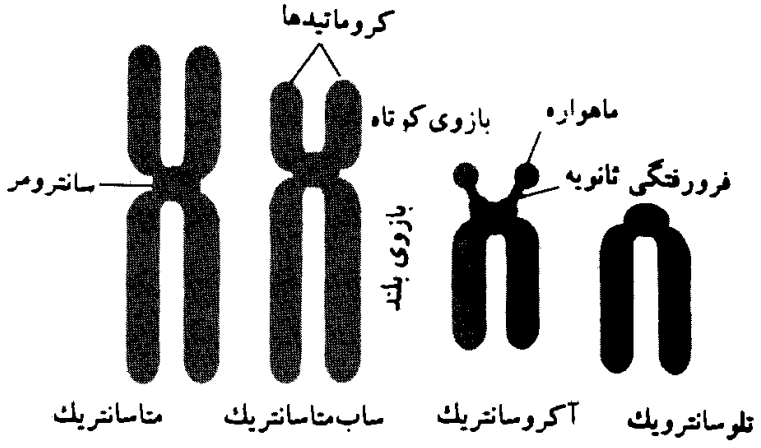
شکل ۱۴-۲۱. میکروتوبول‌ها و کینه‌توکورها در یک جلبک. سلول در متافاز است. دو کروماتید Ch_1 و Ch_2 به وسیله سانترومر به‌هم چسبیده‌اند. در دو طرف سانترومر، کینه‌توکورها به خوبی دیده می‌شوند. رشته‌های دوکی‌کینه‌توکوری mt نیز به راحتی تشخیص داده می‌شوند (درشت‌نمایی ۳۱۰۰۰ برابر) (گرفته شده از SCHIBLER و همکاران، ۱۹۸۷).

۴- ***تلومر***[1]: این اصطلاح برای بخش‌های انتهایی کروماتید به کار گرفته می‌شود. تلومرها دارای ویژگی‌های سلول‌شناسی خاصی هستند. در مگس سرکه ترتیب‌های DNAای تلومری که در انتهایِ همهٔ کروموزوم‌ها وجود دارد، جداسازی و بررسی شده است. تلومرها دارای انتهاهای مولکول‌های طویل و خطی DNAای هستند که در هر کروماتید وجود دارد. از سوی دیگر وقتی کروموزوم‌ها به وسیله عواملی مثل پرتوهای X یا اثر الکالوئیدها شکسته شوند، انتهاهای آزاد بدون تلومر آنها «چسبنده» می‌شود و با سایر کروموزوم‌ها ادغام می‌شود اما نه با ناحیه تلومری اصلی (طبیعی). علاوه‌بر نقشی که تلومرها در پایداری کروموزوم‌ها دارند، در برخی گونه‌ها به حالت میانجی بین دو کروموزوم عمل کرده و نوک به نوک اتصال موقتی پیدا می‌کنند.

۵- ***فرورفتگی ثانویه***: یکی دیگر از ویژگی‌های ریخت‌شناسی کروموزوم‌ها هستند که از نظر موقعیت و فواصلشان به حسب گونه‌ها جای ثابتی دارند. وجود آنها از نظر تشخیص کروموزوم‌ها به ویژه در یک مجموعه کروموزومی مفید است.

1- Telomere

فرورفتگی‌های ثانویه به دلیل عدم ایجاد انحراف‌های زاویه‌دار در قطعات کروموزومی از فرورفتگی‌های اولیه شناخته می‌شوند.



شکل ۱۴-۲۲. انواع کروموزوم‌ها برحسب محل سانترومر آنها

۶- ***سازمان‌دهندگان هسته‌ای***[1]: این نواحی فرورفتگی‌های ثانویه‌ای هستند که دارای ژن‌های رمزدارکننده RNAهای ریبوزومی جزء rRNA۵s می‌باشند و در تشکیل هسته‌ک دخالت دارند. پدیدار شدن فرورفتگی ثانویه به دلیل رونویسی بسیار فعال ژن‌های rRNAای است که آنها را از فرورفتگی‌های اولیه مشخص می‌سازد. در انسان سازمان‌دهندگان هسته‌ک در فرورفتگی‌های ثانویه کروموزوم‌های ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۲۱، ۲۲ قرار دارند که همه از کروموزوم‌های آکروسانترویک و دارای ماهواره هستند.

۷- ***ماهواره***[2]: ماهواره یکی دیگر از ویژگی‌های ریخت‌شناسی موجود در برخی کروموزوم‌ها است. این بخش جسم کوچک کروی است که از بقیه کروموزوم به وسیله یک فرورفتگی ثانویه جدا می‌شود (شکل ۱۴-۲۲). ماهوراه و فرورفتگی ثانویه از نظر شکل و بزرگی برای هر کروموزوم ویژه، ثابت هستند. ماهواره‌های کروموزومی بخش‌هایی از کروموزوم از دیدگاه ریخت‌شناسی هستند و نبایستی آنها را با ماهواره‌های DNAای که دارای ترتیب های DNAای بسیار تکراری می‌باشند، اشتباه کرد.

انواع کروموزوم‌ها از نظر تعداد سانترومر: کروموزوم‌ها را از نظر تعداد سانترومرهایشان به کروموزوم‌های یک سانترومری[3]، دو سانترومری[4] و چندسانترومری[5] تقسیم می‌کنند.

وقتی تحت تأثیر عواملی مثل پرتوهای X کروموزوم‌ها خرد شوند و قطعاتشان ادغام شود، کروموزوم‌های به اصطلاح بدون سانترومر[6] ایجاد می‌کنند. این کروموزوم‌ها هنگام تقسیم سلولی رفتار عادی مثل سایر کروموزوم‌ها را ندارند.

انواع کروموزم‌ها از نظر محل سانترومر: از نظر محل سانترومر اصلی، کروموزوم‌ها را به‌صورت زیر تقسیم‌بندی می‌کنند: (شکل ۱۴-۲۲)

۱- ***کروموزوم‌های تلوسانتریک***[7]: سانترومر آنها در یکی از دو انتهای کروموزوم‌ها قرار گرفته است.

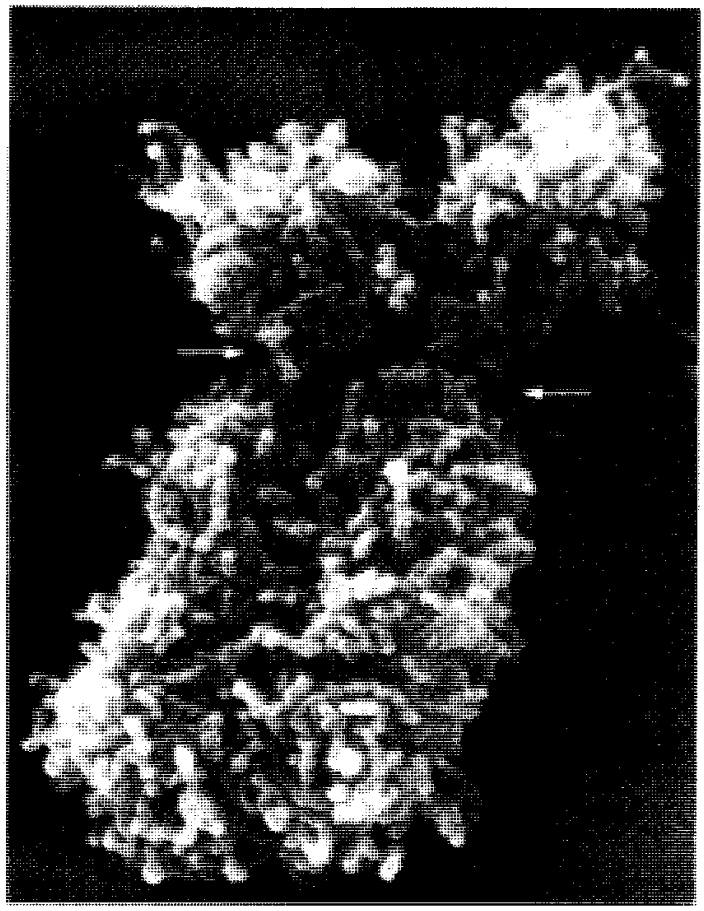
۲- ***کروموزم‌های آکروسانتریک***[8]: سانترومر آنها نزدیک به یکی از دو انتهای کروموزوم قرار گرفته در نتیجه یکی از بازوها نسبت به دیگری بسیار کوچک است (قطعات کروموزومی از محل قرار گرفتن سانترومر را بازوهای کروموزومی می‌نامند).

۳- ***کروموزوم‌های ساب متاسانتریک***[9]: سانترومر آنها نزدیک به ناحیه وسط کروموزوم قرار گرفته یکی از دیگری کمی بزرگ‌تر است.

1- Nucleolar Organizers
2- Satellites
3- Monocentric
4- Dicentric
5- Polycentric
6- Acentric
7- Telocentric
8- Acrocentric
9- Submetacentric

۴- کروموزوم‌های متاسانتریک[1]: سانترومر آنها در وسط کروموزوم قرار گرفته و در نتیجه بازوهای کروموزوم هم اندازه هستند.

اکثر کروموزوم‌ها دارای یک سانترومر هستند. برخی گونه‌ها سانترومرهای پخش شده‌ای دارند و رشته‌های دوکی به تمامی طول کروموزوم متصلند. این کروموزوم‌ها را هولوسانتریک[2] نامند.



شکل ۱۴-۲۳. کروموزوم متافازی مشاهده شده با میکروسکوپ الکترونی نگاره. پیکان‌ها محل سانترومرها را مشخص می‌سازند (درشت‌نمایی ۵۲۰۰۰×) (برگرفته از K.R.UTSUM، ۱۹۸۱).

تشکیلات فراساختمانی کروموزوم

در بررسی با میکروسکوپ‌های الکترونی نگاره، کروموزوم متافازی مجموعه‌ای از حلقه‌های کم‌وبیش منظم است که با تاشدگی‌های زیادی از یک رشته ۴۰ تا ۵۰ نانومتری مطابقت می‌کنند (شکل ۱۴-۲۳).

با میکروسکوپ الکترونی گذاره روی هر کروماتید و در هر طرف سانترومر ساختمان قرصی شکل به اسم کینه‌توکور دیده می‌شود (شکل ۱۴-۲۴). هر کینه‌توکور قطری حدود ۰/۲ تا ۲ میکرون دارد و به‌طور معمول به شکلی شبیه بشقاب دیده می‌شود. همان‌طور که شرح داده شد، هر کینه‌توکور دارای سه بخش با ویژگی‌های ساختمانی متفاوت است.

از نظر عمل، کینه‌توکور همانند مجموعه‌ای از نواحی سازمان‌یافته در اطراف DNA سانترومری است (شکل ۱۴-۲۴) که هر ناحیه به وسیله پروتئین‌هایی پوشیده شده که می‌توانند به میکروتوبول‌های «قاپیده شده» یعنی میکروتوبول‌های ایجاد شده با دخالت سانتروزوم بچسبند. تعداد این پروتئین‌ها بسیار متفاوت است. در مخمر تنها یک نوع از این پروتئین‌ها وجود دارد که تنها یک «واحد اتصال» را به وجود می‌آورد؛ در پستانداران نواحی اتصالی زیادی وجود دارد که هر یک دارای چند نوع پروتئین هستند. بخش‌های قرصی شکلی که با میکروسکوپ‌های الکترونی در محل کینه‌توکورها دیده می‌شوند می‌توانند نواحی پشت‌سرهم موجود در یک کروماتید باشند که چین خورده و به‌طور موضعی به وسیله پروتئین‌ها پوشیده شده‌اند (شکل ۱۴-۲۴). این چین‌خوردگی‌ها ضمن تراکم کروموزوم ایجاد شده و ناحیه اتصالی را به وجود می‌آورند.

پروتئین‌های دیگری نیز در محل کینه‌توکورها شناخته شده‌اند مثل: پروتئین‌های متمرکزکننده ریزرشته‌ها در پیش متافاز، پروتئین‌های جنبشی، ATPases و مانند آن که نقش همه آنها هنوز به خوبی روشن نشده است.

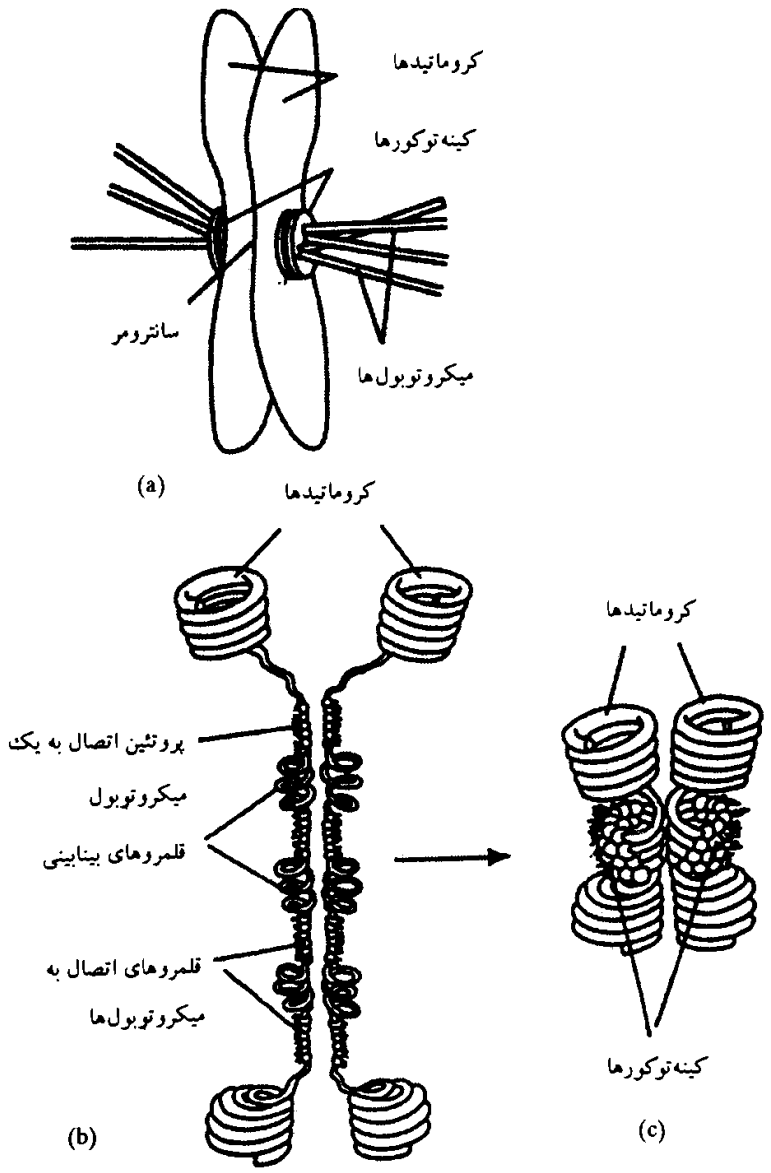
1- metacentric 2- Holocentric

کروماتینِ ناحیهٔ سانترومر غنی از ترکیب‌های تکراری است (DNAی بسیار تکراری، با ترتیب‌های ۱۷۱ جفت بازی) و در آن محل تعداد کمی ژن وجود دارد. ناحیه سانترومر در برابر عمل نوکلئازها پایداری زیادی دارد. چگونگی اتصال و بعد جدایی دو کروماتید هر کروموزوم در ناحیه سانترومر مورد بررسی زیادی بوده است و در این زمینه فرضیه‌های زیادی داده شده است:

الف - DNAی سانترومری در مرحله S همانندسازی نمی‌کند و با تأخیر در اواخر متافاز همانندسازی آن انجام می‌شود.

ب - DNAی سانترومری به‌طور طبیعی در مرحله S همانندسازی می‌کند اما کروماتیدها در هم رفته باقی می‌مانند؛ توپوایزومرازها در پایان متافاز رشته‌ها را می‌بُرند.

ج - پروتئین‌های غیرهیستونی اتصال بین دو کروماتید را برقرار می‌کنند. در حال حاضر دلایل کافی برای انتخاب قطعی هیچیک از این سه فرضیه وجود ندارد.



شکل ۱۴-۲۴. a) نمایی از وضع کینه‌توکور و سانترومر b) نمایی برای مشخص‌کردن مجموعه سانترومر - کینه‌توکور. در مرحله G_2، DNAی سانترومری از مجموعه‌ای از ترتیب‌های تکراری نوکلئوتیدی تشکیل شده است که در برخی نواحی به پروتئین‌هایی متصل است. هر پروتئین یک واحد اتصال به یک ریزرشته است. c) وقتی کروماتیدها پیچیدگی پیدا می‌کنند، مجموعه بخش‌های پروتئینی اتصال‌دهنده به ریزرشته‌ها متراکم شده و صفحات کینه‌توکوری را می‌سازند (گرفته شده از B.R.BRINKLEY، ۱۹۹۲).

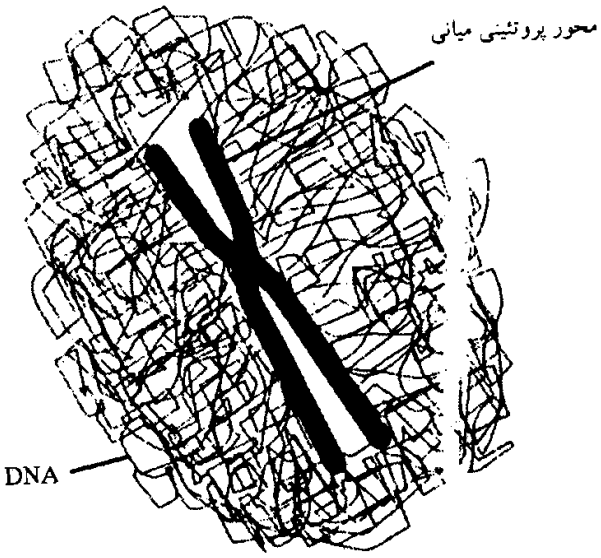
چگونگی تبدیل یک رشته کروماتینی یا کروموزوم انترفازی که در شیره هسته گسترده شده به یک کروموزوم کوتاه و متراکم متافازی از به‌هم پیچیدگی و تابیدگی‌های رشتهٔ کروماتینی (نوکلئوفیلامان) دارای ساختمان نوکلئوزومی نیز به‌طور کامل مشخص نیست.

تجزیه کروموزوم‌های متافازی جداشده از سلول نشان می‌دهد که این کروموزوم‌ها از DNA و ۵ نوع هیستون (یعنی از مواد سازنده رشته ۱۰ تا ۳۰ نانومتری) و انواع مختلفی از پروتئین‌های غیرهیستونی ساخته شده که در بین آنها پروتئین‌هایی بسیار شبیه به پروتئین‌های مادهٔ زمینه‌ای درونی هسته و آنزیم‌های وابسته به آن شناخته شده‌اند. اولین مرحله تراکم کروموزومی، فسفریلاسیون شدید (قوی) هیستون‌های H_1 و H_3 است. همین تحول این

پروتئین‌ها است که موجبی برای سازمان‌یابی رشتهٔ کروماتینی به کروموزوم می‌شود.

استخراج انتخابی پروتئین‌ها از کروموزوم‌های جداشده از سلول‌ها انجام شده و مشاهده چنین کروموزوم‌هایی که بر روی گرید پهن شده‌اند آگاهی‌های جالبی را به‌دست داده است.

پس از حذف پروتئین‌های غیرهیستونی به وسیله محلول‌های نمکی رقیق، کروموزوم به‌طور کامل سازمان خود از دست می‌دهد و تنها رشته کروماتینی با ساختمان نوکلئوزومی دیده می‌شود که به حسب شدت جداسازی پروتئین‌های غیرهیستونی، به‌صورت رشته ۱۱ یا ۳۰ نانومتری است. به عبارتی نوعی بازگشت به حالت انترفازی دارد.



شکل ۱۴-۲۵. منظره یک کروموزوم متافازی پس از حذف هیستون‌ها

پس از جداسازی هیستون‌ها، که با استفاده از ترکیبات پلی‌آنیونی قابل رقابت با پروتئین‌های بازی، مثل سولفات دکستران انجام می‌شود، پیکره کروماتیدها به‌صورت محور میانی متراکمی دیده می‌شود که در اطراف آن حلقه‌های فراوانی به حالت شعاعی کشیده شده‌اند که ضخامتی حدود ۳ تا ۴ نانومتر دارند و در حقیقت حلقه‌هایی از DNA کروماتیدی هستند (شکل ۲۵-۱۴).

می‌توان نتیجه‌گیری کرد که محور کروموزومی که رشتهٔ کروماتینی ۳۰ نانومتری در اطراف آن سازمان می‌یابد از پروتئین‌های غیرهیستونی تشکیل شده است.

به احتمال همین پروتئین‌های غیرهیستونی هستند که اتصال رشتهٔ کروماتینی با محور کروموزومی و نیز اتصال کروماتین با ماده زمینه‌ای درونی هسته انترفازی را برقرار می‌کنند.

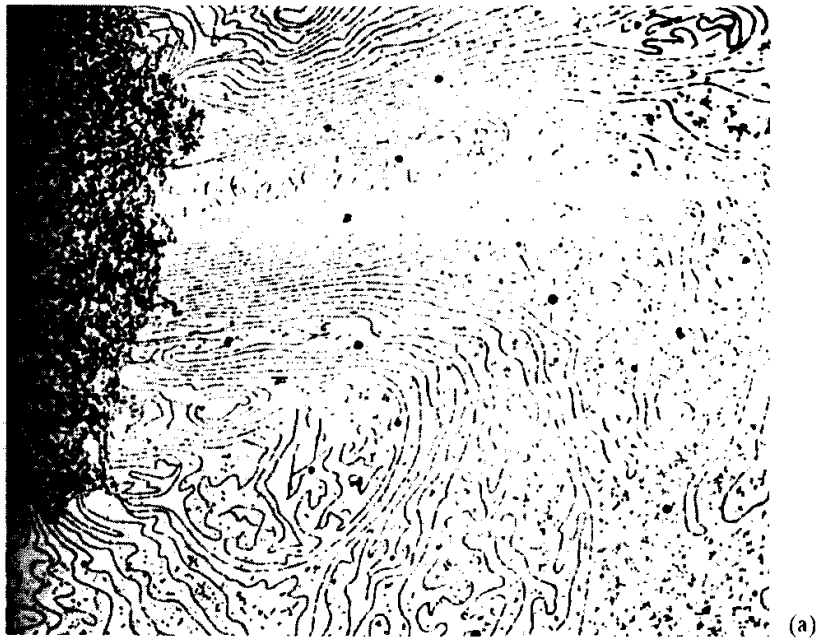
نظریات مختلفی برای توضیح ساختمان فضایی مجموعه مواد سازنده کروموزومی ارائه شده که تنها به شرح دو نظریه می‌پردازیم:

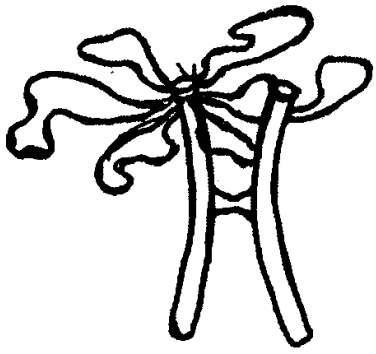
رشتهٔ کروماتینی ۳۰ نانومتری ابتدا به‌صورت حلقه‌های دارای ۲۰۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰ جفت نوکلئوتید در می‌آید (پیچ‌های کوچک ۳۰۰ نانومتری) که به حالت مارپیچی در اطراف محور پروتئینی می‌پیچند (شکل ۱۴-۲۶).

نظر دیگر این که رشته ۳۰ نانومتری به‌صورت حلقه‌های ۵۰۰۰۰ جفت باز سازمان می‌یابد که این حلقه‌ها خود به‌صورت مجموعه‌های ۶تایی به حالت روزتی (شبیه یک دسته گل) مجتمع می‌شوند. ۳۰ تا از این ساختمان‌های روزتی، یک پیچش (دور چرخش) و مجموعه مارپیچی شکلی از این پیچش‌ها، کروموزوم را به صورتی که با میکروسکوپ‌های نوری دیده می‌شود، به وجود می‌آورد (شکل ۱۴-۲۶).

ساختمان کروموزوم پروکاریوتی

در سلول‌های پروکاریوتی مثل باسیل‌کولی کروموزوم دارای یک محور میانی پروتئینی است که ماده ژنتیکی به‌صورت حلقه‌های کوچک و بزرگ زیادی روی آن چسبیده‌اند. هر حلقه دارای بخش شروع و پایان است که هر دو بخش بر روی محور پروتئینی متصل هستند. در درشت‌نمایی‌های زیاد، هر حلقه دارای واحدهایی متشکل از

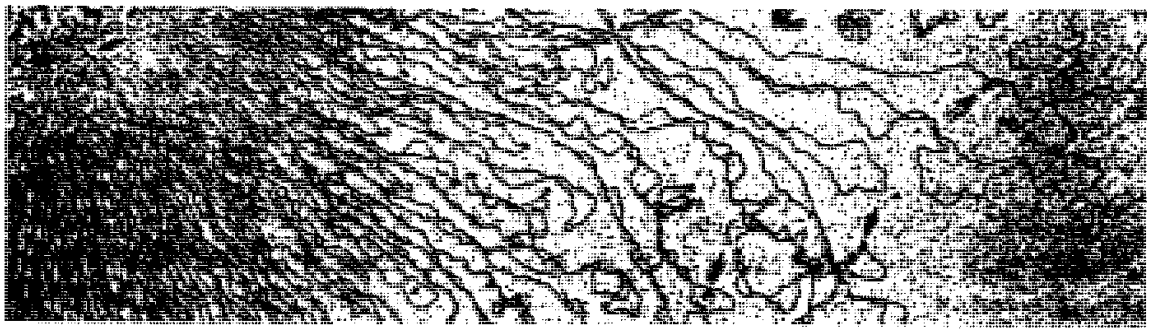




شکل ۱۴-۲۶. a) سازمان یک کروموزوم که از پیچیدگی‌های یک رشته کروماتینی (نوکلئوفیلامان) به‌صورت حلقه‌های پیچ‌خورده در اطراف یک محور پروتئینی تشکیل شده است. b) سازمان یک حلقه کروموزوم که از پیچیدگی‌های رشتهٔ کروماتینی به‌صورت حلقه‌های مجتمع ۶تایی شبیه دسته گل ایجاد شده است.

چین‌خوردگی‌های کوچک‌تر است که هر مجموعه را یک قلمرو (Domaine) گویند (شکل ۱۴-۲۷ و ۱۴-۲۸ الف و ب).

در گذشته هر قلمرو را محل تجمع مجموعه‌ای از ژن‌ها می‌دانستند که به‌طور همزمان رونویسی می‌شوند. بررسی‌های بعدی نشان داد که گرچه ممکن است ژن‌های یک قلمرو به‌طور همزمان رونویسی شوند اما این امر الزامی نیست. هم‌اکنون هر قلمرو را محل تجمع مجموعه ژن‌هایی می‌دانند که نتیجه عمل آنها به نحوی به همدیگر وابسته است.

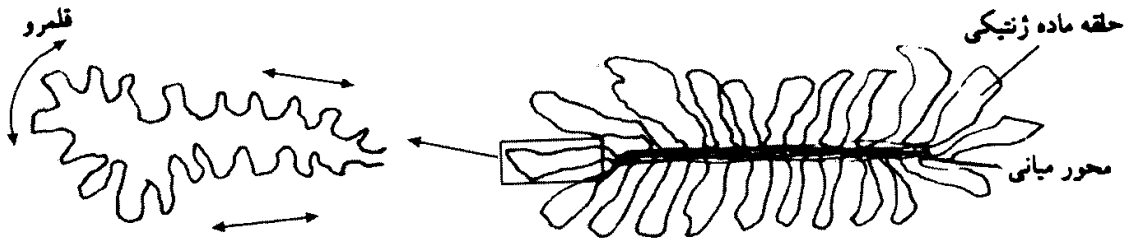


شکل ۱۴-۲۷. نوکلئوئید باکتری گسترده شده و مشاهده شده با میکروسکوپ الکترونی گذاره پس از به‌کارگیری سایه‌دهی. در اطراف یک بخش مرکزی (C)، DNAی نوکلئوئیدی به‌صورت حلقه‌های کم‌وبیش گسترده دیده می‌شود. پیکان‌ها وجود بخش‌های متراکم را نشان می‌دهند. درشت‌نمایی ۲۲۰۰۰ برابر (گرفته شده از R.RAVENLOFF و همکاران، ۱۹۷۶).

پلاسمید[1] و اپی‌زوم[2]

همان گونه که در صفحات قبل اشاره شد در عده زیادی از باکتری‌ها علاوه‌بر کروموزوم اصلی یک یا چند کروموزوم کوچک خارج از کروموزوم اصلی وجود دارد که آنها را پلاسمید نامند. هر پلاسمید دارای مولکول DNA دو زنجیره‌ای

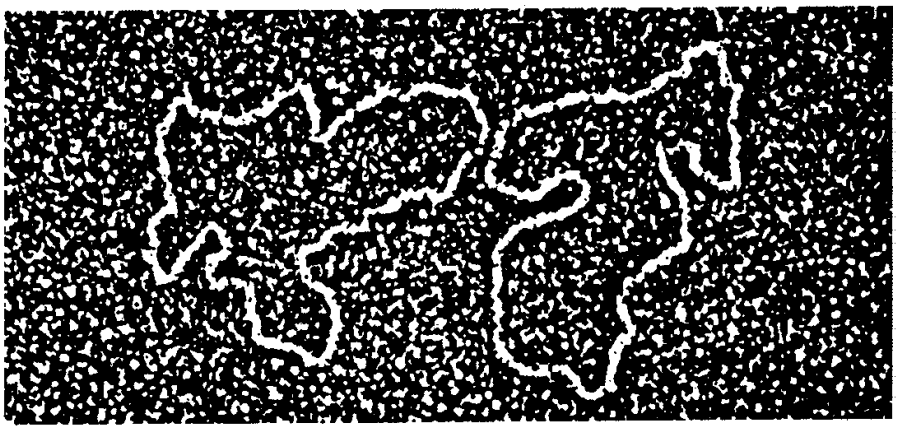
1- Plasmide 2- Episome



شکل ۱۴-۲۸. a) نمای ساختمان کروموزوم سلول پروکاریوتی b) یکی از حلقه‌های سازنده کروموزوم

مارپیچی، بسته (حلقوی) و کوچکی است که قادر به همانندسازی مستقل از کروموزوم اصلی باکتری است. تعداد پلاسمیدها تقریباً از نسلی به نسل دیگر سلولی ثابت می‌ماند.

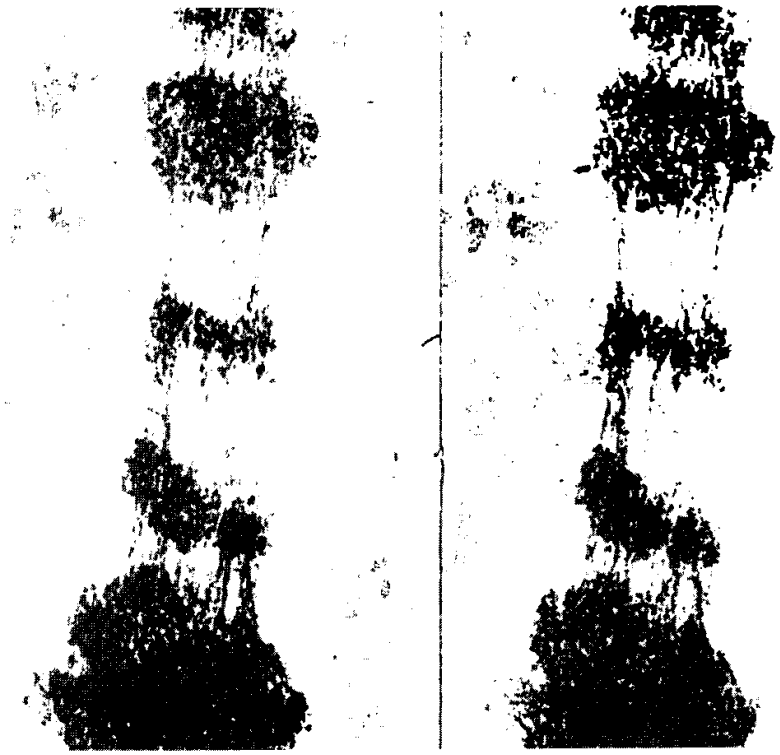
در بعضی شرایط ماده ژنتیکی سازنده پلاسمید می‌تواند با کروموزوم اصلی باکتری ادغام شود، در این حالت آن را اپی‌زوم نامند. در باسیل‌کولی سه گروه پلاسمید شناخته شده که عبارتند از: ۱) پلاسمیدهای دارای عوامل F یا عوامل باروری[1] که در عمل هم‌یوغی[2] جنسی دخالت دارند؛ ۲) پلاسمیدهای دارای عوامل R یا مقاومت (عوامل پایداری) که در مقاومت باکتری‌ها در برابر عمل عده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها مؤثرند؛ ۳) پلاسمیدهای دارای عوامل Col از کلمه Colicinergic یعنی عواملی که باکتری را قادر به بیوسنتز کلی‌سین[3] می‌کنند. کلی‌سین عملی مشابه آنتی‌بیوتیک دارد، یعنی باکتری‌های دیگر موجود در محیط را که فاقد این عوامل باشند از بین می‌برد. شکل ۱۴-۲۹ تصاویری از پلاسمیدهای استخراج شده از باسیل‌کولی را نشان می‌دهد.



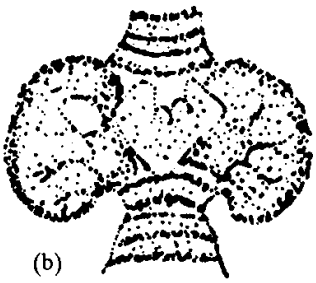
شکل ۱۴-۲۹. فتومیکروگراف الکترونی از دو پلاسمید استخراج شده از باسیل‌کولی

کروموزوم‌های غول‌پیکر یا پُلی‌تن[4]: در سلول‌های غدد بزاقی برخی حشرات (بیشتر از دو بالان) و در برخی بافت‌های دیگر، هسته‌های انترفازی دارای کروموزوم‌های بسیار بزرگی هستند که آنها را کروموزم‌های غول‌پیکر نامند. هر یک از این کروموزوم‌ها از تعداد زیادی و حتی هزار نسخه از یک کروموزوم که به موازات همدیگر متراکم شده‌اند، تشکیل شده است (شکل ۱۴-۳۰ الف). در طول هر کروموزوم غول‌پیکر، نواحی یا باندهایی متراکم‌تر و با شدت رنگ پذیری متفاوت از سایر قسمت‌ها وجود دارد. محل و تعداد این باندها در بافت‌های مختلف، متفاوت است. این نواحی در انترفاز نشان‌دهنده بخش‌هایی از DNA هستند که رونویسی بسیار فعالی دارند و mRNAهای زیادی از

1- Fertility 2- Conjugation 3- Colicine 4- Polyten or giant chromosome



(a)



(b)

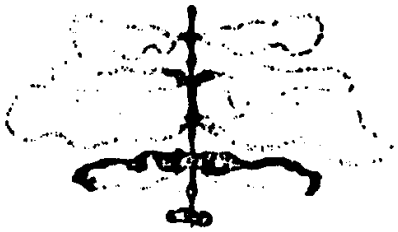
شکـــل ۱۴-۳۰. a) بخشی از یک کروموزوم غول‌پیکر. نواحی تیره و متراکم نشان‌دهنده بخش‌های بسیار فعال از نظر رونویسی هستند. b) پاف کروموزومی که حلقه‌های بالبیانی را نشان می‌دهد.

آنها در حال رونویسی است. این نواحی را پاف[1] نامند که با حالت فیزیولوژیکی سلول تغییر می‌کند. پاف‌های بزرگ و فعال «حلقه‌های بالبیانی[2]» نامیده می‌شوند (شکل ۱۴-۳۰ ب). هر کروموزم پلی‌تن دارای تعداد زیادی بندهای تیره با عرض‌های متفاوت به نظر می‌رسد که به وسیله نواحی روشنی از یکدیگر جدا شده‌اند. بندهای تیره کرومومرها هستند که در آنها DNA بسیار پیچیده و متراکم است. قبلاً هر بند را نمایانگر یک ژن و دارای DNA فراوان می‌دانستند، هم‌اکنون مشخص شده که هر بند به‌طور متوسط دارای ۳۰۰۰۰ جفت باز است و بنابراین می‌تواند مجموعه‌ای از چند ژن ویژه‌ای با چندین تکرار باشد.

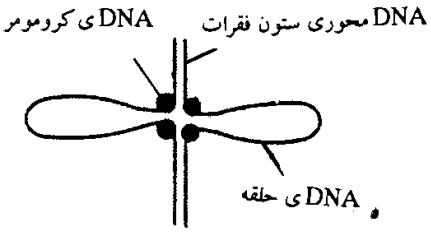
کروموزوم لمپ‌براش[3] (بطری شوی)

این کروموزوم‌ها در سلول‌های اووسیتی بسیاری از جانوران مثل ماهی‌ها، پرندگان، خزندگان، دوزیستان و برخی مهره‌دارانی که مقدار زیادی RNA تولید می‌کنند، دیده می‌شوند. این کروموزوم‌ها در مهره‌داران ظاهری کرکی دارند (شکل ۱۴-۳۱) و در برخی موارد بسیار بزرگ هستند و ممکن است اندازه یکی از آنها تا ۱۰۰۰ میکرون برسد. هر کروموزوم لمپ‌براش ظاهر دانه‌دانه‌ای دارد. دانه‌ها کرومومرها هستند که به وسیله یک رشته محوری نازک به یکدیگر متصل‌اند. حلقه‌های جانبی این کروموزوم‌ها گسترش کرومومرها حاصل شده‌اند. بخش محوری متراکم و

1- Puff 2- Balbiani rings 3- Lampbrush Chromosome



(b)



(c)

(a)

شکل ۱۴-۳۱. a) فتومیکروگراف از کروموزوم لمپ‌براش. حلقه‌های زیادی از محور کروموزوم بیرون آمده و به آن منظره کُرکی داده‌اند. b) نمای بخشی از کروموزوم لمپ‌براش. c) آرایش DNA در ناحیه‌ای از حلقهٔ لمپ‌براش.

در مشاهدهٔ میکروسکوپی تیره رنگ است و نسخه‌برداری از ژن‌های سازندهٔ آنها زیاد است. حلقه‌های جانبی حالت کم‌وبیش متقارنی دارند و حدود ۵۰٪ از DNA کروموزوم در آنها و بقیه در کروموم‌رها متراکم شده‌اند.

کروموزوم‌های لمپ‌براش بسیار قابل ارتجاع هستند و می‌توانند تا ۲/۵ برابر طول اصلی خود گسترش یابند.

۱۵ چرخهٔ یاخته‌ای، همانندسازی DNA و تقسیم یاخته‌ای

چرخه یاخته‌ای[1]

توانایی تکثیر یکی از ویژگی‌های اصلی یاخته‌های زنده است. تکثیر یاخته‌ای برای امکان تمایز یاخته‌ای، تشکیل بافت‌ها و سازماندهی پیکر جانداران پریاخته‌ای، رشد و ترمیم و نیز برای امکان پایداری نسل جانداران اعم از تک یاخته‌ای یا پریاخته‌ای لازم است. با در نظر گرفتن این که پیکر یک انسان بالغ از حدود $۱۰^{۱۴}$ یاخته تشکیل شده که همه از تقسیمات یک یاخته تخم اولیه ایجاد شده‌اند، اهمیت تکثیر یاخته‌ای و فراوانی آن مشخص می‌شود. در انسان بالغی هم که رشد پایان یافته باشد، تکثیر یاخته‌ای برای ترمیم یاخته‌های تحلیل رفته لازم است. برای مثال در ۵ لیتر خون بدن انسان حدود $۲/۵\times۱۰^{۱۳}$ گویچه سرخ با عمر متوسط نزدیک به ۱۲۰ روز وجود دارد که پس از تحلیل رفتن بایستی جایگزین شوند. به این منظور لازم است در هر ثانیه ۲/۵ میلیون گویچه سرخ جدید ساخته شود.

زمان و مجموعه تغییرات و تحولاتی را که از آغاز تقسیم یاخته‌ای تا رسیدن به شروع تقسیم متوالی بعدی بر یاخته صورت می‌گذرد، چرخه یاخته‌ای نامند. زمانِ چرخه یاخته‌ای به حسب نوع یاخته، سن یاخته و شرایط محیط، تغییرات زیادی دارد. در باکتری‌ها در شرایط بهینه زیست حدود هر ۲۰ دقیقه یکبار تقسیم صورت می‌گیرد و در شرایط معمول این زمان به یک ساعت می‌رسد. در یوکاریوت‌ها نیز زمان چرخه یاخته‌ای در یاخته‌های مختلف، تفاوت زیادی دارد. در اغلب یاخته‌های بدن انسان زمان متوسط چرخه یاخته‌ای حدود ۱۶ تا ۲۴ ساعت و زمان تقسیم یاخته‌ای حدود ۱ تا ۲ ساعت است.

در چرخه یاخته‌ای دو مرحلهٔ مشخص در نظر گرفته می‌شود: یکی مرحلهٔ (M) که ضمن آن تکثیر یاخته‌ای صورت می‌گیرد، این تقسیم می‌تواند به‌صورت میتوز یا میوز یا روش‌های دیگر تکثیر یاخته‌ای باشد؛ مرحلهٔ دیگر انترفاز است که در گذشته آن را به‌عنوان حالت استراحت یاخته در نظر می‌گرفتند. هم‌اکنون می‌دانیم که بخش عمده بیوسنتزها، رشد یاخته، ازدیاد اندامک‌های یاخته‌ای و همانندسازی ماده ژنتیکی یاخته در انترفاز انجام می‌شود.

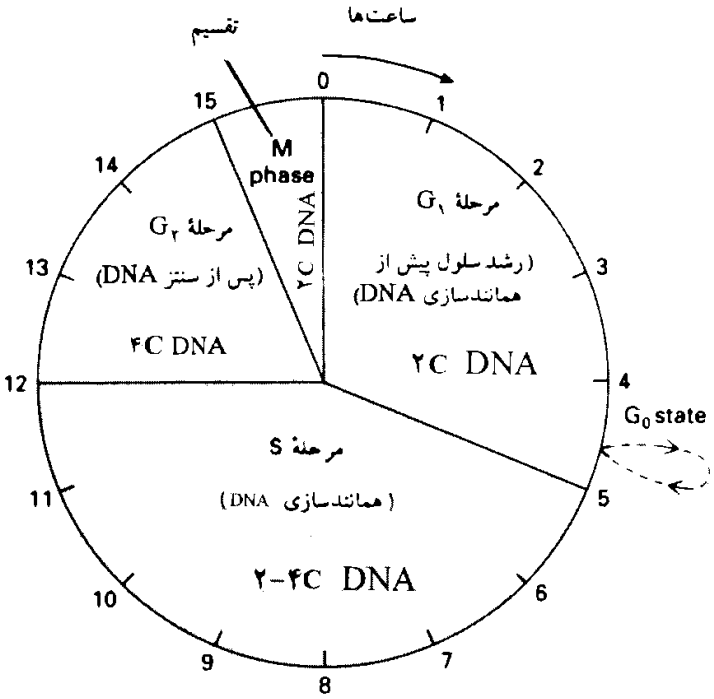
چرخه یاخته‌ای را می‌توان به‌صورت مجموعه پیچیده‌ای از پدیده‌ها در نظر گرفت که ضمن آن ابعاد یاخته افزایش می‌یابد، مواد اصلی سازنده یاخته دو برابر می‌شوند و سپس تقسیم یاخته‌ای صورت می‌گیرد که در حکم بخش نهایی و قابل رؤیت این تغییرات و تحولات مولکولی است.

استفاده از روش اتوهیستورادیوگرافی با به کارگیری موادی مثل تیمیدین تریسیوم‌دار همچنین استفاده از روش رنگ‌آمیزی فولگن نشان داده است که در قسمتی از انترفاز همانندسازی DNA انجام می‌شود و مقدار DNA یاخته تقریباً به دو برابر افزایش می‌یابد. این بخش را مرحله S (سنتز DNA) و مرحلهٔ قبل از آن را مرحلهٔ پیش سنتز یا $G_۱$ ($G_۱$ از gap به معنی فاصله گرفته شده است) و مرحلهٔ پس از همانندسازی DNA را مرحلهٔ پس سنتزی یا $G_۲$ نامند. مجموعهٔ مراحل $G_۱$، S و $G_۲$ را انترفاز گویند. انترفاز و مرحله M (مرحله تقسیم یاخته) بر روی هم، چرخه یاخته‌ای

1- Cell Cycle

را تشکیل می‌دهند (شکل ۱۵-۱).

با بررسی وضع تعداد زیادی از نمونه‌ها، می‌توان درصد یاخته‌هایی را که دارای مقدار مساوی DNA هستند، مشخص کرد. اگر از یک بافت جانداران یوکاریوتی (جانوری یا گیاهی) برای بررسی مقدار DNA استفاده شود، در بین هسته‌هایی که در حال میتوز نیستند حدود ۴۰٪ دارای مقدار پایه‌ای DNA(2Complements = ۲C)، ۲۰٪ دارای مقدار دو برابر میزان پایه (۴C) و ۴۰٪ دارای مقداری بین ۲C و ۴C هستند. اگر زمان چرخه یاخته‌ای را ۲۰ ساعت و زمان مرحله تقسیم را یک ساعت در نظر بگیریم می‌توان مراحل زیر را برای چرخه یاخته‌ای در نظر گرفت: مرحله G_1 حدود ۸ ساعت که در آن هر هسته دارای ۲CDNA است؛



شکل ۱۵-۱. چرخه یاخته‌ای برای یک یاخته از پستانداران. کل چرخه یاخته‌ای، ۶، ساعت است.

مرحله (Sاز Synthese)، حدود ۸ ساعت که ضمن آن مقدار DNA هر هسته به‌تدریج افزایش می‌یابد؛ مرحله G_2، حدود ۳ ساعت که هر هسته دارای حدود ۴CDNA شده است و مرحله (Mاز Mitose) که حدود ۱ ساعت طول می‌کشد و ضمن آن به‌طور سریعی مقدار DNA به نصف یعنی به ۲C برمی‌گردد زیرا DNA موجود در هر هسته بین دو هسته جدید تقسیم می‌شود.

همان‌گونه که توضیح داده شده زمان چرخه یاخته‌ای و زمان هر مرحله چرخه یاخته‌ای در یاخته‌های مختلف و در شرایط محیطی متفاوت، بسیار مختلف است. برای یاخته‌های پستانداران زمان چرخه یاخته‌ای را به‌طور متوسط ۱۶ ساعت در نظر می‌گیرند و مراحل آن را به‌صورت شکل ۱۵-۱ نشان می‌دهند.

عده‌ای ازیاخته‌ها دارای تقسیماتی منظم هستند (برای مثال تقسیمات اولیه یاخته تخم). این حالت استثنایی است و در اغلب موارد چرخه یاخته‌ای حتی برای یاخته‌های یک بافت زمان برابری ندارد. اگر با استفاده از مواد شیمیایی متوقف‌کننده تقسیمات یاخته‌ای در محیط کشت یاخته‌ها، تقسیمات را متوقف کنیم، پس از حذف عامل شیمیایی تقسیمات از سرگرفته می‌شود و گرچه برای تعدادی از یاخته‌ها تا مدتی همزمان پیش می‌رود، اما بعد از چند بار تقسیم دوباره ناهمزمانی و نابرابری زمان چرخه یاخته‌ای بین آنها مشخص می‌گردد.

با بررسی یاخته‌هایی که دارای چرخه یاخته‌ای همزمانی هستند می‌توان زمان و ویژگی‌های هر مرحله را با دقت تشخیص داد. بدیهی است که مراحل مختلف چرخه یاخته‌ای ویژگی‌های زیستی یکسانی ندارند.

مرحله G_1. این مرحله را به دلیل زمانش که قبل از مرحله سنتز DNA است، مرحله پیش‌سنتز[1] نیز می‌نامند. این مرحله از پایان تقسیم یاخته‌ای شروع می‌شود و تا رسیدن به شروع همانندسازی DNA ادامه می‌یابد. در این مرحله یاخته رشد سریعی دارد؛ ریبوزوم‌ها، پیش‌سازهای DNA، پروتئین‌های مختلف سنتز می‌شوند و بی‌تردید مقدار قابل

1- Presynthese

توجهی RNAها در یاخته سنتز شده به کارگرفته می‌شوند. اندازه یاخته تا رسیدن به حد بحرانی افزایش می‌یابد و مجموعه این تغییرات یاخته را آماده ورود به مرحله S می‌کند.

مرحله S. مرحله همانندسازی DNA است. این مرحله پس از رسیدن یاخته به اندازه بحرانی خود شروع می‌شود و تا رسیدن به مرحله G_2 ادامه می‌یابد. در این مرحله در یاخته‌های یوکاریوتی با استفاده از آنزیم‌ها و پیش‌سازهای DNA که در مرحله G_1 آماده شده یا در اوایل مرحله S فراهم می‌شوند، همانندسازی در واحدهای مستقل همانندسازی - DNA (رپلیکان‌ها) موجب افزایش تدریجی مقدار DNA یاخته می‌شود. همچنین ژن‌های مربوط به بیوسنتز هیستون‌های نوکلئوزومی رونویسی می‌شوند و این پروتئین‌ها به مقدار زیادی در سیتوپلاسم یاخته ساخته می‌شوند. در شروع مرحله S هر کروموزوم دارای یک رشته کروماتینی نوکلئوزومی (نوکلئوفیلامان) است و در پایان مرحله S هر کروموزوم دو کروماتیدی است و هر کروماتید خود دارای یک نوکلئوفیلامان می‌باشد. دو کروماتید کروموزوم از ناحیه سانترومر به‌هم متصلند.

مرحله G_2. از پایان S شروع می‌شود و تا رسیدن به مرحله تقسیم یاخته‌ای (M) ادامه دارد. در مرحله G_2 یاخته برای میتوز آماده می‌شود، آنزیم‌ها و عوامل تنظیم‌کننده لازم برای تقسیم فراهم می‌شوند. اندامک‌های یاخته تا دو برابر زیاد می‌شوند و ساختارهای لازم در تقسیم به ویژه ریزلوله‌ها به مقدار زیاد ساخته شده و ذخیره می‌شوند[1].

مرحله M. از پایان G_2 شروع می‌شود و تا رسیدن به G_1 ادامه دارد. M مرحله تقسیم واقعی است. کروموزوم‌ها تراکم زیادی پیدا می‌کنند، پوشش هسته‌ای ناپدید می‌شود و سپس دو کروماتید هر کروموزوم به‌صورت همگنی بین دو هسته جدید توزیع می‌شوند و پس از تشکیل دو هستهٔ هر یک دیپلوئید (در تقسیم میتوز)، با نصف شدن یاخته، پایان می‌یابد.

تنظیم چرخه یاخته‌ای

درک کامل چگونگی تنظیم چرخهٔ یاخته‌ای اهمیت زیادی دارد و می‌تواند به ایجاد راه‌های جدیدی برای القای تقسیم یاخته‌ای مورد نیاز در تجدید و ترمیم بافت‌ها و اندام‌های آسیب‌دیده بیانجامد، یا راه حلی برای به تقسیم کشانیدن نرون‌های بالغ راکه تقسیم نمی‌شوند، به‌دست دهد و از سوی دیگر ممکن است در ایجاد روش‌هایی برای مهار تقسیم بی‌قاعده و لجام گسیخته یاخته‌های سرطانی کمک کند.

سنتز پروتئین‌ها در تمام مراحل چرخه یاخته‌ای انجام می‌شود در حالی که RNAها هنگام مرحله M سنتزی ندارند. مرحله G_1 یکی از مراحل فعال از نظر بیوسنتزها است که مدت آن بسیار متغیر است، ممکن است به کلی حذف شود و سنتز DNA بلافاصله در پایان میتوز آغاز گردد و به این ترتیب تقسیمات یاخته‌ای به صورتی بسیار سریع صورت گیرد. حذف مرحله G_1 در یاخته‌های ویژه‌ای دیده می‌شود از جمله در یاخته‌های تخم هنگامی که اولین تقسیمات خود را می‌گذارند. در این یاخته‌های بسیار بزرگ، سیتوپلاسم سرشار از مواد ذخیره‌ای و پیش‌سازهای متابولیت‌های مختلف است و بنابراین نیازی نیست که یاخته این مواد را سنتز کند، این وضعیت به‌طور غیرمستقیم اهمیت G_1 در برقراری دوبارهٔ اندازه یاخته‌ای از راه بیوسنتزها را مشخص می‌سازد.

در عده‌ای از یاخته‌ها زمان مرحله G_1 به‌تدریج در طول چرخه‌های یاخته‌ای پی‌درپی افزایش می‌یابد؛ اندازه این یاخته‌ها افزایش می‌یابد و بعد به مرحله‌ای می‌رسند که در آنها S آغاز نمی‌شود. این وضع با تمایز یاخته‌ای یعنی کسب ساختمان و عملی ویژه همراه می‌شود. در یاخته‌های تمایز یافته تقسیمات میتوزی بیش از پیش کاهش

1- Pool Cellular

می‌یابد برای مثال یکبار در سال برای یاخته‌های کبدی، یا به کلی متوقف می‌شود مثل نرون‌ها در انسان پس از تولد. در این یاخته‌ها که G_1 آنها طولانی شده است دیگر از G_1 بحث نمی‌شود و به اصطلاح یاخته به G_0 رسیده است. برای این یاخته‌ها وضع هسته، مشابه حالت انترفازی در نظر گرفته نمی‌شود بلکه حالت خاص یا به اصطلاح هسته به حالت «استراحت[1]» مطرح می‌گردد. برای برخی یاخته‌ها این مرحلهٔ «استراحت» نامحدود است و عده‌ای دیگر می‌تواند فعالیت میتوزی خود را از سر گیرند و از مرحله G_0 خارج شوند. مرحله G_0 بسیار طولانی‌تر از یک مرحله G_1 عادی است؛ کنترل این «استراحت» و تمایز یاخته‌ای، پدیده‌ای پیچیده است و به عوامل محیطی و در جانداران پیشرفته به سازگاری‌های درونی یاخته‌ها وابسته است.

تنظیم چرخهٔ یاخته‌ای از دیدگاه مولکولی از راه تنظیم شروع مرحلهٔ S، یا شروع میتوز صورت می‌گیرد. هر دو مرحله به وسیله پروتئین کینازهای هترودیمری تنظیم می‌شوند که دارای یک زیرواحد کاتالیتیکی و یک زیرواحد تنظیمی می‌باشند. زیرواحدهای تنظیمی به نام سیکلین‌ها[2] معروفند که مقدار و نوع آنها در مراحل چرخهٔ یاخته‌ای متفاوت است. سیکلین‌ها در مقدار بیشینهٔ خود فعال هستند و وقتی یاخته به مرحلهٔ بعدی چرخه وارد می‌شود، به سرعت تجزیه می‌شوند. فعالیت زیرواحدهای کاتالیتیکی، وابسته به اجتماعشان با یک سیکلین است و دادن نام کیناز وابسته به سیکلین «cdk[3]» به همین دلیل است. وقتی هترودیمرهای «cdk – cyclin» فعّال می‌شوند، با فسفریله کردن پروتئین‌های متفاوت، برخی از آنها را فعال و تعدادی را غیرفعال می‌کنند و از این راه بسیاری از رخدادهای مولکولی چرخه یاخته‌ای، همانندسازی DNA و تقسیم یاخته‌ای را کنترل می‌کنند.

فعالیت مجموعه‌های هترودیمری «cdk – cyclin» نیز تنظیم می‌شود. فعالیت جزء کاتالیتیکی cdk به وسیلهٔ پروتئین کینازهای دیگر و پروتئین فسفاتازها تنظیم می‌شود. مقدار زیرواحدهای تنظیمی و زیرواحدهای کاتالیتیکی با تنظیم رونویسی ژن‌هایی که آنها را رمزدار (کُد) می‌کنند و با تنظیم تجزیهٔ آنها کنترل می‌شود.

یاخته‌های در حال همانندسازی یوکاریوتی دارای تعدادی از سیکلین‌های متفاوت هستند که عملشان در مرحلهٔ G_1، تحریک ورود یاخته به مرحلهٔ S است. بیشتر این سیکلین‌ها در یاخته‌هایی که در حال تقسیم نیستند، بیان نمی‌شوند و چرخهٔ یاخته‌ای به سوی G_0 هدایت می‌شود و در واقع یاخته از چرخه خارج می‌گردد. اگر به یاخته‌های واقع در G_0، عوامل رشد اضافه شوند یک گروه از ژن‌ها به نام «ژن‌های پاسخ اولیه[4]» القا می‌شوند؛ عوامل رونویسی حاصل از بیان این ژن‌ها، موجب بیان گروه دیگری از ژن‌ها به نام «ژن‌های پاسخ تأخیری[5]» می‌شوند که سیکلین‌های G_1 و cdk_s را رمزدار می‌کنند. رونویسی ژن‌های رمزدارکنندهٔ سیکلین‌های G_1، ورود یاخته‌های مخمر به مرحلهٔ S را موجب می‌شوند. مخمر نان[6] و مخمر ارزن[7] افریقایی هر دو دارای یک نوع cdk هستند که مقدارش در طول چرخه یاخته‌ای تغییر زیادی پیدا نمی‌کند ولی یاخته‌های پستانداران دارای سه نوع cdk_s اصلی هستند که مقدار آنها در طول چرخه یاخته‌ای نوسان دارد.

در یاخته‌های یا مخمر نان و بیشتر یاخته‌های پستانداران، القای ژن‌های کُدکنندهٔ سیکلین‌های G1 و cdk_s، یاخته‌ها را به مرحلهٔ S هدایت می‌کند، این عمل طی فرایندی به نام «گذر آغازی[8]» در مخمر و «گذر از نقطه مهار[9]» در یاخته‌های پستانداران انجام می‌شود. در یاخته‌های مخمر و پستانداران مجموعه‌های «G1 cdk – cyckinc»، عوامل رونویسی موجود در یاخته را فعال می‌کنند. این عوامل فعال شده، رونویسیِ ژن‌هایی را القا می‌کنند که تشکیل آنزیم‌های

1- Quiescent 2- Cyclines 3- Cycklin - dependent Kinase
4- Early - response genes 5- Delayed - response genes
6- Sacchromyces Cervisiae 7- Schizoscaccharomyces Pombe 8- Passing Start
9- Passing the restriction point

همانندسازی DNA را رمزدار می‌کنند. از سوی دیگر مجموعه‌های «G_1cdk − cyclin» مضاعف شدن سانتریول‌ها را تحریک می‌کنند.

پس از همانندسازی DNA، یاخته‌ها به مرحلهٔ G_2 می‌رسند و به دنبال آن میتوز آغاز می‌شود. ورود از G_2 به میتوز وابسته به فعالیت «عامل پیش‌برندهٔ میتوز = MPF[1]» است. زیرواحد کاتالیتیکی MPF هم یک پروتئین کیناز وابسته به سیکلین است که برای اولین بار در جهش یافته‌های cdc_2 از مخمر ارزن افریقایی شناسایی شد و به‌طور کلی به cdc_2 معروف است. زیرواحد تنظیمی MPF، یک سیکلین B است. تنظیم فعالیت MPF با فسفریلاسیون زیرواحد cdc_2 صورت می‌گیرد. فسفریلاسیون به وسیلهٔ کیناز فعال‌کنندهٔ cdk[2] برای فعایت MPF لازم است، به احتمال این امر موجب تغییر شکل فضایی زیرواحد cdc_2 می‌شود تا بهتر بتواند با گوهرمایه‌ها (سوبستراها) در تماس باشد. پروتئین cdc_{25} فسفاتاز با جدا کردن یک فسفاتِ مهارکننده موجب فعال شدن پروتئین کیناز cdc_2 می‌شود.

فعّال شدن MPF به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم فرایندهای میتوز را به راه می‌اندازد. برای مثال مشخص شده است که MPF قطعه‌قطعه شدن پوشش هسته را شروع می‌کند و به‌طور مستقیم پروتئین‌های لامینایی را فسفریله می‌نماید، همچنین به مولکول‌های دیگر پیام می‌دهد تا با یک سلسله واکنش‌های مولکولی، انتقال هرچه بیشتر گروه‌های فسفات به لامین‌ها را به اوج برسانند. عمل فسفریلاسیون سبب دپلیمریزاسیون و از هم پاشیدن لامین‌ها می‌شود و منجر به تجزیه و از هم پاشیدن پوشش هسته‌ای می‌گردد. MPF فعّال نه تنها این فرایند که موجب تقسیم فیزیکی هسته و دیگر بخش‌های یاخته می‌شوند را کنترل می‌کند بلکه آنزیم‌های تجزیه‌کننده سیکلین را فعال می‌سازد. وقتی مقدار سیکلین به پایین‌تر از آستانه لازم برسد، میتوز پایان می‌یابد. بدون سیکلین، پروتئین cdc_2 و بنابراین MPF نمی‌توانند فعال بمانند: هنگامی که MPF اثرش را از دست می‌دهد؛ فسفاتازها غالب می‌شوند و گروه‌های فسفات را که به وسیله MPF به پروتئین‌ها (ازجمله لامین‌ها) متصل شده بودند، حذف می‌کنند. حذف فسفات‌ها موجب پلیمریزه شدن دوبارهٔ لامین‌های هسته‌ایِ دو هستهٔ دختری در اواخر تلوفاز می‌شود. همچنین فسفاتازها سبب غیرفعال شدن آنزیم‌هایی می‌شوند که MPF آنها را فعال کرده بود. از جمله این آنزیم‌ها می‌توان آنزیم‌های تجزیه‌کننده سیکلین رانام برد. سرانجام بی‌فسفریله شدن مولکول میوزین موجب شروع تراکم آنها و به دنبال آن تقسیم سیتوپلاسم و جدا شدن یاخته‌ها می‌گردد. همراه شدن خاموشی آنزیم‌های تجزیه‌کننده سیکلین و سنتز مداوم سیکلین موجب تجمع دوباره سیکلین در انترفاز می‌گردد و چرخه یاخته‌ای دوباره شروع می‌شود.

در یاخته‌های یوکاریوتی در مرحله تکثیر فعال، پیشرفت مراحل چرخه یاخته‌ای با مجموعه‌ای از پدیده‌های فسفریلاسیون کنترل می‌شود. این مطلب در بین سال‌های ۱۹۸۷ تا ۱۹۹۰ مشخص شده است. در این فاصلهٔ زمانی مشخص شد که محصول عمل ژن cdc_2 یک تنظیم‌کننده ویژه برای ورود به میتوز و فرآیندهای آن است.

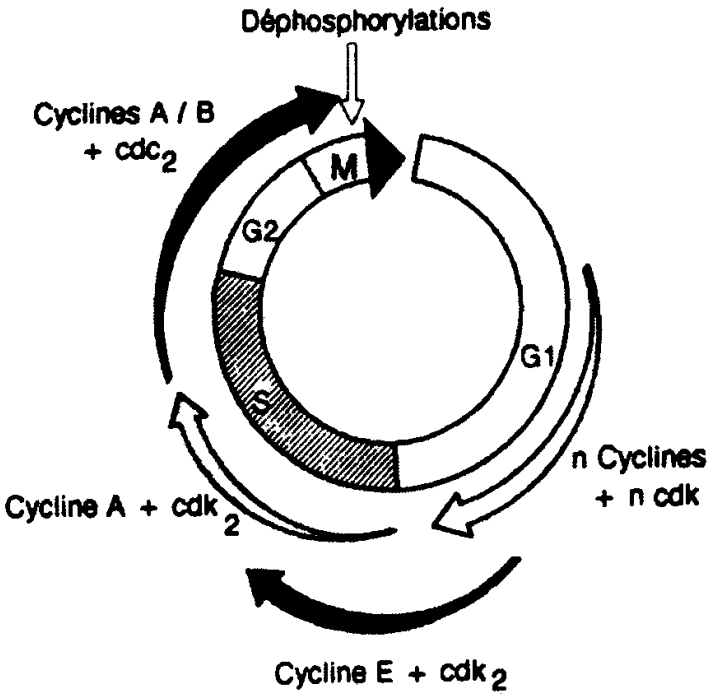
محصول عمل این ژن یک زیرواحد کاتالیتیک از یک کیناز است (این کیناز آنزیمی است که می‌تواند یک گروه فسفات را به یک پروتئین بچسباند و آن را فسفریله کند) که $P.34^{cdc2}$ نامیده می‌شود. برای این که این زیرواحد فعال باشد بایستی به پروتئین دیگری که زیرواحد تنظیم‌کننده یا سیکلین B را می‌سازد، متصل و مشترک شود. مجموعهٔ «$B - P.34^{cdc2}$»، MPF یعنی عامل آغازکننده مرحله M را می‌سازد که گذر از G_2 به مرحله M را موجب می‌شود.

سیکلین B در مرحله S شروع به سنتز می‌کند و به حالت ترکیب شده با $P.34^{cdc2}$ در طول چرخه یاخته تغییر نمی‌کند. به نظر می‌رسد که هنگام مراحل S و G_2، فسفریلاسیون‌ها موجب غیرفعال شدن مجموعه «$B - P.34^{cdc2}$ سیکلین» می‌شود. حذف این گروه‌های فسفات آن را فعال می‌کند: این وضع موجب ورود به میتوز می‌شود.

1- Mitosis - Promoting factor 2- cdk - activating Kinase

در سال‌های اخیر چگونگی کنترل چرخه یاخته‌ای مورد بررسی زیادی بوده و پیچیدگی زیاد آن مشخص شده است. تعداد زیادی کینازهای گروه «$P.34^{cdc2}$» شناخته شده‌اند که همگی در تنظیم چرخه یاخته‌ای دخالت دارند و همگی تنها وقتی فعالند که با یک سیکلین مشترک شده باشند، بنابراین کینازهایی وابسته به سیکلین cdk هستند که تعداد آنها همواره رو به افزایش است و آنها را cdk_2، cdk_3، cdk_4، cdk_5 و مانند آن می‌نامند. همچنین سیکلین‌های دیگری غیر از سیکلین B شناسایی شده‌اند (سیکلین A، E، C، D_1، D_2، D_3 و مانند آن). مشخص شده است که یک نوع سیکلین می‌تواند زیرواحدهای کاتالیتیک مختلفی را فعال کند ($Acdk_2$، $Acdk_2$، $Acdk_3$ و مانند آن) و یا این که یک زیرواحد کاتالیتیک می‌تواند به سیکلین‌های مختلف بچسبد $cdk_2 - A$، $cdk_2 - D$، $cdk_2 - E$ و مانند آن).

هم‌اکنون تصور می‌شود (شکل ۱۵-۲) که سیکلین B و A در حالت چسبیده به $P.34^{cdc2}$، که مقدارشان به‌طور محسوسی در مرحله G_2 افزایش می‌یابد، گذر از مرحله G_2 به M را کنترل می‌کنند؛ سیکلین A وابسته به cdk_2 پیشرفت مرحله S و سیکلین E وابسته به cdk_2 در گذر از G_1 به S دخالت دارند. وقتی انواع مختلف سیکلین C و D با کینازهای مختلف مشترک باشند نقشی را در طول مرحله G_1 ایفا می‌کنند.



شکل ۱۵-۲. چرخه یاخته‌ای و سیکلین‌ها. تنظیم پدیده‌های چرخه یاخته‌ای با دخالت منظم و دوره‌ای کینازهای مختلف برقرار می‌شود. هر یک از این کینازها از اشتراک یک سیکلین و یک واحد کاتالیتیک (cdc یا cdk) ساخته شده است. هر یک از این کینازها روی سوبسترای مشخصی عمل می‌کند. نظم دخالت آنها از راه نظم رونویسی سیکلین‌ها مشخص می‌شود. این یک تنظیم ژنتیکی است. سیکلین‌ها به سرعت تجزیه می‌شوند. واحدهای کاتالیتیک در صورتی که به یک سیکلین متصل نشوند، به‌صورت غیرفعال باقی می‌مانند. کینازهای $cdk_2 - A$، $cdk_2 - B$ گذر از G_2 به M و فرآیندهای میتوز را تنظیم می‌کنند.

کینازهایی که از $P.34^{cdc2}$ و سیکلین A و B ساخته شده‌اند، فسفریلاسیون‌های زیادی را موجب می‌شوند که شاخص ورود به میتوز و انجام فرآیندهای آن است مثل: تراکم کروموزوم‌ها (با فسفریلاسیون شدید H_1 و H_3)، بازسازی اسکلت یاخته‌ای و تشکیل دوک، ناپدید شدن پوشش هسته‌ای که با دپلیمریزاسیون پروتئین‌های لامینایی همراه است؛ همچنین از هم پاشیدن هستک در نتیجه فسفریلاسیون پروتئین‌هایی مثل نوکلئولین.

برای آن که مرحله S به‌طور مناسبی آغاز شود و به انجام برسد، عوامل همانندسازی DNA نشانه‌هایی برای کینازها هستند. چگونگی عمل تنظیم‌کننده‌ها برای فراهم شدن عواملی که در G_1 ساخته می‌شوند به خوبی شناخته نشده است.

تنظیم چرخه یاخته‌ای به وسیله سنتز سیکلین‌های ویژه‌ای در لحظات کلیدی[1] (نقاط کنترل) صورت می‌گیرد. حالت‌های گوناگونی از ترکیب سیکلین‌ها با واحدهای کاتالیتیکی مختلفی امکان فسفریلاسیون‌های تدریجی

1- Check Points

گوهرمایه‌های متفاوتی را فراهم می‌سازند. یک برنامه ژنتیکی مشخص، نظم رونویسی mRNAهای تولیدکنندهٔ سیکلین‌ها را هدایت می‌کند که این رونویس‌ها می‌توانند به وسیله عوامل درونی و بیرونی منظم شده و به یاخته امکان سازگاری‌های لازم را بدهند (شکل ۱۵-۲).

کنترل لحظات کلیدی موجب می‌شود که تا وقتی هر مرحله از چرخهٔ یاخته‌ای کامل نشده باشد، مرحله بعدی آغاز نگردد. DNAی همانندسازی نشده ورود به میتوز را متوقف می‌کند؛ آنافاز تا زمانی که همه کینه‌توکورهای کروموزومی به رشته‌های دوک میتوزی متصل نشوند، شروع نمی‌شود. آسیب DNAای نقاط کنترلی را القاء می‌کند که از ورود به مرحلهٔ S و مرحلهٔ M جلوگیری می‌کنند و این وضع تا وقتی که DNA ترمیم شود، ادامه می‌یابد. در یاخته‌های پستانداران آسیب DNAای موجب فعالیت عامل رونویسی $P_{۵۳}$ می‌شود که با رونویسی ژن cKil، پروتئین کوچکی را به وجود می‌آورد که این پروتئین به مجموعهٔ «G_1 cdk − cyclin» متصل می‌شود، عمل آنها را مهار می‌کند و ورود یاخته به مرحلهٔ S را متوقف می‌سازد.

تنظیم‌کننده‌های اساسی چرخهٔ یاخته‌ای به نام cdk_s و سیکلین‌ها در گیاهان هم شناسایی شده‌اند. دو نوع cdk_s به نام‌های $cdc۲aA^+$ و $cdc۲bA^+$ در گیاه آرابیدوپسیس[1] شناسایی شده است. تاکنون ۱۱ سیکلین متفاوت در این گیاه یافت شده که می‌توان از جملهٔ آنها $cyc۱A^+$، $cyc۲aA^+$، $cyc۲bA^+$، $cyc۳aA^+$، $cycbA^+$ را نام برد.

بررسی نقش ژن‌های $cdc۲aA^+$ و $cyc۱A^+$ نشان داده است که بیان آنها در بافت‌های در حال تقسیم، برای مثال در مریستم‌ها زیاد می‌شود. طی فرآیند تمایززدایی[2]، کاهش در بیان $cdc۲aA^+$ و توقف در بیان $cyc۱A^+$ صورت می‌گیرد.

همانندسازی ماده ژنتیکی

همانندسازی ماده ژنتیکی برای امکان تولیدمثل، انتقال اطلاعات ژنتیکی جانداران از نسلی به نسل دیگر و بقای گونه‌ها ضرورت دارد. در گذشته در زمینه همانندسازی ماده ژنتیکی تنها به همانندسازی مولکول DNA توجه می‌شد[3] اما هم‌اکنون با شناخت بیشتری که از ترکیب شیمیایی و فراساختار ماده ژنتیکی و طرز عمل آن به‌دست آمده است می‌دانیم که علاوه‌بر همانندسازی DNA پروتئین‌های وابسته به آن نیز بایستی زیاد شوند. عمل همانندسازی به ویژه در یوکاریوت‌ها به نحوی انجام می‌شود که رشته کروماتینی با ساختمان نوکلئوزومی مضاعف گردد، به همین دلیل ازهمانندسازی ماده ژنتیکی یا همانندسازی کروماتین بحث می‌شود.

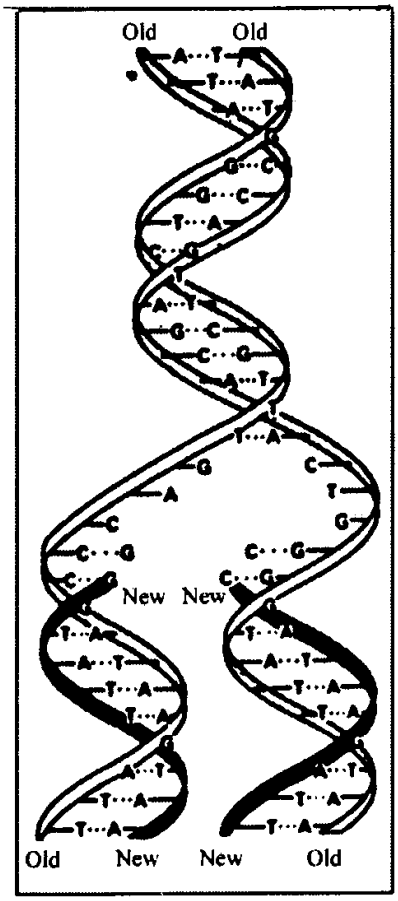
از زمانی که سازمان مولکولی DNA در سال ۱۹۵۳ به وسیله واتسون و کریک شناخته شد، یکی از ویژگی‌های مورد توجه، چگونگی همانندسازی آن بود. واتسون و کریک همراه با پیشنهاد طرح خود در مورد سازمان مولکولی DNA مدلی را نیز برای همانندسازی آن ارائه دادند و آن را همانندسازی نیمه‌ماندنی[4] نامیدند. بربنای این مدل، دو رشته پلی‌نوکلئوتیدی DNA از همدیگر باز می‌شوند و هر رشته به‌عنوان الگو برای سنتز رشته مکمل خود مورد استفاده قرار می‌گیرد. نوکلئوتیدهای مکمّلِ هر زنجیره در برابر آن ردیف می‌شوند و با دخالت آنزیم‌های مسئول همانندسازی، هر نوکلئوتیدها نیز پیوندهای فسفودی استری برقرار می‌گردد. به این ترتیب زنجیرهٔ مکمّلِ هر رشته از مولکول قبلی ایجاد می‌شود و در نتیجه از یک مولکول اولیه ضمن همانندسازی دو مولکول DNA جدید به وجود می‌آید که در هر مولکول یک زنجیره قدیمی (والدی) و زنجیره دیگر نوساخت است (شکل ۱۵-۳).

1- Arabidopsis thaliana
2- Dedifferanciation
3- DNA Replication
4- Semiconservative

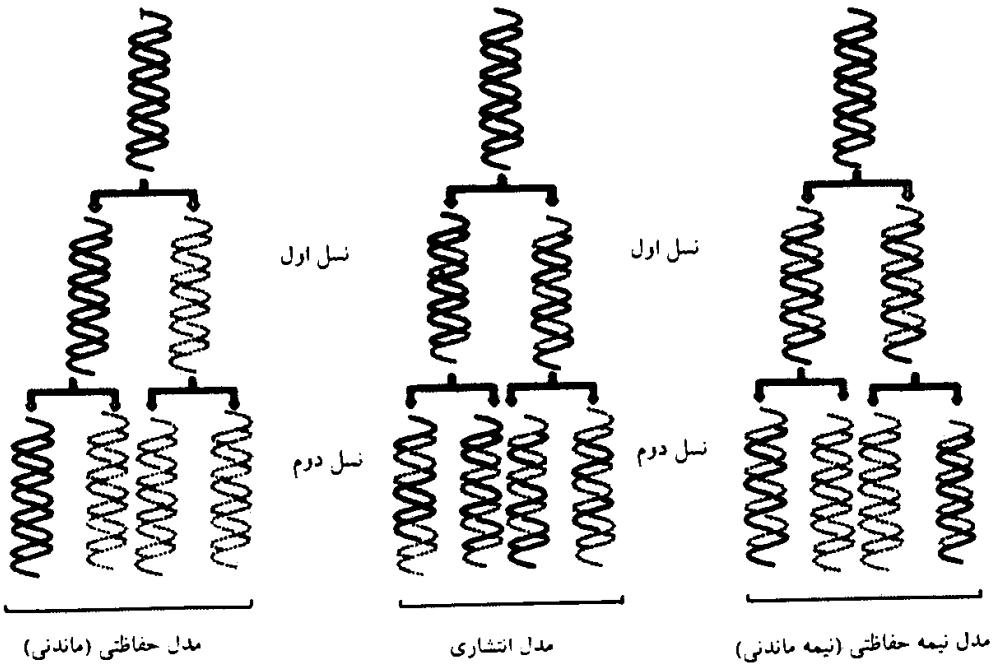
همانندسازی DNA فرآیندی پیچیده و دارای مراحل مختلف است، به آنزیم‌های مختلف نیاز دارد و گرچه اصول کلی آن در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها مشابه است اما تفاوت‌هایی نیز دارد. برای همانندسازی DNA سه روش احتمالی پیشنهاد شده است: نیمه‌ماندنی؛ ماندنی[1] و پراکنده[2] (شکل ۱۵-۴).

مسلسون[3] واستال[4] با تجربیات خود واقعیت حالت نیمه‌ماندنی را به اثبات رسانیدند. این محققان اشریشیاکولی را در محیط دارای ایزوتوپ سنگین ^{15}N (به جای ^{14}N) کشت دادند تا ضمن همانندسازی، ^{15}N در ساختمان DNA باکتری به کارگرفته شود و جرم آن افزایش یابد. DNAی دارای ^{15}N را می‌توان ضمن اولتراسانتریفوژ با شیب غلظت از DNAی دارای ^{14}N که سبکتر است جدا کرد. مسلسون و استال DNAی جداشده از باکتری‌ها را به مدت دو تا سه روز در دور خیلی زیاد در محلول یکنواخت کلرورسزیم (CsCl) سانتریفوژ کردند. ضمن اولتراسانتریفوژ، شیب غلظت بین مولکول‌هایی که به طرف ته‌لوله رسوب می‌کنند و مولکول‌هایی که به طرف بالا در انتشار هستند برقرار می‌شود و DNAی دارای ^{15}N و دارای ^{14}N در نواحی مختلفی از شیب غلظت شناور می‌مانند.

مسلسون و استال در تجربیات خود اجازه دادند باکتری‌ها برای زمان‌های مختلفی در محیط دارای ^{15}N رشد کنند و سپس به روشی که توضیح داده شد DNAی آنها را استخراج و مقایسه کردند. نتایج نشان داد: چنانچه باکتری‌ها تنها برای یک نسل در محیط دارای ^{15}N رشد کرده باشند DNAی آنها جرمی بیش از باکتری‌های اولیه دارد (DNA

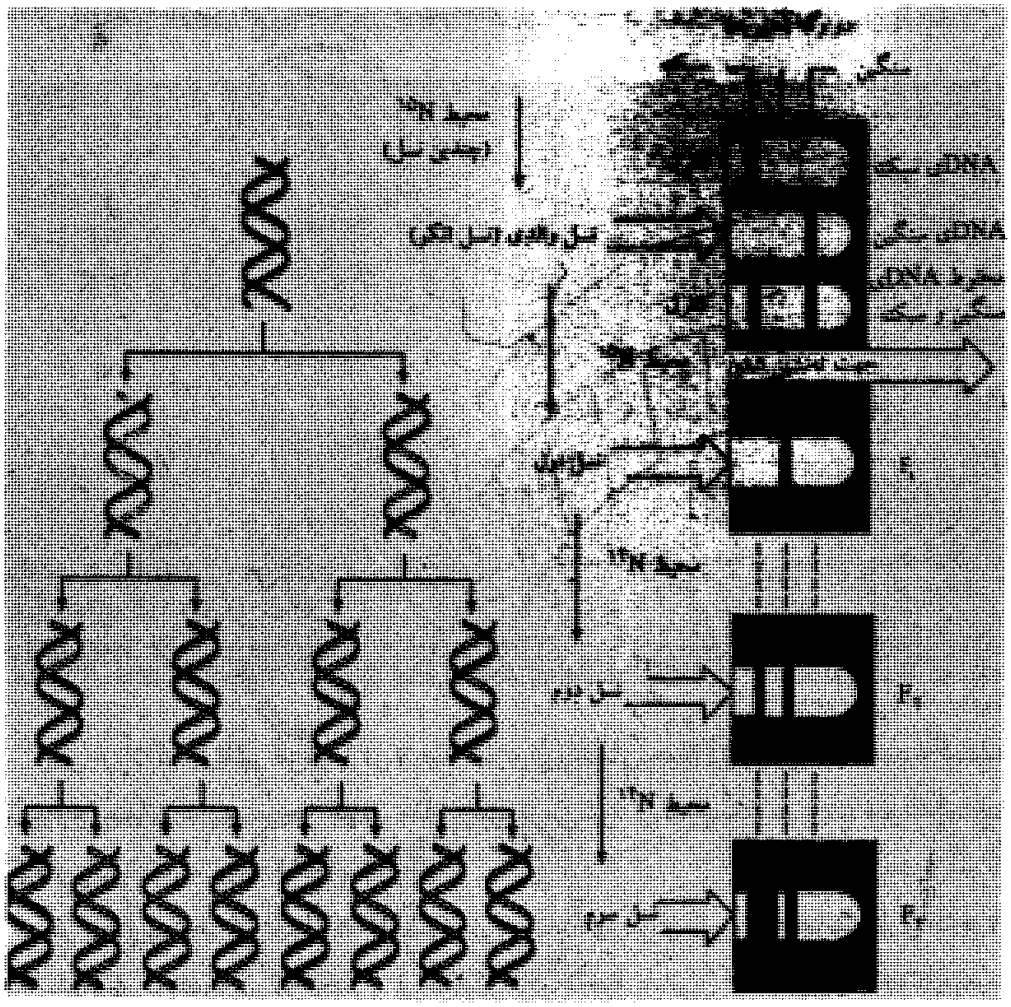


شکل ۱۵-۳. همانندسازی DNA نیاز به گسسته شدن پیوندهای هیدروژنی بین دو رشته پلی‌نوکلئوتیدی و جداشدن آنها دارد؛ هر رشته به‌عنوان الگو برای تشکیل مکمّل خود به کار گرفته می‌شود.



شکل ۱۵-۴. سه روش پیشنهادی برای همانندسازی مولکول DNA

1- Conservative 2- Dispersive 3- Meselson 4- Stahl



شکل ۱۵-۵. نتایج آزمایش مسلسون واستال و تجزیه و تحلیل آن

نیمه سنگین) و چنانچه برای مدتی برابر زمان دوبار چرخه یاخته‌ای در محیط دارای ^{15}N قرار گرفته باشند، حدود ۵۰٪ آنها دارای DNAی سنگین و ۵۰٪ دیگر دارای DNAی نیمه سنگین هستند. این نتایج، احتمال «ماندنی[1]» بودن همانندسازی DNA را نفی کرد زیرا اگر مولکول DNA به‌صورت کامل باقی می‌ماند و مولکول جدیدی از آن همانندسازی می‌شد، نمی‌بایستی DNA نیمه سنگین با جرم حد واسط بین DNA به اصطلاح سبک مربوط به باکتری‌های اولیه با ^{14}N و DNA سنگین مربوط به ۵۰٪ باکتری‌های نسل دوم ایجاد می‌شد (شکل ۱۵-۵).

همانندسازی نیمه‌ماندنی، در یوکاریوت‌ها نیز به وسیله تیلور[2]، وودز[3] و هیوز[4] به اثبات رسیده است. این محققان با استفاده از نشاندار کردن DNA در یاخته‌های مریستم ریشه باقلا به کمک تیمیدین تریسیوم‌دار (^{H3}T) نشان دادند که در نسل اول بعد از تأثیر ^{H3}T هر دو کرماتید کروموزوم‌های متافازی نشاندار شده‌اند.

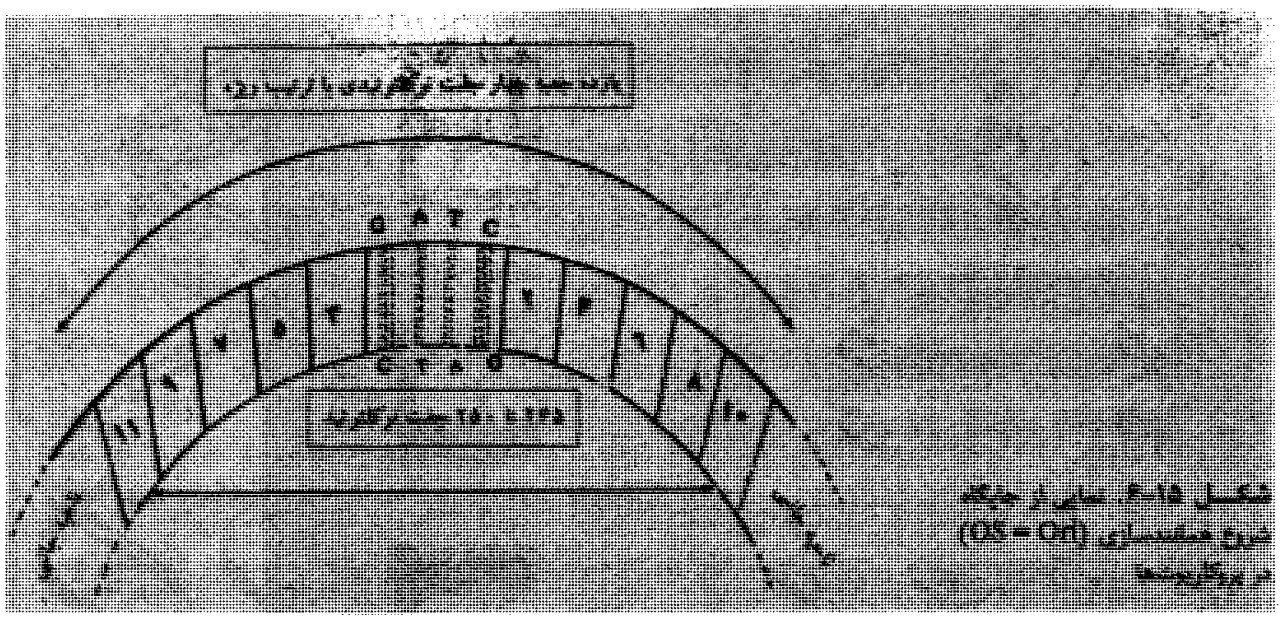
همانندسازی از محل یا محل‌های ویژه‌ای آغاز می‌شود

بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که همانندسازی DNA در پروکاریوت‌ها از یک ناحیه آغازی (Ori)[5] و در یوکاریوت‌ها از نواحی آغازی متعددی، شروع می‌شود.

در پروکاریوت‌ها ناحیه آغازی به اعتقاد بیشتر محققان در بخشی از DNA قرار دارد که با غشاء یاخته در ارتباط است. تصور می‌شود این ناحیه که وسعتی برابر حدود ۲۴۵ تا ۲۵۰ جفت نوکلئوتید دارد، واجد ترتیب‌های ویژه نوکلئوتیدی از جمله یازده تکرار از چهار نوکلئوتید GATC روی یک زنجیره و مکمّل‌های آن در زنجیره دیگر است

1- Cinservative 2- Taylor 3- Woods 4- Hugnes 5- Origin Site

(شکل ۱۵-۶) طرفین این ناحیه نیز ترتیب‌های نوکلئوتیدی ویژه‌ای دارند.



پس از آن که با تأثیر آنزیم‌ها در ناحیه آغازی پیوندهای هیدروژنی بین دو زنجیره گسسته شد، با دخالت DNA پلیمرازها همانندسازی در دو جهت مقابل شروع می‌شود و تا رسیدن به پایان مولکول حلقوی (بسته) DNAی پروکاریوتی پیش می‌رود (شکل ۱۵-۷).

در یوکاریوت‌ها مولکول DNA نواحی متعددی برای شروع همانندسازی دارد (OS) که از هر ناحیه، همانندسازی به صورتی دو جهتی تا رسیدن به دو ناحیه پایانی[1] ادامه می‌یابد. هر ناحیه مستقل همانندسازی در DNAی یوکاریوتی را یک «رپلیکون یا رپلیکان[2]» نامند (شکل ۱۵-۸). امکان همانندسازی همزمان در تعدادی از رپلیکون‌ها وجود دارد اما همه رپلیکون‌هایِ هر مولکولِ DNA به اجبار همانندسازی همزمان ندارند.

بررسی‌های انجام شده به کمک خودپرتونگاری (اتورادیوگرافی) وجود یک ناحیه شروع همانندسازی در DNA پروکاریوتی و وجود رپلیکون‌های زیاد در مولکول DNA یوکاریوتی را تأیید کرده است. هر رپلیکون حدود ۳۰ میکرومتر طول و ۲۰ تا ۳۰ هزار جفت نوکلئوتید دارد. در ژنوم هاپلوئیدی یک یاخته پستانداران حدود ۳۰۰۰۰ رپلیکون وجود دارد. هر کروموزوم می‌تواند تا چندهزار رپلیکون داشته باشد که در هر کدام همانندسازی دو جهتی است.

از آنجا که DNA پروکاریوتی دارای یک ناحیه شروع همانندسازی است و از این ناحیه، همانندسازی به‌صورت دو جهتی تا رسیدن به دو بخش انتهایی مولکول ادامه می‌یابد، می‌توان تمامی مولکول DNA پروکاریوتی را در حکم یک رپلیکون به حساب آورد.

تعداد واحدهای همانندسازی به وسیله مدت زمان نموّ کنترل می‌شود.

چرخهٔ یاخته‌ای در مراحل ابتدای تسهیم یاخته تخم بسیار سریع است و بلاستومرها بدون رشد، پی‌درپی تقسیم می‌شوند. در این موقع مرحلهٔ S بیش از حد معمول طولانی است. یکی از مثال‌های مناسب برای بیان مطلب، گونهٔ Triturus cristatus است که در آن مرحله S در یاخته‌های بلاستولا یک ساعت، در یاخته‌های پیکری ۲۰ ساعت و در یاخته‌های اسپرماتوگنی قبل از میوز، ۲۰۰ ساعت است. اختلاف در طول مدت مرحله S نتیجه تغییر در تعدادِ نواحی شروع همانندسازی است. یاخته‌های اولیهٔ در حالِ تسهیم، نواحی شروع همانندسازی زیادی دارند در حالی

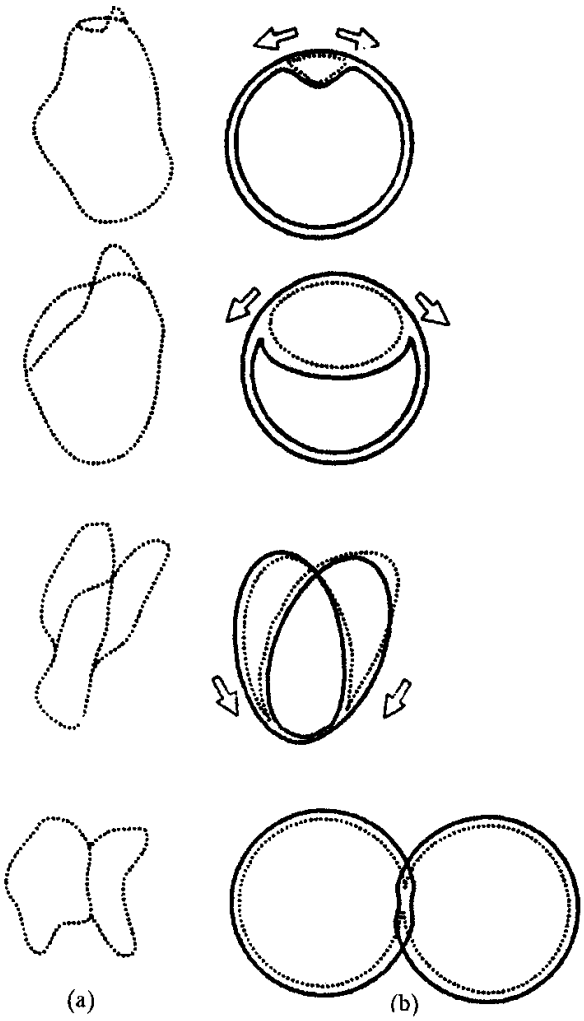
1- Terminal Zone 2- Replicon

که تعداد رپلیکون‌ها در تمام کروموزوم‌های یاخته‌های اسپرماتوگنی در مرحله قبل از میوز به‌طور قابل توجهی کاهش دارد.

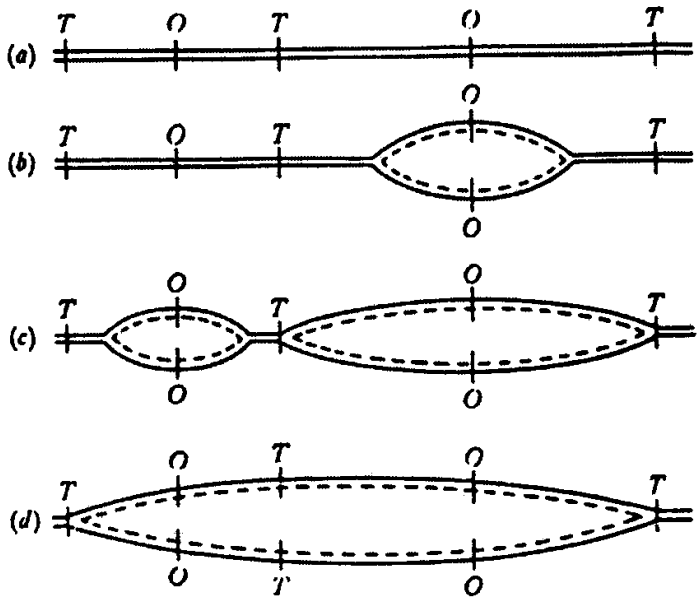
مگس سرکه مثال مشابه دیگری است که در آن مرحلهٔ S در هسته‌های رویانی ۳ تا ۴ دقیقه است در حالی که در یاخته‌های پیکری بالغ به ۶۰۰ دقیقه می‌رسد. یاخته‌های در حال تسهیم در فاصله هر ۲ تا ۳ میکرومتر روی DNA خود دارای یک ناحیه شروع همانندسازی هستند در حالی که این فاصله در یاخته‌های بالغ خیلی بیشتر است.

روشن است که تعداد زیادی از نواحی شروع همانندسازی در یاخته‌های رویانی، در یاخته‌های بالغ مورد استفاده قرار نمی‌گیرند. تصور می‌شود این وضع به تشکیل کروموزوم‌ها وابسته است که هر یک دارای مقداری کروماتین متراکم است که در آن، نواحیِ جایگاه‌های شروع همانندسازی فعال نیستند.

همانندسازی با دخالت پروتئین‌های گوناگون، آنزیم‌های متفاوت و مولکول‌های تأمین‌کننده انرژی انجام می‌شود. قبل از شرح و مراحل و چگونگی همانندسازی، نقش پروتئین‌ها و آنزیم‌ها را در این پدیده به اجمال بررسی می‌کنیم.



شکل ۱۵-۷. تجسمی از ناحیه آغاز همانندسازی و همانندسازی دو جهتی در پروکاریوت‌ها. a) اثر برجای مانده به وسیله نوکلئوتیدهای رادیواکتیو بر روی امولسیون خود پرتونگاری. b) تفسیر نمایی شکل‌های گرفته شده (زنجیرهٔ جدید به‌صورت نقطه چین مشخص شده است).

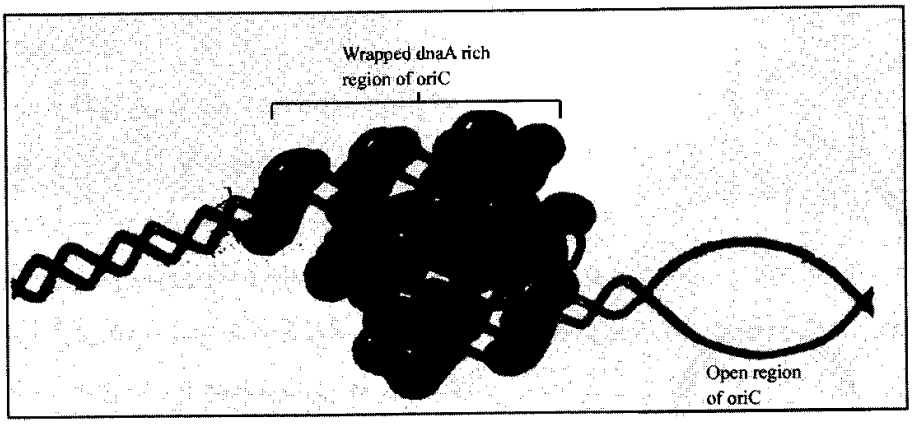


شکل ۱۵-۸. نمایشی از وجود رپلیکون‌های (نواحی مستقل همانندسازی) متعدد در DNA یوکاریوتی هر رپلیکون دارای یک ناحیه شروع «O» و دو ناحیه پایانی T است. در هر رپلیکون همانندسازی دو جهتی است (پیکان‌ها). a) دور پلیکون مجاور قبل از همانندسازی. b) همانندسازی در رپلیکون سمت راست آغاز شده است. c) همانندسازی در رپلیکون سمت چپ آغاز شده است. d) همانندسازی در دو رپلیکون پایان یافته است (برگرفته از کارهای Huberman و همکاران، ۱۹۶۸).

نقش پروتئین‌ها در همانندسازی DNA

الف: پروتئین DNaA یا A پروتئین

همان گونه که شرح داده شد در پروکاریوت‌ها همانندسازی DNA از ناحیهٔ ویژه‌ای از ژنوم که آن را ناحیه آغازی (Ori = OS) می‌نامند شروع می‌شود. بررسی‌های انجام شده در اشریشیاکولی نشان می‌دهد که شناسانیدن ناحیه آغازی به آنزیم‌های همانندسازی به عهده پروتئین DNaA است که به ناحیه آغازی متصل می‌شود، این پروتئین چهار بخشی (تترامر) است و وزن مولکولی آن ۵۰KD می‌باشد. پس از آن که DNaA محل شروع همانندسازی را شناسایی کرد، به آن می‌چسبد. به‌طور معمول حدود ۲۰ تا ۳۰ مولکول DNaA به ناحیه آغازی همانندسازی می‌چسبند و DNA را دور خود می‌پیچانند و شکلی شبیه نوکلئوزوم را به وجود می‌آورند (شکل ۱۵-۹).



شکل ۱۵-۹. چسبیدن مجموعه‌ای از پروتئین‌های DNaA به ناحیهٔ آغازی همانندسازی و تشکیل ساختمانی شبیه به نوکلئوزوم.

هر کدام از انواع باکتری‌ها، پروتئین مشابه با پروتئین DNaA دارند که شناسایی و شناساندن ناحیه آغازی همانندسازی را برعهده دارد. پروتئین DNaA در فرآیندهای سنتز DNA دخالتی ندارد و با باز شدن دو زنجیر DNA و شروع همانندسازی، از DNA جدا می‌شود. به‌طور کلی اتصال پروتئینی خاص مثل DNaA به ناحیه شروع همانندسازی، در هدایت سایر پروتئین‌ها به این ناحیه و شروع همانندسازی مؤثر است.

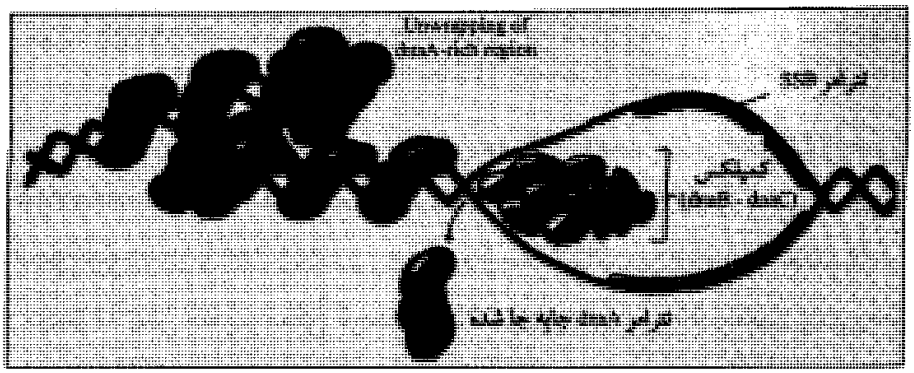
ب: پروتئین‌های DNaB و DNaC

پس از اتصال، نشانه گذاری و باز شدن ناحیه آغازی به وسیله DNaA، این ناحیه به وسیله دو پروتئین دیگر شناسایی می‌شود که عبارتند از: DNaB و DNaC. DNaB مولکولی دارای شش بخش است (هگزامر) و وزن مولکولی آن ۳۳۰KD می‌باشد؛ خاصیت هلیکازی دارد و می‌تواند پیچش‌های DNA را باز کند. فعالیت هلیکازی DNaB به احتمال در به وجود آوردن چنگال همانندسازی[1] دخالت دارد (به ترتیبی که شرح داده خواهد شد، محلی را که در آن با دخالت پروتئین‌ها و آنزیم‌ها، پیوندهای هیدروژنی بین دو زنجیره DNA گسسته شده و همانندسازی جریان دارد، چنگال همانندسازی نامند). تعداد مولکول‌های DNaB را در هر سلول باکتری حدود ۲۰ مولکول حدس می‌زنند. DNaC پروتئینی یک بخشی است که وزن مولکولی ۲۹KD دارد. شش مولکول آن در حضور ATP با یک مولکول DNaB تشکیل یک مجموعه را می‌دهند که ناحیهٔ آغازی همانندسازی را باز می‌کنند و در بین دو رشته DNA قرار می‌گیرند. این کار موجب جدا شدن دو رشته از یکدیگر می‌شود. با این عمل شرایط برای عمل پروتئین‌های دیگری که بایستی در همانندسازی دخالت کنند، فراهم می‌گردد. از جمله پروتئین‌ها SSBP[2]ها یعنی پروتئین‌های متصل شونده به یکی از دو زنجیرهٔ DNA هستند. تصور می‌شود که پروتئین‌های DNaB و DNaC در

1- Replication Fopk

2- Singel Stranded Binding Proteins

تشکیل یک مجموعه بزرگ پروتئینی - آنزیمی که آن را پریموزوم می‌نامند سهیم هستند (شرح پریموزوم در صفحات بعد آمده است). ژن‌های مسئول تشکیل این پروتئین‌ها در E.Coli شناسایی شده و آنها را با dnac و dnab نشان می‌دهند (شکل ۱۵-۱۰).



شکل ۱۵-۱۰. فعالیت هلیکاری DNaB که موجب باز شدن پیچش‌های DNA می‌شود. اتصال پروتئین‌های SSBP به هر یک از دو زنجیره باز شده از اتصال دوباره آنها جلوگیری می‌کند.

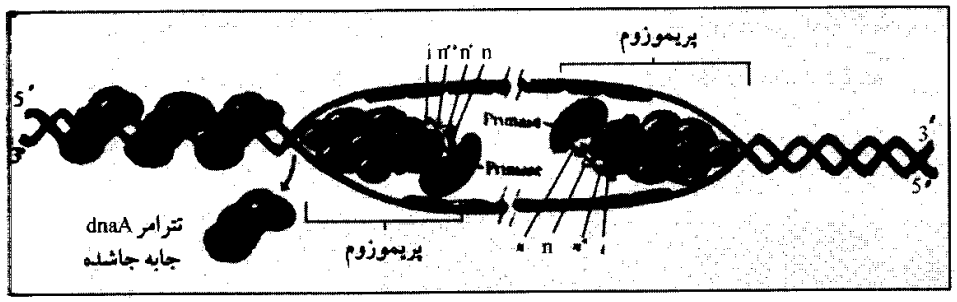
پروتئین‌های SSB(SSBP)

بی‌تردید پس از باز شدن دو زنجیره DNA، به خاصیت خودآرایی دو زنجیره تمایل به اتصال مجدد و بازگشت به وضع اول را دارند مگر آن که عواملی از اتصال آنها جلوگیری کند، این ممانعت به وسیله پروتئین‌های SSBP انجام می‌شود. این پروتئین‌ها تنها به رشته‌های باز شده (منفرد) می‌چسبند. در پروکاریوت‌ها این پروتئین‌ها به حالت چهار بخشی (تترامر) عمل می‌کنند، هر مونومر آنها وزن مولکولی حدود ۱۸KD دارد و بنابراین وزن مولکولی تترامر آنها حدود ۷۲KD دالتون می‌شود. در یوکاریوت‌ها پروتئین‌های SSBP به حالت سه بخشی (تریمر) عمل می‌کنند مونومرها وزن مولکولی یکسانی ندارند (۱۰، ۳۵، ۷۰کیلو دالتون) و وزن مولکولی تریمر به حدود ۱۱۰ تا ۱۱۵KD می‌رسد. هر تترامر آنها در پروکاریوت‌ها با پوشانیدن ۳۲ نوکلئوتید مانع دو رشته‌ای شدن دوباره بخش‌های باز شده دو زنجیره می‌شود. اتصال این پروتئین‌ها از نوع تعاونی است و اتصال اولین تترامر موجب سهولت اتصال تترامرهای بعدی به هر زنجیره DNA می‌شود. حضور چندین مولکول SSBP روی هر رشته DNA میزان فعالیت آنزیم‌های DNA پلیمرازی را به حداکثر می‌رساند. پروتئین‌های SSB را پروتئین‌های ناپایدارکننده مارپیچ[1] نیز می‌نامند. این پروتئین‌ها علاوه‌بر آن که از پیوستن دو زنجیرهٔ باز شده مولکول DNA ممانعت می‌کنند، از پیوند نوکلئوتیدهای هر زنجیره و تشکیل حلقه‌های پنسی[2] نیز جلوگیری می‌نمایند.

پریموزوم و پریماز[3]

پس از باز شدن دو رشته DNA و پایدار شدن آنها به وسیله SSBP، مجموعه پروتئینی بزرگی با وزن مولکولی حدود ۷۰۰KD به محل شروع همانندسازی می‌چسبد این مجموعه از آنزیم پریماز یا DNaG (آنزیم تولیدکننده بخش کوچک RNAای در شروع همانندسازی به اسم RNA آغازگر) و پروتئین‌های وابسته به آن یعنی پروتئین‌های n، n´، n″ و i می‌باشد. این پروتئین‌ها در انجام بهتر عمل پریماز مؤثر هستند. مجموعه این پروتئین‌ها و پریماز را که در شروع همانندسازی دخالت دارند، بر روی هم پریموزوم نامند. پریماز و پروتئین‌های وابسته به آن، شرایط را برای عمل آنزیم‌های اصلی همانندسازی یعنی DNA پلیمرازها، آماده می‌کنند (شکل ۱۵-۱۱).

1- Helix destablishing Proteins 2- Hairpin Loops 3- Primosome and Primase



شکل ۱۵-۱۱. جایگزینی پریموزوم (پریماز و پروتئین‌های وابسته به آن:n، n´، n″، i) در محل شروع همانندسازی DNA.

با دیدهای کنونی پریموزوم را دارای هفت زیرواحد اصلی پروتئینی می‌دانند: n، n´، n″، DNaB، DNaC، DNaT(i) و DNaG. مجموعه شش جزء اول (به جز DNaG) را بر روی هم پیش آغازگر[1] گویند. این مجموعه در محل ویژه‌ای از DNA که به‌صورت سنجاق سر[2] درآمده و دارای ۵۵ جفت باز است مجتمع می‌شوند. پس از این که مجموعه پیش آغازگر شکل گرفت، DNaG یا پریماز می‌تواند زنجیره پیشرو در همانندسازی را شناسایی کند و شروع به ساختن RNA کوچک مولکول اولیه در شروع همانندسازی یعنی RNA آغازگر نماید (به‌طوری که خواهیم دید این RNA آغازگر در ابتدای هر قطعه از قطعات کوچک DNAای به نام قطعات اُکازاکی[3] که ضمن همانندسازی زنجیرهٔ پیروِ DNAای تشکیل می‌شوند نیز وجود دارد).

پروتئین n´ با وزن مولکولی ۵۵KD به‌صورت تک بخشی (مونومر) و تعداد آن در سلول حدود ۸۰ مولکول است. این پروتئین مسئول شناسایی محلی است که اجزای مجموعه پیش آغازگر بایستی در آنجا اجتماع کنند. پروتئین n´ فعالیت هلیکازی وابسته به ATP نیز از خود نشان می‌دهد، همچنین وظیفه مهم دیگری به عهده دارد و آن این است که می‌تواند SSBPها را از DNA جدا کند. این توانایی برای حرکت مجموعه پیش آغازگر و پریماز و ادامه روند همانندسازی اهمیت زیادی دارد. پریموزوم در جهتی که دو رشته DNA از هم باز می‌شوند، حرکت می‌کند، منطقه دو رشته منفرد را به وجود می‌آورد و شرایط را برای اتصال SSBPها و آنزیم‌های مسئول همانندسازی فراهم می‌کند.

پریماز یا DNaG پلی‌پپتیدی منفرد با وزن مولکولی ۶۰KD است. در هر سلول حدود ۷۵ مولکول آن وجود دارد. پریماز محصول ژن dnaG است و به آن پروتئین DNaG نیز گفته می‌شود. پریماز را نوعی RNA پلیمراز در نظر می‌گیرند که تنها می‌تواند بخش‌های کوچک RNAای به نام RNA آغازگر، که دارای ۳-۴ تا ۱۰-۱۵ نوکلئوتید هستند را رونویسی کند و با این عمل خود سر ۳´OH آزاد لازم برای عمل DNA پلیمرازها را به وجود آورد و به این گروه آنزیمی بسپارد. قابل ذکر است که RNA پلیمراز هم می‌تواند RNA آغازگر راسنتز کند و شرایط را برای ادامه عمل DNA پلیمرازها در همانندسازی فراهم نماید. این پدیده بیشتر در پروکاریوت‌ها و در همانندسازی پلاسمیدها دیده شده است. از ۵۵۵ جفت باز قبل از نقطهٔ آغاز همانندسازی، با عمل RNA پلیمراز، تشکیل RNA آغازگر که در این جا تعداد نوکلئوتیدهای زیادی دارد، شروع می‌شود؛ RNaseH در نقطهٔ آغاز همانندسازی، RNA رونویسی شده را برش می‌دهد. این عمل موجب می‌شود که انتهای ۳´OH، RNAی رونویسی شده، به‌عنوان آغازگر برای آغاز سنتز DNA مورد استفاده قرار گیرد.

پروتئین rep[4]

پروتئینی یک بخشی با وزن مولکولی ۶۵۰۰۰ دالتون است که نقش آن باز کردن مارپیچ DNA است و در واقع

1- prepriming 2- Hairpin 3- Okazaki fragments 4- Replicated Proteins

یک هلیکاز است که عملی شبیه به DNaB اما با سرعتی بسیار بیشتر دارد. اگر در شروع همانندسازی سرعت بازشدن مارپیچ DNA اهمیت چندانی ندارد اما وقتی DNA پلیمرازها عمل خود را شروع می‌کنند، بایستی سرعت باز شدن پیچش‌ها با سرعت همانندسازی متناسب باشد. در این هنگام چون سرعت باز شدن پیچش‌ها به وسیله پروتئین DNaB کم است، دخالت پروتئین rep برای همانندسازی سریع لازم می‌باشد. از آنجا که پروتئین rep دارای نقش هلیکازی قوی می‌باشد به‌طور معمول آن را جزء آنزیم‌های دخالت‌کننده در همانندسازی قرار می‌دهند.

آنزیم‌های دخالت‌کننده در همانندسازی DNA

۱- آنزیم‌های که در رهایی DNA از شبیه هیستون‌ها در پروکاریوت‌ها و رهایی DNA از هیستون‌ها در یوکاریوت‌ها در شروع همانندسازی دخالت می‌کنند عبارتند از متیلازها، استیلازها، فسفریلازها که با متیلاسیون، استیلاسیون یا فسفریلاسیون بر روی پروتئین‌های شبه هیستونی یا هیستونی و گاهی بر روی بازهای مولکول DNA موجب گسسته شدن پیوندهای الکتروستاتیکی بین DNA با این پروتئین‌ها می‌شوند و به این ترتیب اتصال DNA با این پروتئین‌ها را سست می‌کنند. در این واکنش‌ها، عامل متیل، استیل یا فسفات با مولکول‌های پروتئینی ترکیب می‌شود و مانع اتصال آنها با DNA می‌گردد (میل ترکیبی این عوامل با پروتئین‌ها بیشتر است تا با DNA). در پیری سنتز این گروه از آنزیم‌ها کاهش می‌یابد و به دنبال آن اعمال متیلاسیون، استیلاسیون و فسفریلاسیون نیز کم می‌شود که خود یکی از عوامل مؤثر در کاهش همانندسازی (و به ویژه رونویسی) ماده ژنتیکی است.

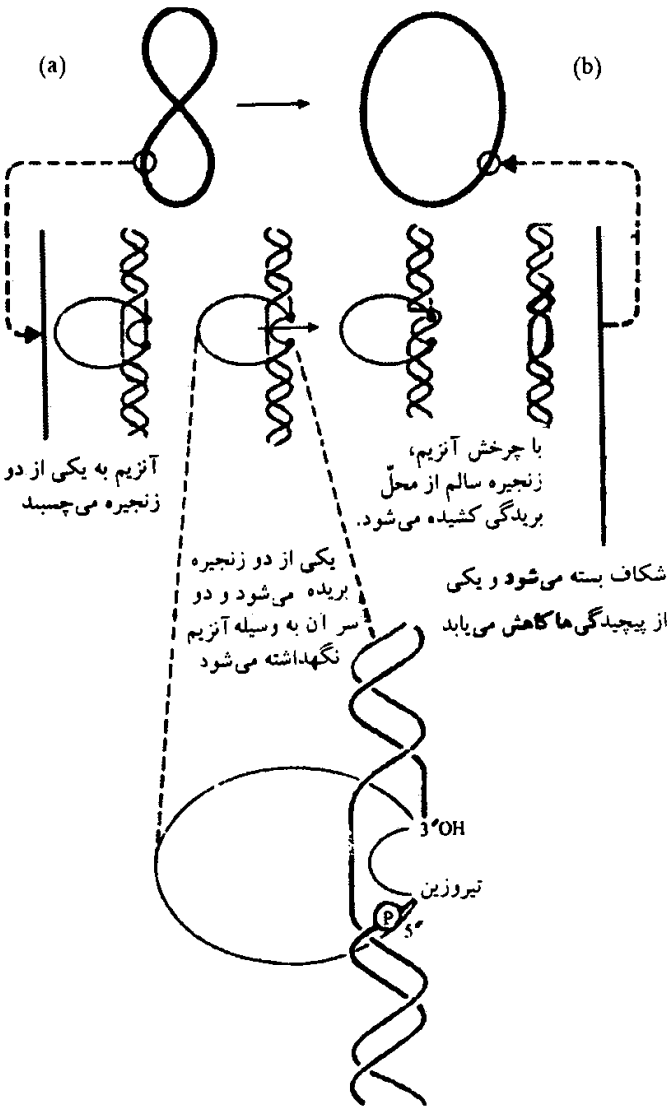
۲- **توپوایزومرازها**[1]. این آنزیم‌ها برای تشخیص موقعیت فضایی مولکول DNA، باز کردن مارپیچ مضاعف و حتی گسستن پیوندهای هیدروژنی در ابتدای همانندسازی دخالت می‌کنند و با نقش خود شکل و آرایش فضایی DNA را برای همانندسازی مناسب می‌سازند. عمل توپوایزومرازها اساساً ایجاد حالت مناسب[2] برای همانندسازی و نیز به نحوی که در بحث رونویسی خواهیم دید برای رونویسی DNA می‌باشد.

برخی از توپوایزومرازها فقط اَبَر مارپیچ منفی را حذف می‌کنند، برخی بر روی مارپیچ‌های مثبت و منفی اثر می‌گذارند و برخی نیز می‌توانند اَبَر مارپیچ منفی ایجاد کنند. توپوایزومرازها را به حسب چگونگی عملشان به دو گروه تقسیم می‌کنند:

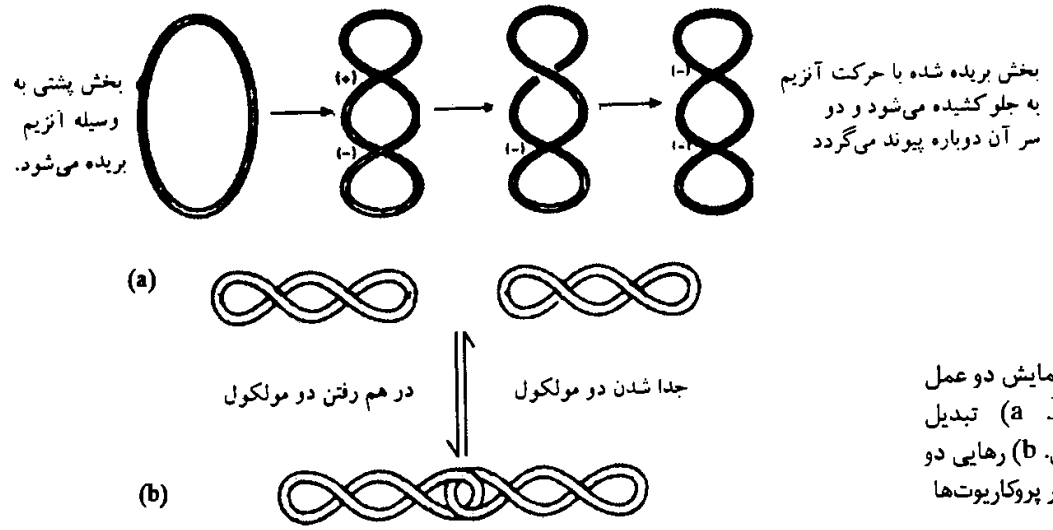
الف - توپوایزومراز I: اولین توپوایزومرازی است که در E.Coli کشف شد و در گذشته آن را پروتئین اُمگا(ω) می‌نامیدند. این آنزیم تنها یک رشتهٔ DNA را برش می‌دهد. در پروکاریوت‌ها تنها بر روی ابر مارپیچ منفی و در یوکاریوت‌ها بر روی ابر مارپیچ منفی و مثبت اثر دارد. در E.Coli محصول ژن toPA است و ابرمارپیچ منفی را به حالت استراحت (عادی) در می‌آورد. وقتی توپوایزومراز I به یک رشتهٔ مولکول DNA می‌چسبد، تشکیل یک مجموعهٔ پایدار را با DNA می‌دهد؛ برشی در آن رشته ایجاد می‌کند، انتهای ´۵ - فسفات بخش بریده شده DNA به‌صورت کووالانسی به تیروزین موجود در آنزیم متصل می‌شود. سپس این مجموعه می‌چرخد و رشته سالم را از میان رشته بریده شده می‌گذارند و دوباره قسمت بریده شده را به‌هم پیوند می‌دهد و با این عمل خود تعداد حلقه‌ها را در مارپیچ منفی یکی کاهش می‌دهد. توپوایزومراز I برای عمل خود نیاز به ATP ندارد زیرا انرژی پیوندها (پیوند دی‌فسفواستری رشته DNA با تیروزینِ آنزیمی و برگشت دوباره پیوند) بین واکنش‌های انتقال حفظ می‌شود. شکل ۱۵-۱۲ الف و ب نمایی از طرز عمل توپوایزومراز I را نشان می‌دهد.

1- Topoisomerases 2- Relax forme

ب - ***توپوایزومراز Π***. این آنزیم نیز اولین بار در E.Coli کشف شد و آن را ژیراز[1] (در تلفظ انگلیسی گایریز) نیز می‌نامند. این آنزیم هر دو رشته مولکول DNA را می‌برد، با چرخش خود و چرخانیدن زنجیره‌ها از میان محل بریدگی عبور می‌کند و پس از کاهش میزان پیچیدگی دوباره محل بریدگی دو زنجیره را پیوند می‌زند و با این عمل ابرمارپیچ مثبت را به منفی یا به حالت استراحت (عادی) تبدیل می‌کند. توپرایزومراز Π برای عمل خود به مصرف ATP نیاز دارد. این آنزیم دارای دو جزء است که یکی از آنها با محل بریدگی زنجیره‌های DNA پیوند کووالانسی برقرار می‌کند و جزء دیگر نقش ATP – ase‌ی دارد و تولید انرژی از ATP برای تغییر ابرمارپیچ را عهده‌دار است. عمل مهم دیگر توپوایزومراز Π در پروکاریوت‌ها خارج کردن دو مولکول دو زنجیره‌ای DNA از یکدیگر در پایان همانندسازی مولکول DNA است. شکل ۱۵-۱۳ a و b نمایی از دو عمل توپوایزومراز Π را نشان می‌دهد. شکل ۱۵-۱۴ نیز نمایی دیگری از عمل

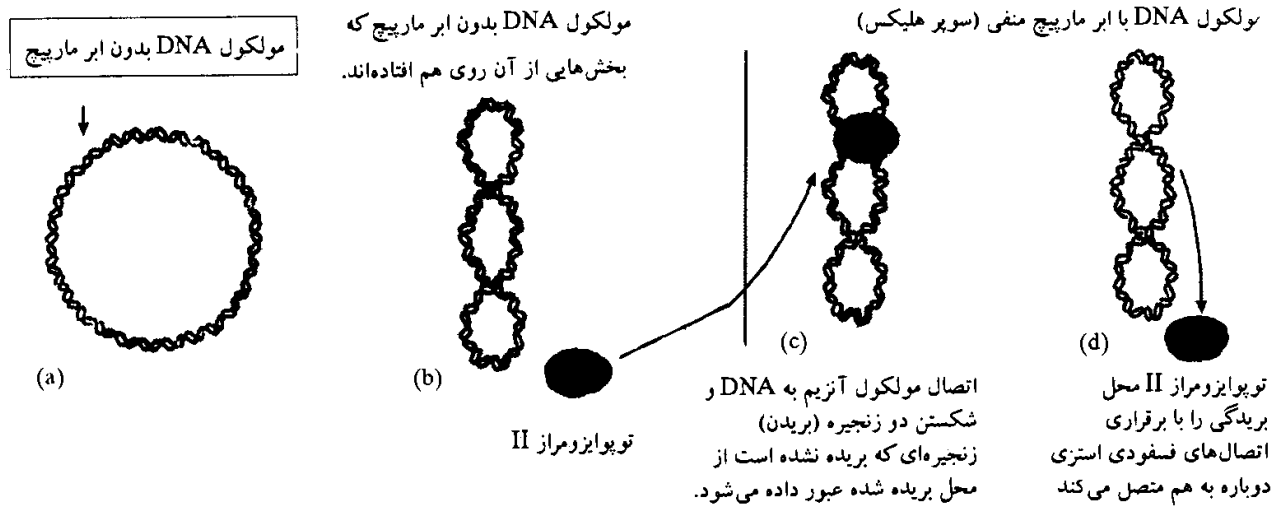


شکل ۱۵-۱۲. a) طرز عمل آنزیم توپوایزومراز I. b) کاهش تعداد حلقه‌های DNA توسط توپوایزومراز I



شکل ۱۵-۱۳. نمایش دو عمل متفاوت توپوایزومراز Π. a) تبدیل ابرمارپیچ مثبت به منفی. b) رهایی دو DNA مولکول بسته در پروکاریوت‌ها

1- Gyrase



شکل ۱۵-۱۴. طرز عمل توپوایزومراز II برای تبدیل ابرمارپیچ مثبت به منفی

توپوایزومراز II در تبدیل ابرمارپیچ مثبت به منفی است.

در باسیل‌کولی توپوایزومراز I و II به مقدار برابر وجود دارند زیرا بر روی ابرمارپیچ‌های DNA عملی عکس یکدیگر دارند. اگر جهشی در ژن یکی از این آنزیم‌ها اتفاق افتد و بر مقدار آن اثر بگذارد، تعادل ابرمارپیچ‌های DNA به‌هم می‌خورد.

توپوایزومراز II در سلول‌های یوکاریوتی از جمله در سلول‌های مگس سرکه و پستانداران شناخته شده است. گرچه عمل اصلی توپوایزومرازها مناسب‌کردن شکل و موقعیت فضایی DNA برای شروع همانندسازی یا رونویسی است اما گاهی ممکن است موجب گسسته شدن پیوندهای هیدروژنی در حدّ دو یا سه جفت نوکلئوتید شوند؛ این نقش فرعی و موقتی است و تا وارد عمل شدن هلیکازها ادامه می‌یابد.

هلیکازها[1]

هلیکازها آنزیم‌هایی هستند که مسئول باز کردن مارپیچ DNA از راه گسستن پیوندهای هیدروژنی بین دو زنجیره هستند. همراه پروتئین‌های ساختمانی مثل DNaB عمل خود را انجام می‌دهند. هلیکازها برای عمل خود نیاز به انرژی دارند که از هیدرولیز ATP تأمین می‌کنند. برای گسستن پیوندهای هیدروژنی بین هر جفت باز نوکلئوتیدی اعم از سیتوزین - گوانین یا آدنین - تیمین دو مولکول ATP مصرف می‌کنند.

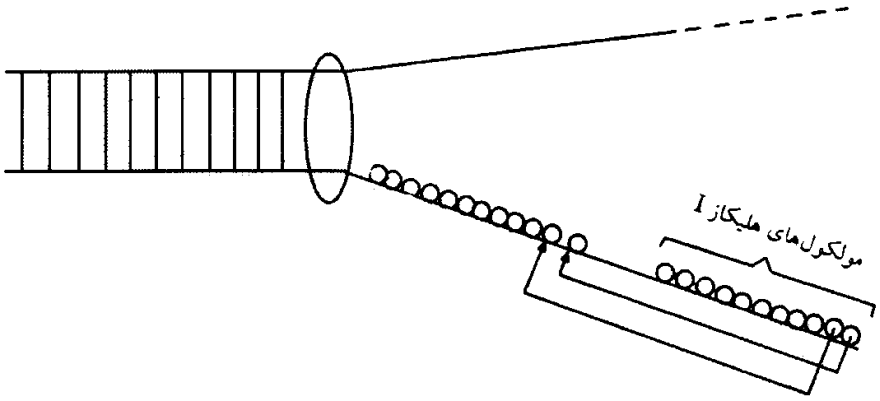
سه گروه هلیکاز در یاخته‌ها شناخته شده‌اند که عبارتند از هلکیاز I، II و III.

هلیکازها در محل عمل خود با DNA دارای یک یا دو ناحیه اتصال هستند، اغلب در محلی که قبلاً با دخالت توپوایزومرازها تعدادی از پیوندهای هیدروژنی باز شده‌اند، عمل خود را آغاز می‌کنند، البته می‌توانند در بخش‌هایی نیز که پیوندهای هیدروژنی بین دو زنجیره گسسته نشده‌اند، عمل نمایند.

هلیکاز I: به حالت چندین مولکولی عمل می‌کند و روی یک رشته DNA طرز حرکتی شبیه حرکت چرخ تانک در زنجیره جای چرخ دارد به این ترتیب که اغلب حدود ۹ تا ۱۰ مولکول آنزیم روی یک زنجیره (زنجیره پیرو) پشت‌سرهم می‌چسبند و به سمت محل چنگال همانندسازی به این ترتیب جابه‌جا می‌شوند که، دورترین مولکول آنزیم به محل انتهای چنگال همانندسازی از رشته DNA جدا می‌شود به قسمتی جلوتر می‌آید و دوباره به زنجیره

1- Helicases

DNA متصل می‌شود، به دنبال آن مولکول‌های بعدی نیز از رشته DNA جدا می‌شوند و یکی پس از دیگری در محلی جلوتر به رشته DNA متصل شده، پیوندهای هیدروژنی را باز می‌کنند (شکل ۱۵-۱۵).



شکل ۱۵-۱۵. نمایی از جدا شدن ترتیبی مولکول‌های هلیکاز I و ردیف شدن آنها در بخشی نزدیک‌تر به چنگال همانندسازی برای گسستن پیوندهای هیدروژنی بین دو زنجیره.

هلیکاز I دو عمل دارد، یکی گسستن پیوندهای هیدروژنی بین دو زنجیره و دیگری ممانعت از برقراری مجدد پیوندهای هیدروژنی بین دو زنجیره. گسستن پیوندهای هیدروژنی نیاز به ATP دارد ولی ممانعت از اتصال دو زنجیره بدون نیاز به ATP و در نتیجهٔ اتصال هلیکاز I بر روی یکی از رشته‌های DNA انجام می‌شود.

هلیکاز II: هلکیاز T_4 نیز نامیده می‌شود. عمل این آنزیم در فاژ T_4 شناخته شده است. عملی مشابه هلیکاز I دارد. هر یک از هلیکازهای I و II دو یا سه جفت باز را از یکدیگر جدا می‌کنند و عمل آنها پایان می‌یابد.

هلیکاز III: آنزیمی منفرد است که کلیهٔ پیوندهای هیدروژنی بین دو زنجیره را در مسیر خود باز می‌کند و به جلو می‌رود. چون این آنزیم منفرد است، دو زنجیره باز شده بایستی به نحوی از یکدیگر جدا بمانند. پروتئین‌های rep[1] با چسبیدن بر روی هر تک زنجیره از اتصال دوباره آنها در ناحیه همانندسازی جلوگیری می‌کنند. اتصال و گسستن این پروتئین‌ها نیاز به انرژی ندارد. در پروکاریوت‌ها احتمالاً تعداد این پروتئین‌ها چهار عدد است. در یوکاریوت‌ها نیز با وارد شدن آنزیم‌های شرکت‌کننده در عمل همانندسازی، این پروتئین‌ها از DNA جدا می‌شوند. جداشدن دو رشته توسط هلکیاز III با سرعتی حدود ۱۰۰۰ باز در ثانیه انجام می‌شود.

گاهی هلیکازها را به دو گروه کلی تقسیم می‌کنند یکی rep پروتئین‌ها که بر روی زنجیره پیشرو (راهبر) فعالیت می‌کنند و دیگری هلیکازهای دیگر که به همراه پریماز بر روی زنجیره پیرو (راهرو) عمل می‌کنند. با این دید rep پروتئین‌ها نوعی هلیکاز منظور می‌شوند.

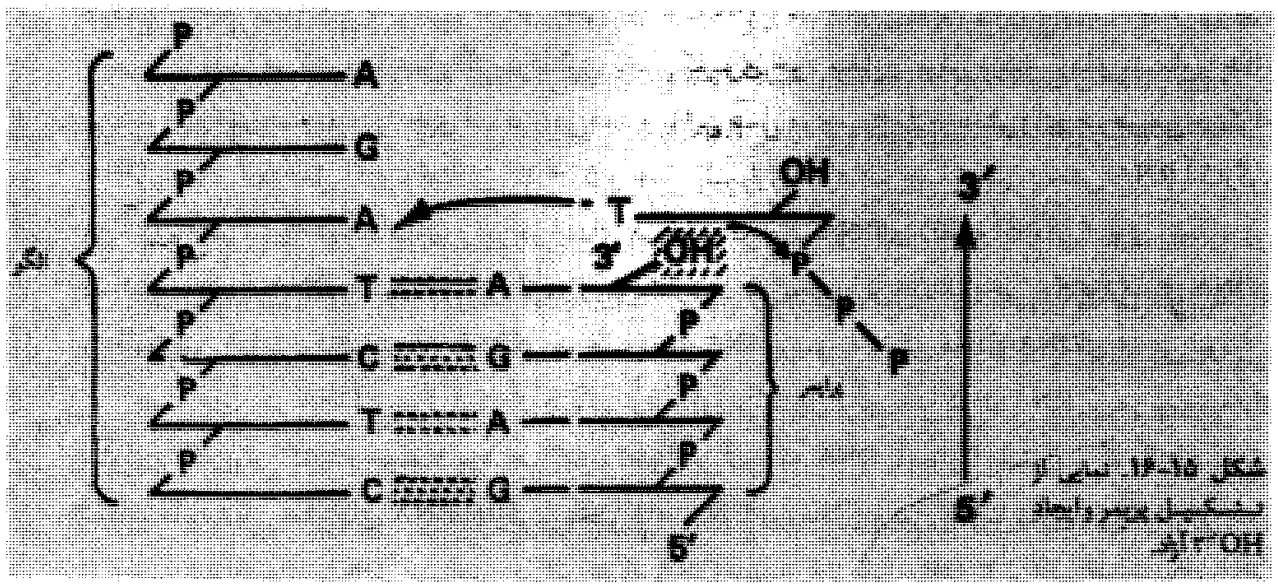
DNA ***پلیمرازها***: آنزیم‌های اصلی همانندسازی DNA هستند که در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها، انواع مختلفی از آن شناسایی و جداسازی شده است. این آنزیم‌ها دزوکسی نوکلئوتیدهای تری‌فسفاته را به‌عنوان گوهرمایه (سوبسترا) شناسایی کرده، با اضافه کردن مونوکلئوتیدها و پلیمریزه کردن آنها در جهت ۳´ → ۵´، موجب همانندسازی، یا تکمیل و بازسازی DNA یا قسمتی از آن می‌شوند.

$$d(NMP)_n + dNTP \xrightarrow[\text{الگو + DNA پلیمراز}]{Mg^{2+}} d(NMP)_{n+1} + PP_i$$

DNA پلیمرازها به انتهای آزاد ۳´OH به‌عنوان آغازگر (پریمر) نیاز دارند (شکل ۱۵-۱۶).

در باسیل‌کولی تاکنون سه نوع DNA پلیمراز مختلف شناسایی و جداشده است که به ترتیب زمان کشف، آنها را

1- Replicated Proteins



شکل ۱۵-۱۶. تشکیل پریمر دایمر OH-۳' آزاد

DNA پلیمراز I، II و III و به اختصار PolI، PolII و PolIII می‌نامند.

DNA ***پلیمراز I***: اولین آنزیم DNA پلیمرازی است که به وسیلهٔ کورنبرگ جدا شد. این آنزیم می‌تواند در شرایط آزمایشگاهی رشتهٔ مکمل DNAی تک رشته‌ای را بسازد. DNA پلیمراز I زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی منفردی به وزن مولکولی ۱۱۰KD است که هر مولکول آن دارای یک اتم روی (Zn) می‌باشد و برای عمل خود به Mg^{++} نیاز دارد. تعداد آن در هر سلول باکتری حدود ۴۰۰ مولکول است و توسط ژن PolA کُد می‌شود. در اثر عمل پروتئازها به دو بخش تقسیم می‌شود. یکی بخش کوچک (۳۶KD) و دیگری بخش بزرگ (۷۶KD) که قطعه کلینو (Klenow) نامیده می‌شود. این آنزیم ویژگی‌ها و فعالیت‌های متفاوتی به شرح زیر دارد:

الف: دارای فعالیت DNA پلیمرازی است که مربوط به قطعه کلینو است. قطعه کلینو که بخش بزرگ و دارای پایانه کربوکسیل است دارای یک شکاف ۲ نانومتری است که درون آن با بارهای مثبت پوشیده شده و محل مناسبی برای اتصال DNAی نوع B می‌باشد.

عمل پلیمرازیِ DNA پلیمراز I همواره در جهت ۳´ ← ۵´ انجام می‌شود یعنی فسفات ۵ نوکلئوتید جدید را به عامل ۳´OH زنجیرهٔ در حال سنتز می‌افزاید. این ویژگی در تمامی DNA پلیمرازهای دیگر نیز صادق است.

ب: DNA پلیمراز I مثل سایر DNA پلیمرازها نمی‌تواند نوکلئوتیدهای منفرد را به‌هم متصل کند، بلکه بایستی یک انتهای ۳´OH آزاد مربوط به یک رشته پلی‌نوکلئوتیدی (RNA RNAپریمر) و یا DNA (الگو) را در اختیار داشته باشد تا نوکلئوتیدها را به انتهای آن بیافزاید. نقش اصلی RNA پریماز تأمین همین انتهای ۳´OH آزاد اولیه است.

ج: DNA پلیمراز I دارای خاصیت اگزونوکلئازی (بریدن نوکلئوتیدها از محل پیوند فسفودی‌استری و خارج کردن نوکلئوتید از زنجیره) است. بنابراین علاوه‌بر سنتز DNA، عمل تخریب آن را نیز انجام می‌دهد. این آنزیم دارای خاصیت اگزونوکلئازی در هر دو جهت ۳´ ← ۵´ و ۵´ ← ۳´ است. خاصیت اگزونوکلئازی ۵´ ← ۳´ آن مربوط به قطعه کلینو است و در اصطلاح خطاها برای بریدن و حذف بازهای مناسب از آن استفاده می‌شود، فعالیت اگزونوکلئازی ۳´ ← ۵´ مربوط به بخش کوچک و دارای پایانه N آنزیم است که برای جدا کردن یا تغییر بخش RNA آغازگر مورد استفاده قرار می‌گیرد.

مجموع دو خاصیت پلیمرازی و اگزونوکلئازی موجب می‌شوند که DNA پلیمراز I بتواند نقش اصلی خود را که تعمیر DNA است به خوبی انجام دهد. وقتی DNA پلیمراز I بر روی DNA حرکت می‌کند، در جایی که

بازی نامناسب قرار گرفته باشد و یا به هر دلیلی مولکول DNA به حالت طبیعی یعنی فرم B نباشد، این آنزیم تغییر شکل پیدا می‌کند و با عمل اگزونوکلئازیِ بخش کلینوی خود محل را برش داده، بازهای اشتباه را خارج می‌کند و بازهای صحیح را به جای آنها قرار می‌دهد و با این عمل موجب اصلاح بخش‌های غیرطبیعی می‌گردد. DNA پلیمراز I با عمل اگزونوکلئازی ´۳ ← ´۵ و عمل پلیمرازی خود موجب تغییر بخش RNA آغازگری می‌شود که در شروع همانندسازی و نیز در ابتدای هر قطعه کوچک DNAای (قطعه اُکازاکی) روی زنجیره پیرو تشکیل می‌شود. DNA پلیمراز I با یکی از دو روش کنار زدن تدریجی یا بریدن تدریجی نوکلئوتیدهای DNAای و جایگزینی آنها با نوکلئوتیدهای DNAای موجب تغییر RNA پریمر به بخش معادل DNAای آن می‌شود.

جهش‌هایی در DNA پلیمراز I که آن را فاقد توان اگزونوکلئازی برای جدا کردن RNA پریمر نمایند، برای سلول پروکاریوتی کشنده خواهند بود. هم‌اکنون تصور می‌شود که DNA پلیمراز I مسئول پر کردن فاصله‌ها یا شکاف‌ها (تبدیل بخش‌های RNA آغازگر به بخش‌های DNAای معادل) ضمن همانندسازی می‌باشد. این عمل را ترجمه شکاف‌های DNA[1] می‌نامند. در این عمل DNA پلیمراز I از پایانه ´۳OH شکاف موجود در DNA، همانندسازی را در جهت ´۳ ← ´۵ انجام می‌دهد تا به پایانه دیگر شکاف برسد. به این ترتیب محل شکاف (بخش RNA آغازگر) در جهت ´۵ ← ´۳ به بخش مشابه DNAای تغییر می‌یابد؛ آخرین پیوند فسفودی‌استری توسط آنزیم لیگاز برقرار می‌گردد.

د: چون DNA پلیمراز I می‌تواند انتهای ´۳ یک رشته را در یک بریدگی DNA دو رشته‌ای توسعه دهد و نوکلئوتیدها را از انتهای ´۵ همان بریدگی خارج کند (فرایند ترجمهٔ شکاف)، بنابراین نقش مهمی در تعمیر DNAای تخریب شده دارد.

بررسی‌های بیشتر بر روی DNA پلیمراز I نشان داد که این آنزیم نمی‌تواند آنزیم اصلی همانندسازی در باسیل‌کولی و دیگر پروکاریوت‌ها باشد زیرا نمی‌تواند به تنهایی همانندسازی یک قطعه دو رشته‌ای DNA را انجام دهد و همچنین سرعت عمل آن بسیار کمتر از زمان محاسبه شده برای همانندسازی کروموزوم باسیل‌کولی می‌باشد.

پس از بررسی تعداد زیادی از جهش یافته‌ها در باسیل‌کولی، دانشمندان توانستند سوشی از این باکتری را جدا کنند که فاقد DNA پلیمراز I بود ولی می‌توانست همانندسازی DNA را به‌صورت معمولی انجام دهد. با بررسی این باکتری‌ها دو نوع دیگر DNA پلیمراز کشف شدند.

DNA ***پلیمراز*** II: آنزیمی یک بخشی با وزن مولکولی ۱۲۰KD است. توسط ژن PolB کُد می‌شود. فعالیت اگزونوکلئازی ´۵ ← ´۳ دارد و به احتمالاً در ترمیم ضایعات فیزیکی و شیمیایی DNA نقش دارد. عمل دقیق آن هنوز مشخص نشده است. فعالیت آن به وسیله مواد بازدارنده گروه‌های سولفیدریل متوقف می‌شود، بنابراین در جایگاه فعال این آنزیم گروه‌های سولفیدریل وجود دارند.

DNA ***پلیمراز*** III: آنزیم اصلی در همانندسازی پروکاریوت‌ها می‌باشد. اما به دلیل چندبخشی بودن و تجزیه شدن ضمن خالص سازی، دیرتر از دو آنزیم دیگر کشف شده است. این آنزیم به وسیلهٔ T.Korenberg پسر آرتوکورنبرگ کشف شد. برای این هولو آنزیم تا ۱۰ جزء (زیرواحد) پلی‌پپتیدی در نظر گرفته‌اند. وزن مولکولی آن بیش از ۲۵۰KD است. فعالیتش همانند DNA پلیمراز II به وسیله مهارکننده‌های گروه‌های سولفیدریل، متوقف می‌شود. سرعت عمل آن ۱۵ برابر DNA پلیمراز I و ۳۰۰ برابر DNA پلیمراز II می‌باشد. ۱۰ تا ۲۰ کپی آن در سلول باکتری وجود دارد.

DNA پلیمراز III، هم خاصیت پلیمرازی و هم خاصیت اگزونوکلئازی دارد. خاصیت پلیمرازی آن در جهت ´۳ ← ´۵

1- Nick translation of DNA

و خاصیت اگزونوکلئازی آن در دو جهت ´۳ ← ´۵ و ´۵ ← ´۳ می‌باشد. وجود دو خاصیت پلیمرازی و اگزونوکلئازی در DNA پلیمراز III برای تصحیح اشتباهات و اصلاح بخش‌های تخریب شدهٔ DNA اهمیت زیادی دارد.

DNA پلیمراز III ساختمان پیچیده‌تری از دو DNA پلیمراز I و II دارد؛ دارای چندین (تا ۱۰) زیرواحد است که آنها را به دو دسته، زیرواحدهای اصلی و فرعی تقسیم می‌کنند.

زیرواحدهای اصلی یا بخش پایه یا قلب آنزیم (Core) عبارتند از زیرواحدهای α، ε و θ. وجود این زیرواحدها برای عمل آنزیم ضروری است. عمل اصلی پلیمریزاسیون نوکلئوتیدها به عهدهٔ زیرواحد α است ولی سرعت آن به تنهایی بسیار کم است.

زیرواحدهای فرعی برای عمل DNA پلیمراز III ضروری نیستند، ولی حضور آنها موجب بهبود و تسریع عمل آنزیم می‌شود. زیرواحد β احتمالاً در شناسایی OH آزاد اولیه (پریمر) نقش دارد. زیرواحد ε مسئول فعالیت اگزونوکلئازی ´۵ ← ´۳ است. زیرواحدهای δ، γ و τ (تو) مسئول اتصال آنزیم به رشته الگو[1] هستند و در عمل آنزیم به آن کمک می‌کنند.

DNA پلیمراز III به همراه سایر عوامل ضروری برای همانندسازی، می‌تواند در شرایط آزمایشگاهی، ۵۰۰ نوکلئوتید را در ثانیه و در شرایط طبیعی در سلول زنده، ۱۰۰۰ نوکلئوتید را در ثانیه پلیمریزه نماید.

جدول ۱۵-۱ و ۱۵-۲ برخی ویژگی‌های مربوط به DNA پلیمراز III و شکل ۱۵-۱۷ نمایی از این آنزیم را مشخص می‌سازند.

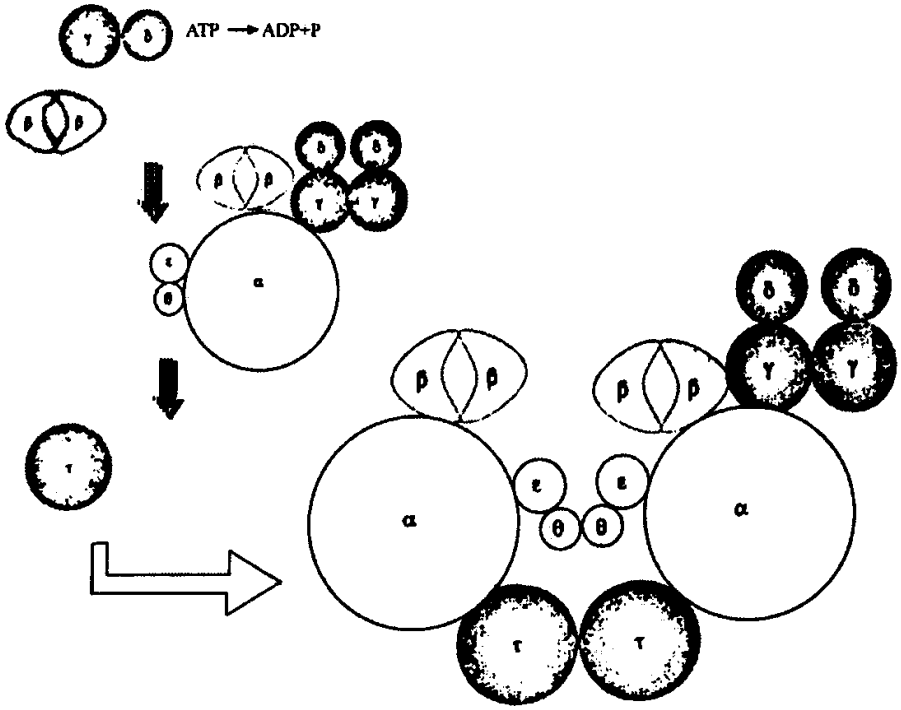
جدول ۱۵-۱. برخی ویژگی‌های DNA پلیمراز III

زیرواحد	وزن مولکولی (KD)	ژن	عمل
آلفا α	۱۳۰	dna E	سنتز DNA
بتا β	۴۰	dna N	به احتمال شناسایی OH آزاد اولیه
تتا θ	۱۰		؟
اپسیلون ε	۲۵	dna Q	فعالیت اگزونوکلئازی ´۵ ← ´۳
دلتا δ	۳۶		اتصال آنزیم
گاما γ	۵۲	dna Zx	به زنجیره
تو τ	۷۱	dna Zx	DNA الگو

جدول ۱۵-۲. زیرواحدهای تشکیل دهندهٔ هولو آنزیم DNA پلیمراز III و نقش آنها

زیرواحد	وزن مولکولی (KD)	فعالیت
آلفا α پلیمراز	۱۳۳	پلیمرازی
اپسیلون ε نقش	۳۷	اصلاح اشتباهات
تتا θ آنزیم	۱۰	؟
بتا β	۴۰	
تو τ	۷۱	
گاما γ	۵۲	● افزایش تعداد نوکلئوتیدها به زنجیره
دلتا δ	۳۵	● اتصال آنزیم به زنجیره DNA الگو
دلتا پرایم δ'	۳۳	
کی χ	۱۵	
پسی ψ	۱۲	

1- Processivity



شکل ۱۵-۱۷. مدلی از DNA پلیمراز III (هولو آنزیم) در E.Coli

در یوکاریوت‌ها DNA پلیمرازهای مختلفی شناخته شده‌اند که مهم‌ترین آنها عبارتند از:

DNA ***پلیمراز α (آلفا)***: وزن مولکولی آن حدود ۳۲۰KD و دارای ۴ زیرواحد است (۵۰، ۵۵، ۷۵ و ۱۸۰KD). این آنزیم در هسته یاخته‌های یوکاریوتی وجود دارد و مسئول همانندسازی DNA کروموزومی (رشته پیرو) می‌باشد. به همراه پریماز عمل خود را انجام می‌دهد. تصور می‌شود زیرواحد ۵۰ و ۵۵ کیلو دالتونی نقش پریمازی، زیرواحد ۱۸۰ کیلو دالتونی عمل DNA پلیمرازی و زیرواحد ۷۰ کیلو دالتونی نقش متوازن‌کننده عمل زیرواحدهای قبلی را به عهده داشته باشند. این آنزیم نقش اگزونوکلئازی ندارد ولی از آنجا که برای آن هم نقش DNA پلیمرازی و هم نقش پریمازی در نظر می‌گیرند، آن را DNA پلیمراز آلفا - پریماز نیز می‌نامند.

DNA ***پلیمراز δ (دلتا)***: وزن مولکولی آن ۱۸۰ تا ۲۴۰KD و دارای ۲ زیرواحد است. در هسته وجود دارد و مسئول همانندسازی DNA کروموزومی (رشته پیشرو) می‌باشد. برای فعالیت خود به پروتئین PCNA[1] نیاز دارد. این آنزیم دارای فعالیت اگزونوکلئازی ´۵ → ´۳ است.

DNA ***پلیمراز ε (اپسیلون)***: وزن مولکولی آن ۲۹۰KD و دارای ۲ زیرواحد است. در هسته وجود دارد. مسئول همانندسازی DNA کروموزومی است (مشابه DNA پلیمراز دلتا است اما به PCNA نیاز ندارد). دارای فعالیت اگزونوکلئازی ´۵ → ´۳ است؛ مسئول ترمیم تخریب‌های حاصل از پرتوهای فرابنفش بر روی DNA می‌باشد.

DNA ***پلیمراز β (بتا)***: وزن مولکولی ۴۵KD و دارای یک بخش است. در هسته وجود دارد. فاقد فعالیت اگزونوکلئازی و مسئول ترمیم DNA است، بر روی مولکول‌هایی از DNA که در آنها حدود ۲۰ نوکلئوتید فاصله (Gap) ایجاد شده است، اثر می‌کند.

DNA ***پلیمراز γ (گاما)***: وزن مولکولی ۱۴۰KD و دارای ۴ زیرواحد است. در میتوکندری وجود دارد؛ مسئول همانندسازی DNA میتوکندری است. فعالیت اگزونوکلئازی ندارد.

در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها آنزیم‌های دیگری نیز برای انجام همانندسازی لازم هستند که عبارتند از:

DNA ***لیگازها***: وزن مولکولی آن در باسیل‌کولی ۷۷KD است. این آنزیم برقراری پیوند فسفودی‌استری بین پایانهٔ OH

1- Proliferationg Cell Nuclear Antigen

´۳ و ´۵ - فسفات انتهایی همان رشته DNA را عهده‌دار است. عمل این آنزیم در همانندسازی DNA هنگامی شروع می‌شود که بخش RNA پریمر از ابتدای قطعات اُکازاکی به وسیله DNA پلیمراز I در پروکاریوت‌ها، یا DNA پلیمراز بتا در یوکاریوت‌ها برداشته شده و به وسیله همین آنزیم‌ها به جای بخش RNA پریمر، قطعهٔ DNAای معادل آن جایگزین شده باشد. در این هنگام قطعات اُکازاکی به اصلاح شده بایستی با برقراری پیوندهای دی‌فسفواستری به‌هم متصل شوند، این اتصال با دخالت DNA لیگاز انجام می‌شود که از NAD^+ در باسیل‌کولی یا از AMP به‌عنوان عامل همراه (کوفاکتور) استفاده می‌کند DNA لیگاز عمل خود را در دو مرحله به همراه AMP انجام می‌دهد به این ترتیب که مجموعه AMP - آنزیم به ´۵ - فسفات برش‌خورده می‌چسبند، سپس پیوند فسفودی‌استری با انتهای ´۳OH برش‌خورده شکل می‌گیرد و در نهایت آنزیم و AMP آزاد می‌شوند. AMP خود از هیدرولیز ATP پس از اتصال به آنزیم (لیگاز) ایجاد می‌شود. بنابراین لیگازها برای انجام عمل خود نیاز به انرژی دارند که ممکن است از ATP (در T_4، T_7 و پستانداران) یا NAD^+ باکتری‌ها به‌دست آید.

DNA **پریماز**: در سال‌های اخیر وجود DNA پریماز در برخی سلول‌ها نشان داده شده که همانند RNA پریماز می‌تواند با استفاده از توالی بازهای نوکلئوتیدی روی زنجیره DNA به ردیف شدن بازهای مکمل آن کمک کند. این آنزیم در شروع رونویسی دخالت می‌کند. هنوز آگاهی‌های زیادی از ساخت و کار آن در دست نیست.

مراحل و چگونگی همانندسازی DNA

برای همانندسازی DNA سه مرحله شامل: مرحله آغاز[1]، طویل شدن[2] و پایان[3] در نظر می‌گیرند. اساس این مراحل در یاخته‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی تا حد بسیار زیادی مشابه است و تفاوت‌ها بیشتر مربوط به نوع آنزیم‌ها و سرعت عمل می‌باشد.

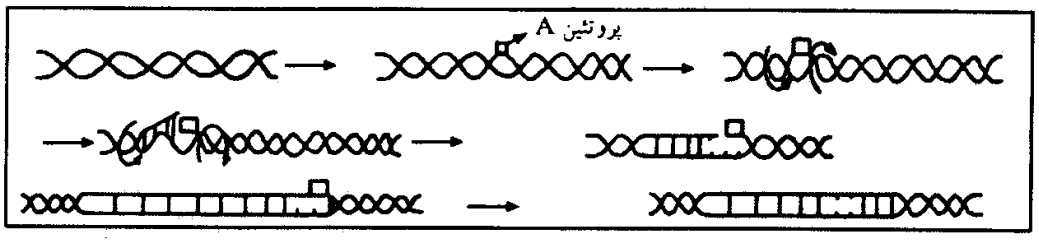
مرحله اغاز: این مرحله شامل شناسایی محل شروع همانندسازی[4] (OS)، تشکیل مجموعه (کمپلکس) همانندسازی و تشکیل زنجیره کوتاه چند نوکلئوتیدی ابتدایی است.

همانندسازی DNA در باکتری‌ها از یک ناحیه آغازی که به نظر بیشتر محققان با غشاء ارتباط دارد و در یوکاریوت‌ها از نقطه آغازی هر رپلیکون شروع می‌شود. برای این که دو زنجیره DNA بتوانند از هم باز شوند و همانندسازی شروع شود، ابتدا بایستی DNA از پروتئین‌های شبه هیستونی همراه خود جدا شود. این عمل در اثر واکنش‌های متفاوتی مانند متیلاسیون، استیلاسیون و فسفریلاسیون انجام می‌گیرد. ضمن این واکنش‌ها، عمل متیل، استیل یا فسفات با مولکول‌های پروتئینی ترکیب می‌شود و به این ترتیب از اتصال پروتئین‌های شبه هیستونی با DNA ممانعت می‌گردد. همان گونه که قبلاً شرح داده شد، میل ترکیبی این عوامل با پروتئین‌های بیشتر است تا با DNA. پس از جدا شدن دو زنجیرهٔ مولکول DNA از پروتئین‌های شبه هیستونی، دو زنجیرهٔ DNA بایستی از یکدیگر باز شوند. به‌طور معمول دو زنجیره برحسب الگوی واتسون - کریک، پیچ خورده‌اند. برای باز شدن این مارپیچ در ناحیه آغازیِ همانندسازی ابتدا بایستی دو زنجیره به‌صورت موازی در آیند و سپس پیوندهای هیدروژنی بازهای مکمل باز شوند. پروتئین‌ها و آنزیم‌های متفاوتی در این کار نقش دارند. که مهم‌ترین آنها پروتئین‌های DNaA، توپوایزومرازها، DNaB، DNaC و هلیکازها و rep پروتئین‌ها هستند.

ابتدا ناحیه آغازی (OS) به وسیله پروتئین DNaA شناسایی می‌شود، پس از اتصال حدود ۲۰ تا ۳۰ مولکول از

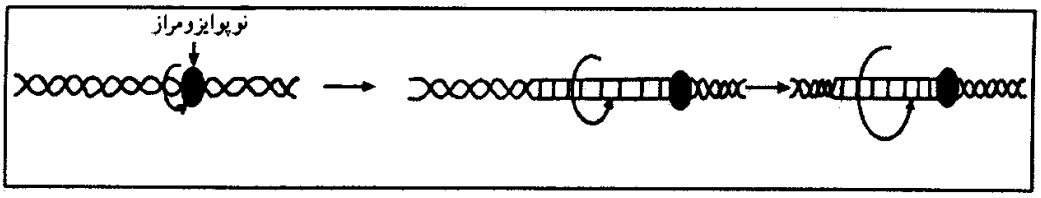
1- Initiation Phase 2- Elongation Phase 3- Termination Phase
4- Origin Site

این پروتئین به ناحیه آغازی، با عمل این پروتئین، مولکول DNA به صورتی پیچ می‌خورد که در قسمتی از آن، حالت ناپایداری پیدا می‌کند. پروتئین DNaA می‌تواند در یکی از دو زنجیره DNA بریدگی[1] ایجاد کند، سپس با حرکت قسمت‌های بریده شده در جهت عکس مارپیچ دو زنجیره، آنها را به‌صورت موازی در می‌آورد (شکل ۱۵-۱۸). ضمن این عمل ممکن است چند پیوند هیدروژنی بین دو زنجیره نیز باز شوند.



شکل ۱۵-۱۸. طرز عمل پروتئین DNaA برای موازی کردن دو زنجیره در شروع همانندسازی در ناحیه آغازی.

آنزیم‌های دیگری که در ایجاد حالت موازی دو زنجیره دخالت می‌کنند توپوایزومرازها هستند که همان گونه که شرح داده شد با بریدن یکی از دو زنجیره (توپوایزومراز I) یا هر دو زنجیره (توپوایزومراز II) و طرز عمل ویژه خود و با کاهش پیچش‌ها یا ایجاد ابرمارپیچ منفی در ایجاد حالت فضایی مناسب و موازی کردن دو زنجیره که برای همانندسازی لازم است دخالت می‌کنند (شکل ۱۵-۱۹). ضمن عمل توپوایزومرازها نیز ممکن است تعدادی از پیوندهای هیدروژنی بین دو زنجیره باز شوند.



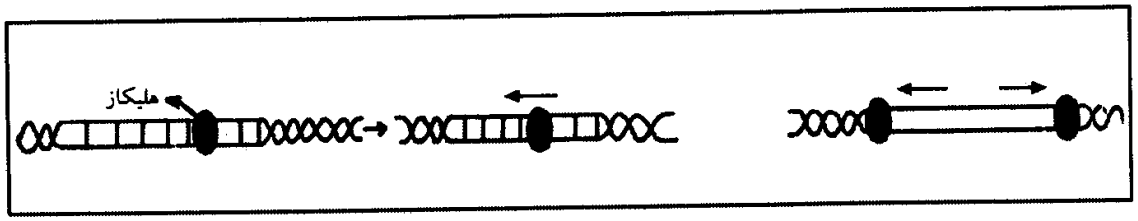
شکل ۱۵-۱۹. نمایش ساده‌ای از طرز عمل توپوایزومرازها و موازی کردن دو رشته DNA در شروع همانندسازی DNA

هیکازها آنزیم‌های دیگری هستند که پیوندهای هیدروژنی بین دو زنجیره را هدف قرار داده با استفاده از انرژی حاصل از تجزیه ATP (دو مولکول ATP برای گسستن هر جفت از نوکلئوتیدهای مکمل)، پیوندهای هیدروژنی بین دو رشته DNA را باز می‌کنند و به باز شدن مارپیچ و موازی شدن دو رشتهٔ DNA کمک می‌کنند. همان گونه که شرح داده شد گرچه در شروع همانندسازی ممکن است از هلیکاز I یا II استفاده شود اما از آنجا که عمل آنها محدود است (گسستن دو یا سه جفت نوکلئوتید)، در ادامهٔ فرایند همانندسازی به هلیکاز III نیاز است.

شکل ۱۵-۲۰ نمای بسیار ساده شده‌ای از عمل هلیکازها را نشان می‌دهد.

حالت ناپایدار ایجاد شده در ناحیه آغازی (OS) به وسیله پروتئین‌های DNaB و DNaC شناسایی می‌شود. DNaB دو رشتهٔ DNA را به‌تدریج و به خوبی از هم باز می‌کند، سپس پروتئین‌های SSB به هر یک از رشته‌های منفرد DNA متصل می‌شوند و این رشته‌ها را از هم باز نگه می‌دارند. هر چه منطقه باز شدن دو زنجیره وسیع‌تر می‌شود، تعداد این پروتئین‌ها افزایش می‌یابد. اتصال این پروتئین‌ها به دو زنجیره نیاز به انرژی ندارد. این پروتئین‌ها بعداً ضمن تشکیل زنجیره‌های مکمل جدید، به وسیلهٔ پروتئین‌های ویژه (پروتئین n´ موجود در پریموزوم) از

1- Nicking or Breks

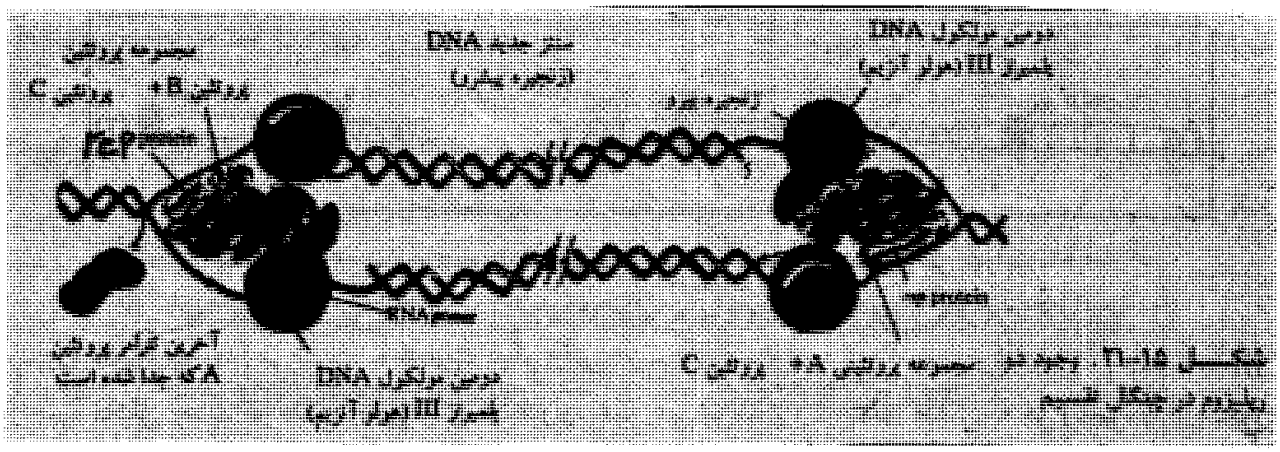


شکل ۱۵-۲۰. نمای ساده‌ای از عمل هلیکازها و گسستن پیوندهای هیدروژنی بین دو زنجیره.

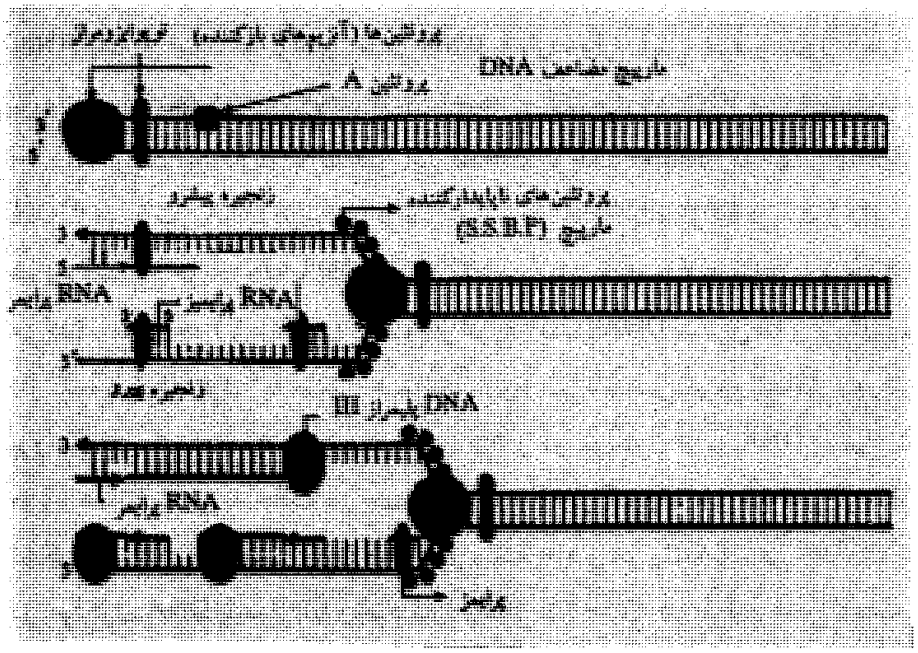
زنجیره‌های اولیه جدا می‌شوند. به عبارت دیگر وقتی آنزیم‌های مسئول پلیمریزاسیون نوکلئوتیدها برای تشکیل زنجیرهٔ مکمّلِ جدید در مقابل زنجیره‌های اولیه وارد عمل می‌شوند، پروتئین‌های متصل به هر زنجیره را از محل اتصال جدا می‌کنند.

با گسسته شدن پیوندهای هیدروژنی بین دو زنجیره DNA در ناحیهٔ آغازی همانندسازی، فضایی بیضی شکل ایجاد می‌شود که اصطلاحاً آن را «چشم پرنده[1]» می‌نامند. این فضا ابتدا کوچک است و به‌تدریج با دخالت هلکیازها به حالت یک جهتی، یا اغلب دو جهتی (وابسته به نوع یاخته) گسترش می‌یابد و فضای کافی برای ورود آنزیم‌ها و پروتئین‌های مسئول همانندسازی فراهم می‌شود. با ورود پریماز (DNaG) و پروتئین‌های n، n´، n″ و i کمپلکس پریموزوم در ناحیه شروع همانندسازی تشکیل می‌شود. از آنجا که DNA پلیمرازها نمی‌توانند سنتز DNA را از ابتدا شروع کنند و بایستی یک پایانه ۳´OH آزاد در اختیار آنها قرار گیرد و در محل باز شده دو زنجیره چنین پایانه‌هایی وجود ندارد، این وظیفه بر عهدهٔ RNA پریماز یا در برخی سلول‌ها DNA پریماز می‌باشد که می‌توانند با استفاده از توالی بازهای نوکلئوتیدیِ روی زنجیرهٔ DNA، به ردیف شدن بازهای مکمل کمک کنند. RNA پریماز در واقع یک RNA پلیمراز است که توانایی سنتز RNA را دارد، ولی عمل خود را بدون احتیاج به رشته اولیه انجام می‌دهد. پریماز عمل همانندسازی DNA را با ساخت دو قطعهٔ کوتاه RNA شروع می‌کند. این RNAها طول حدود ۳-۴ تا ۱۰-۱۵ نوکلئوتید دارند. با تشکیل این قطعات کوچک RNAای که آنها را «RNA آغازگر یا پریمر» می‌نامند، سرِ ۳´OH مورد نیاز DNA پلیمرازها فراهم می‌شود و DNA پلیمراز III در سلول‌های پروکاریوتی می‌تواند عمل خود را شروع کند. در این مرحله DNA پلیمراز III و پروتئین‌های rep به پریموزوم اضافه می‌شوند و عمل خود را آغاز می‌کنند. مجموعه (کمپلکس) حاصل از افزوده شدن DNA پلیمراز III و پروتئین‌های rep به پریموزوم را رپلیزوم[2] (از کلمهٔ رپلیکاسیون[3] به معنی همانندسازی) می‌نامند. رپلیزوم شامل پروتئین‌های DNaB، DNaC، پریماز، پروتئین‌های n، n´، n″، i، پروتئین‌های rep و دو مولکول آنزیم DNA پلیمراز III می‌باشد. از آنجا که در اغلب موارد همانندسازی به حالت دو جهتی از ناحیه آغازی گسترش می‌یابد پس در محل شروع همانندسازی دو رپلیزوم تشکیل می‌شود، همچنین چون DNA دو رشته دارد و هر رشته بایستی جداگانه همانندسازی شود، در هر رپلیزوم دو مولکول DNA پلیمراز III وجود دارد (شکل ۱۵-۲۱). در طرفین محل همانندسازی، دو رشته DNA هنوز باز نشده و به‌هم متصل هستند و با دو زنجیرهٔ محل باز شده شکلی شبیه چنگال دو شاخه، به نام چنگال همانندسازی[4] را ایجاد می‌کنند؛ همچنین این ناحیه را به دلیل شباهتش به حرف y، طرح y در همانندسازی می‌گویند. بدیهی است در همانندسازی دو جهتی در ناحیه شروع همانندسازی به سوی دو ناحیه‌ای که هنوز زنجیره‌های DNA به‌هم پیوسته‌اند دو چنگال همانندسازی را می‌توان در نظر گرفت که در خلاف جهت یکدیگر همان‌طوری که دو رشته والدی از یکدیگر باز می‌شوند، حرکت می‌کنند.

1- Bird eye 2- Replisome 3- Replication 4- Replication Fork



با باز شدن دو زنجیره و تشکیل چنگال‌های همانندسازی، یکی از دو زنجیره دارای جهت ´۵ ← ´۳ و دیگری دارای جهت ´۳ ← ´۵ می‌باشد. زنجیره دارای ´۵ ← ´۳ را زنجیره پیشرو[1] نامند که جهت آن برای حرکت DNA پلیمرازها (پلیمراز III در پروکاریوت‌ها) مناسب است، همانندسازی این زنجیره به حالت ممتد یا پیوسته انجام می‌شود؛ زنجیره دیگر را که از محل مبدأ دارای جهت ´۳ ← ´۵ است زنجیرهٔ پیرو[2] نامند که به اصطلاح جهت آن برای حرکت DNA پلیمرازها مناسب نیست، همانندسازی این زنجیره به‌طور منقطع (ناپیوسته) و به‌صورت قطعات DNAی جدا از همی انجام می‌شود که آنها را با نام اوکازاکی[3]، محققی که برای اولین بار چگونگی همانندسازی زنجیره پیرو را کشف کرد، قطعات اکازاکی[4] نامند. شکل ۱۵-۲۲ نمایشی ساده از آغاز همانندسازی DNA در یکی از چنگال‌های همانندسازی را مشخص می‌سازد.



شکل ۱۵-۲۲. مراحلی از همانندسازی DNA

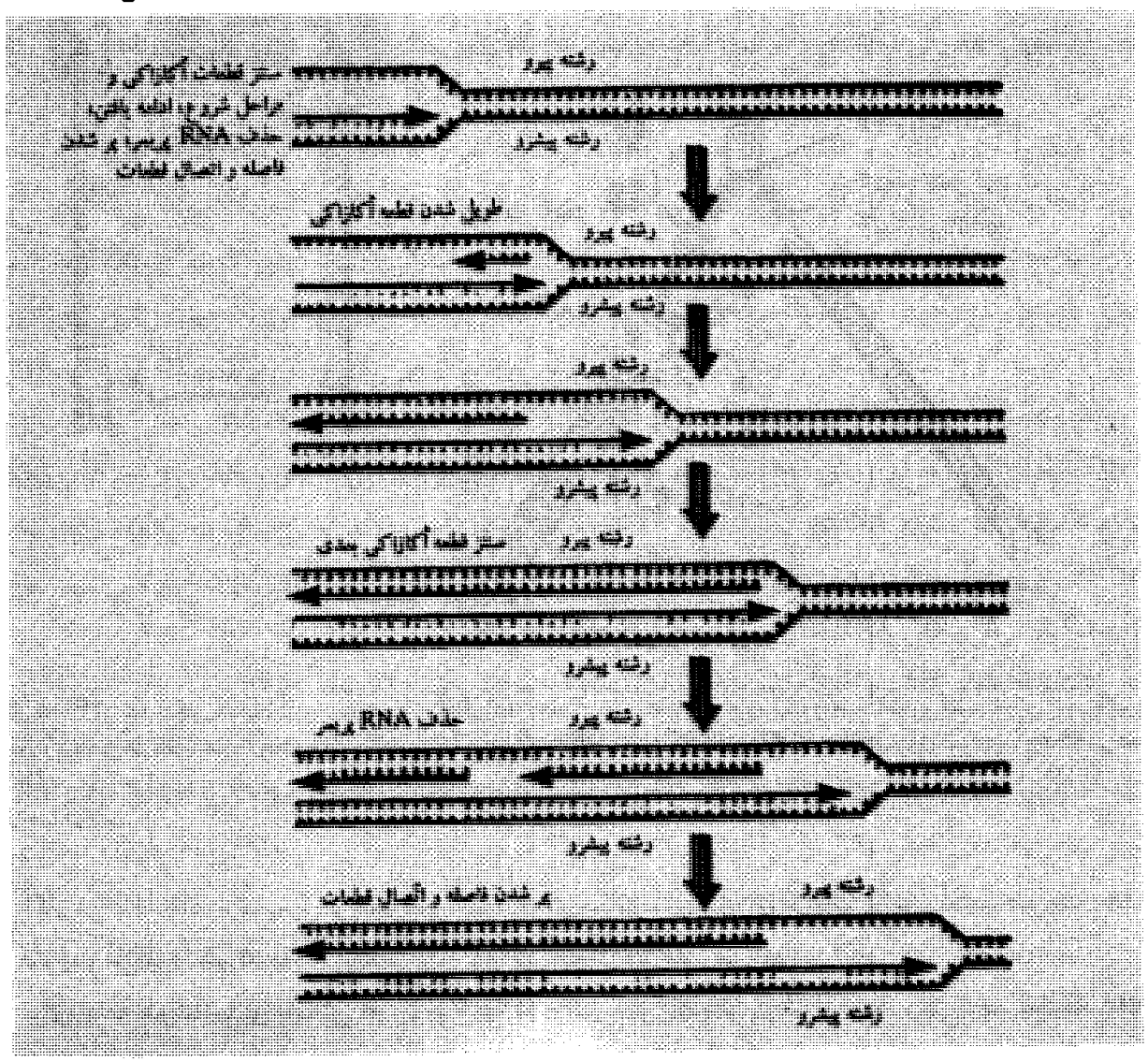
همان گونه که شرح داده شد پریمازها که بخشی از مجموعه پریموزوم هستند با استفاده از ترتیب‌های نوکلئوتیدی و بدون نیاز به زنجیره‌ای پریمر، شروع به تشکیل بخش RNA پریمر (واجد تا حدود ۱۰-۱۵ نوکلئوتید) می‌کنند و با ایجاد سرهای ´۳OH آزاد شرایط را برای عمل DNA پلیمراز III در پروکاریوت‌ها و DNA پلیمراز آلفا یا دلتا در یوکاریوت‌ها فراهم می‌سازند و ادامه عمل را به صورتی پیوسته یا ناپیوسته به این آنزیم‌ها می‌سپارند.

نوکلئوتیدهای مورد استفاده در همانندسازی به‌صورت تری‌فسفاتی وارد واکنش می‌شوند اما به جزء اولین

1- Leading Strand 2- Lagging Strand 3- Okazaki 4- Okazaki Fragments

نوکلئوتید که در ابتدایِ هر زنجیره قرار می‌گیرد، بقیه نوکلئوتیدها به حالت یک فسفاتی در می‌آیند. جدا کردن فسفات‌های بتا و گاما در آغاز و تا مرحلهٔ تشکیل RNA آغازگر (RNA پریمر) به وسیلهٔ RNA پریماز و سپس به وسیلهٔ DNA پلیمرازی است که هر زنجیره را همانندسازی می‌کند.

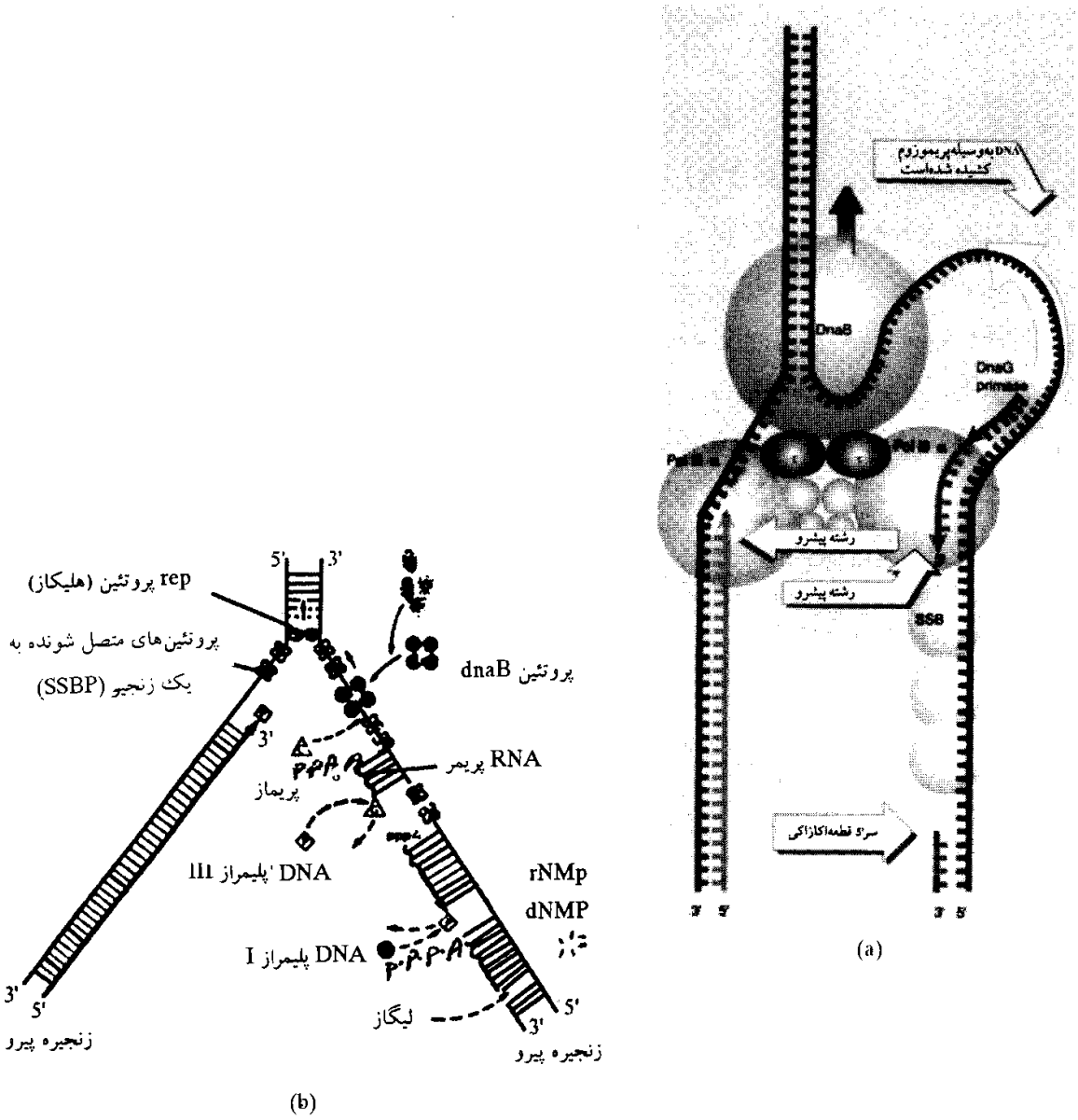
در مرحلهٔ طویل‌شدن با تشکیل بخش RNA آغازگر و به دنبال جداشدن RNA پریماز از این RNA، DNA پلیمراز III در پروکاریوت‌ها و DNA پلیمراز آلفا (برای زنجیره پیرو) و DNA پلیمراز دلتا (برای زنجیره پیشرو) در یوکاریوت‌ها وارد عمل می‌شوند و نوکلئوتیدهای مناسب و مکمّل برای هر زنجیره را گزینش کرده و در مقابل نوکلئوتیدهای هر یک از دو زنجیره باز شدهٔ مولکول DNA که حکم الگو را دارند ردیف می‌کنند. سازگاری بازهای مکمّل موجب برقراری سریع پیوندهای هیدروژنی بین نوکلئوتیدهای زنجیرهٔ DNAی الگویی و زنجیرهٔ نوساخت می‌شود، همچنین با عمل DNA پلیمرازها، پیوندهای فسفودی‌استری بین نوکلئوتیدهایی که مقابل هر زنجیره الگویی ردیف شده‌اند و به سر ۳′OH آزاد RNA آغازگر افزوده می‌شوند، برقرار می‌گردد. این اعمال برای همانندسازی زنجیره پیشرو به حالت ممتد انجام می‌شود و موجب تشکیل یک زنجیره نوساخت ممتد DNAای با جهت ۳′ ← ۵′ است به‌صورت گسسته و با تشکیل قطعات اُکازاکی همراه است. در ابتدای ۵′ هر قطعه اُکازاکی در پروکاریوت‌ها ۱۰۰۰ تا ۲۰۰۰ نوکلئوتید و در یوکاریوت‌ها حدود ۱۰۰ تا ۲۰۰ نوکلئوتید دارد. شکل ۱۵-۲۳ نمای



شکل ۱۵-۲۳. همانندسازی پیوسته برای زنجیره پیشرو و تشکیل قطعات آکازاکی ضمن همانندسازی ناپیوسته برای زنجیره پیرو.

ساده‌ای از چگونگی همانندسازی پیوسته برای زنجیره پیشرو و همانندسازی ناپیوسته (تشکیل قطعات اُکازاکی) برای دو زنجیره پیرو را نشان می‌دهد.

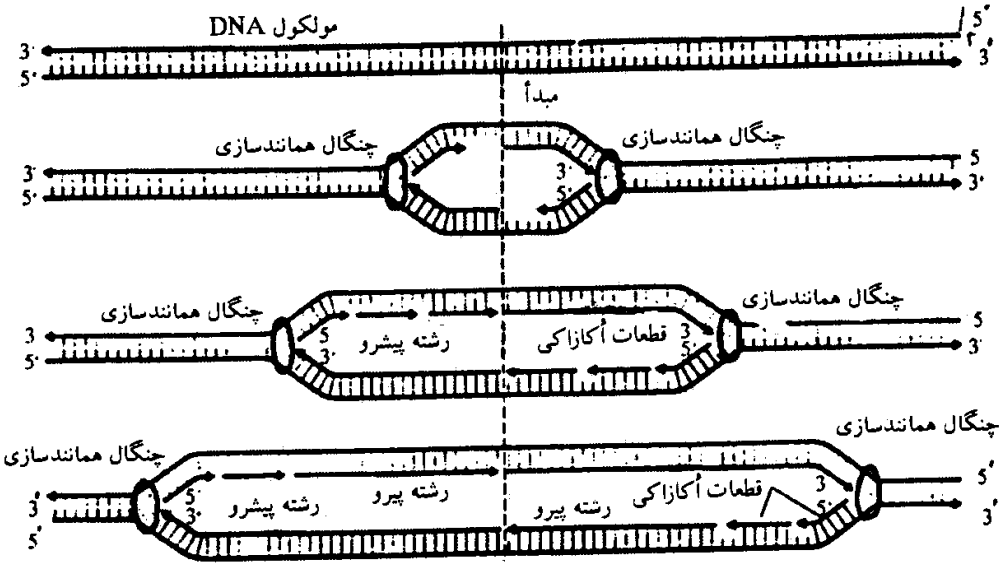
شکل‌های ۱۵-۲۴ و ۱۵-۲۵ طرح‌هایی از همانندسازی زنجیره پیرو و پیشرو و پروتئین‌ها و آنزیم‌هایی که در محل چنگال همانندسازی برای همانندسازی ضرورت دارند را نشان می‌دهند.



شکل ۱۵-۲۴. a) چنگال همانندسازی، نمایشی از چگونگی همانندسازی پیوسته برای زنجیره پیشرو، همانندسازی گسسته برای زنجیرهٔ پیرو و عده‌ای از پروتئین‌ها و آنزیم‌های لازم در همانندسازی. b) هر مولکول DNA پلیمراز III (PolIII ∝) همانندسازی یک زنجیره را انجام می‌دهد. DnaB مسئول حرکت رو به جلو در چنگال همانندسازی است. PriA جایگاه شروع را شناسایی می‌کند و پریموزوم یک رشته DNA را از رشته دیگر جدا می‌کند.

اُکازاکی با استفاده ازتیمیدین تریسیوم‌دار نشان داد که همانندسازی DNA در یکی از دو رشته به‌صورت جدا از هم صورت می‌گیرد. هم‌اکنون این قطعات را به نام او، قطعات اُکازاکی می‌نامند.

برای ادامهٔ همانندسازی بایستی دو زنجیرهٔ DNA به‌تدریج از یکدیگر باز شوند و راه برای ادامه فعالیت DNA پلیمرازها آماده شود. این عمل به وسیله پروتئین‌ها و آنزیم‌های بازکنندهٔ DNA و به ویژه با عمل هلیکاز III انجام می‌شود (شکل ۱۵-۲۴).



شکل ۱۵-۲۵. گسترش دو چنگال همانندسازی در خلاف جهت یکدیگر برای امکان ادامه همانندسازی دو جهتی؛ در هر چنگال همانندسازی یک زنجیره پیشرو (راهبر) و یک زنجیره پیرو (رهرو) وجود دارد.

با بازشدن بخش‌های بیشتری از دو زنجیره در پشت زنجیره‌های نوساخت (در انتهای P-۵´) جای خالی بیشتری ایجاد می‌شود تا حدّی که برای جای‌گیری RNA پریماز جدید که ورودش برای امکان همانندسازی زنجیره پیرو لازم است، مناسب باشد. با ورود RNA پریماز جدید، بخش RNA آغازگر جدیدی سنتز می‌شود و به دنبال آن همانندسازی به صورتی که شرح داده شد، ادامه می‌یابد. به خاطر آوریم که در یوکاریوت‌ها برای همانندسازی زنجیرهٔ پیرو نیاز به RNA پریماز نیست زیرا همان گونه که شرح داده شد DNA پلیمراز آلفا خود نقش پریمازی هم دارد و زیرواحدهای ۵۰ و ۵۵ کیلو دالتونی آن با عمل RNA پریمازی خود، RNA آغازگر را در ابتدای هر قطعه اُکازاکی می‌سازند؛ به همین دلیل این آنزیم را DNA پلیمراز آلفا پریماز می‌نامند.

با توجه به مطالب شرح داده شده می‌توان مجسّم کرد که در همانندسازی دو جهتی، که دو چنگال همانندسازی متقابل و پیشرونده وجود دارد از نقطهٔ مبدأ برای هر چنگال همانندسازی یک زنجیرهٔ پیشرو (با جهت ۵´ ← ۳´) و دیگری پیرو (با جهت ۳´ ← ۵´) است و در چنگال همانندسازیِ متقابل وضع زنجیره‌ها برعکس می‌شود (شکل ۱۵-۲۵).

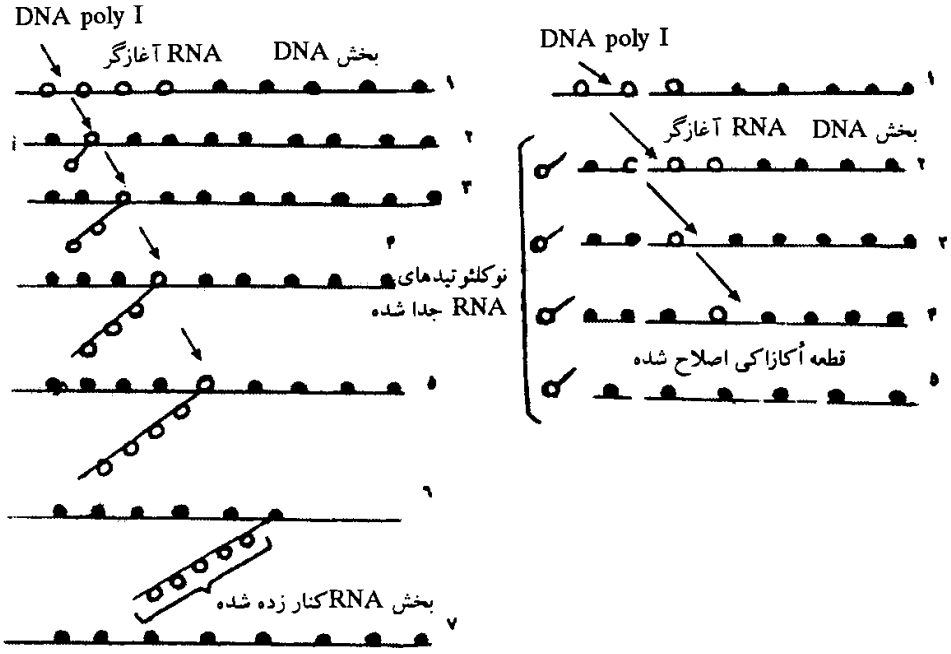
تغییر بخش RNA آغازگر موجود در سر ۵ هر قطعه اُکازاکی و نیز در سر ۵ زنجیرهٔ مکمّلِ زنجیرهٔ پیشرو به وسیلهٔ DNA پلیمراز I و بنا به دو روش انجام می‌شود: یکی کنار زدن تدریجی نوکلئوتیدهای RNAای و جایگزین‌کردن هر کدام با نوکلئوتید مشابه DNAای (شکل ۱۵-۲۶ الف) و دیگری با بریدن تدریجی (یک به یک) نوکلئوتیدهای RNAای و جایگزین‌کردن هر یک با نوکلئوتید مشابه DNAای (شکل ۱۵-۲۶ ب) انجام می‌شود. برخی پژوهشگران برش بخش RNA آغازگر را به عهدهٔ RNaseH می‌دانند.

اتصال قطعات اُکازاکی اصلاح شده با دخالت لیگازها انجام می‌شود (صفحه ۴۱۹).

پایان همانندسازی در پروکاریوت‌ها در یک ناحیه ویژه انجام نمی‌شود بلکه وقتی صورت می‌گیرد که مولکول‌های همانندسازی شده در تماس با هم قرار می‌گیرند. در این هنگام دو مولکول DNAی حلقوی به حالت درهم افتاده‌اند. توپوایزومرازها دو زنجیرهٔ یکی از مولکول‌ها را قطع می‌کنند، دو مولکول را از هم جدا کرده و دوباره محل بریده شده را پیوند می‌زنند (شکل ۱۵-۲۶).

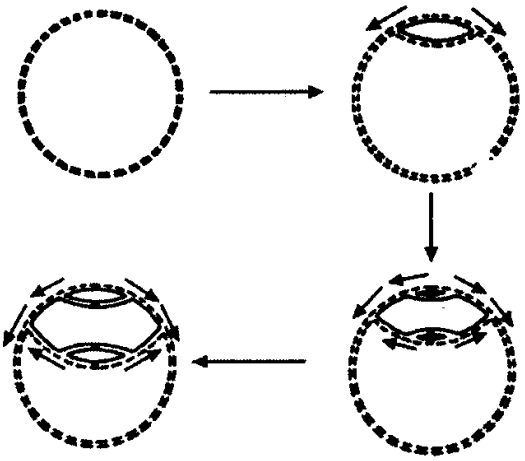
در یوکاریوت‌ها پایان همانندسازی وقتی است که همه رپلیکون‌های تشکیل دهنده مولکول DNA همانندسازی شده باشند.

در پایان هر بار همانندسازی در یوکاریوت‌ها، تنها دو مولکول DNA جدید ایجاد می‌شوند زیرا در این جانداران تا وقتی همه رپلیکون‌های موجود در مولکول DNA همانندسازی نکنند، امکان همانندسازی جدیدی در



شکل ۱۵-۲۶. نمای ساده‌ای از طرز عمل DNA پلیمراز I در تغییر RNA آغازگر به قطعه DNA ای مشابه. الف: روش کنار زدن تدریجی نوکلئوتیدها، ب: روش قطع تدریجی نوکلئوتیدها و جایگزین کردن آنها با قطعهٔ اُکازاکی اصلاح شده

رپلیکون‌هایی که زودتر همانندسازی کرده‌اند وجود دارند. برعکس در پروکاریوت‌ها در شرایط مناسب ممکن است قبل از آن که همانندسازی نوبت اول به پایان برسد همانندسازی جدیدی در بخش‌هایی از مولکول که تازه همانندسازی کرده‌اند شروع می‌شود و در نتیجه در پایان همانندسازی به جای دو مولکول DNA، ۴ مولکول یا تعداد بیشتری از مولکول‌های DNA تشکیل می‌شوند (شکل ۱۵-۲۷).



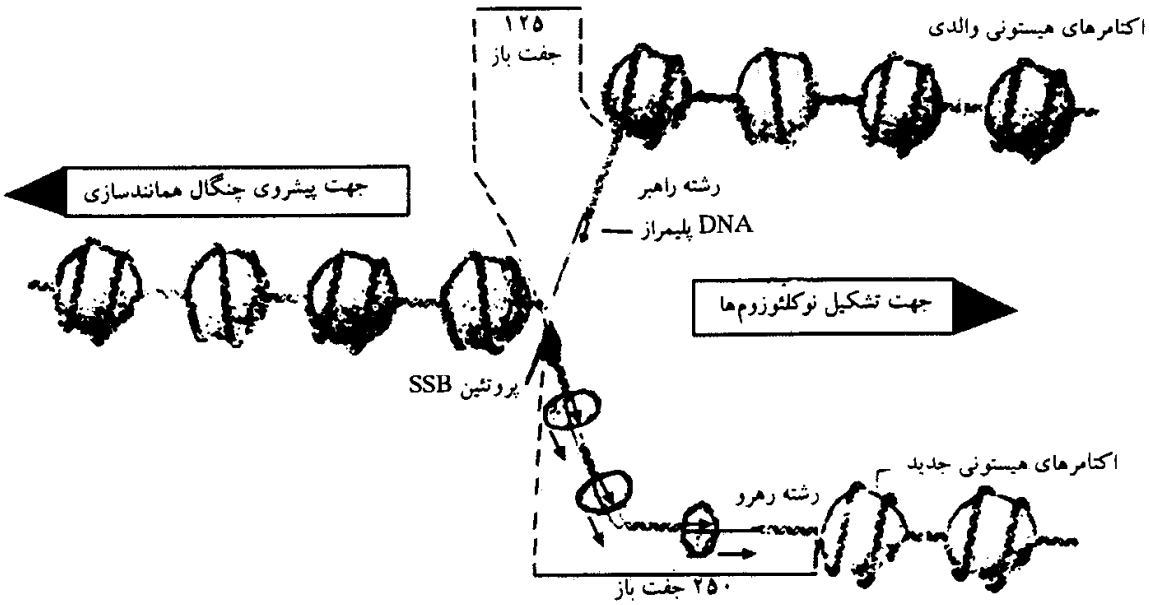
شکل ۱۵-۲۷. نمای همانندسازی‌های تکراری از یک کروموزوم دارای ساختار حلقوی و یک ناحیه آغازی. فلش‌های کوچک جهت‌های همانندسازی را نشان می‌دهند (برگرفته از پژوهش‌های Wake,R و همکاران ۱۹۷۲).

همانندسازی کروماتین: در یوکاریوت‌ها مجموعه همانندسازی DNA و پروتئین‌های وابسته به آن را که موجب می‌شود از یک رشته کروماتینی والدی با ساختمان نوکلئوزومی، دو رشته همانند با ساختمان نوکلئوزومی مشابه ایجاد شود، همانندسازی کروماتین نامند. برای همانندسازی کروماتین نه تنها همانندسازی DNA بلکه سنتز مقدار زیادی از هیستون‌های جدید مورد نیاز است تا امکان تشکیل نوکلئوزوم‌های جدید فراهم گردد. ضمن مضاعف‌شدن کروماتین، اکتامر هیستونی و مارپیچ مضاعف DNAی هر نوکلئوزوم با نقش آنزیم‌ها و انجام پدیده‌های متیلاسیون، استیلاسیون و فسفریلاسیون به‌طور موقت از یکدیگر جدا می‌شوند و سپس به سرعت پس از همانندسازی تدریجی مولکول DNA، بخش‌های همانندسازی شده به ساختمان نوکلئوزومی برمی‌گردند. در مورد چگونگی تشکیل نوکلئوزوم‌های جدید نظریه‌های متفاوتی وجود دارد:

۱- اکتامرهای هیستونی والدی (قبلی) باقی می‌مانند و پس از آن که همانندسازی DNAی هر بخش از رشتهٔ رهبر پایان یافت، با اکتامرهای هیستونی باقیمانده از قبل به ساختمان نوکلئوزومی برمی‌گردد و اکتامرهای هیستونی جدید نیز با بخش‌هایی که از همانندسازی DNA زنجیره پیرو ایجاد شده‌اند، نوکلئوزوم‌های جدید را می‌سازند. بر مبنای این نظر، اکتامرهای هیستونی قدیمی زمانی دوباره به بخش همانندسازی شدهٔ دارای رشته

پیشرو می‌پیوندند که این رشته دارای ۱۲۵ نوکلئوتید شده باشد (شکل ۱۵-۲۸). این عمل برای رشته پیرو وقتی است که اکتامرهای هیستونی جدید آماده شده و بخش DNAی حاصل از همانندسازی زنجیره پیرو دارای حدود ۲۵۰ تا ۲۶۰ جفت نوکلئوتید شده باشد (شکل ۱۵-۲۸). منطقه‌ای را که در آن رشته کروماتینی والدی از ساختمان نوکلئوزومی خارج شده تا همانندسازی کند و دوباره به حالت دو رشته کروماتینی درآید، منطقه همانندسازی کروماتین[1] نامند که دارای ۴۰ تا ۵۰ کیلو باز است. هیستون‌های لازم برای تشکیل نوکلئوزوم‌های جدید در مرحله S از چرخهٔ یاخته‌ای سنتز می‌گردند.

۲- اکتامرهای هیستونی والدی (قبلی) پس از باز شدن DNA از آنها، سازمان خود را از دست می‌دهند و به صورت منومرهای هیستونی در می‌آیند، سپس ضمن همانندسازی تدریجی زنجیرهٔ پیشرو و پیرو، مجموعه‌ای از مونومرهای هیستونی قدیمی و جدید که گردهمایی آنها می‌تواند با نسبت برابر یا اتفاقی (نابرابر) باشد موجب بازسازی اکتامرهای هیستونی می‌گردند که با بخش‌های همانندسازی شدهٔ مولکول DNA به ساختمان نوکلئوزومی برمی‌گردند.



شکل ۱۵-۲۸. همانندسازی کروماتین در یاخته‌های یوکاریوتی و نمای چگونگی باز شدن نوکلئوزوم‌ها و همانندسازی آنها.

نظریه اوّل هم‌اکنون بیشتر مورد توجه می‌باشد.

در یوکاریوت‌ها تا وقتی همه واحدهای مستقل همانندسازی (رپلیکون‌ها) همانندسازی خود را تمام نکنند امکان شروع همانندسازی جدیدی در بخش‌هایی که همانندسازی کرده‌اند وجود ندارد، بنابراین در پایان هر مرحله همانندسازی تنها دو مولکول DNA ایجاد خواهد شد.

سرعت همانندسازی در یاخته‌های پیشرفته متفاوت و به‌طور متوسط حدود ۰/۵ تا ۱ میکرومتر در دقیقه یا حدود ۱۰۰ تا ۲۰۰ نوکلئوتید در ثانیه است در حالی که در پروکاریوت‌ها سرعت حدود ۱۰ تا ۵۰ برابر بیشتر است و به ۲۰ تا ۳۰ میکرومتر در دقیقه و یا حدود ۱۰۰۰ تا ۲۰۰۰ نوکلئوتید در ثانیه می‌رسد. می‌توان نتیجه گرفت که هر یک از قطعات اُکازاکی در یک ثانیه ساخته می‌شوند.

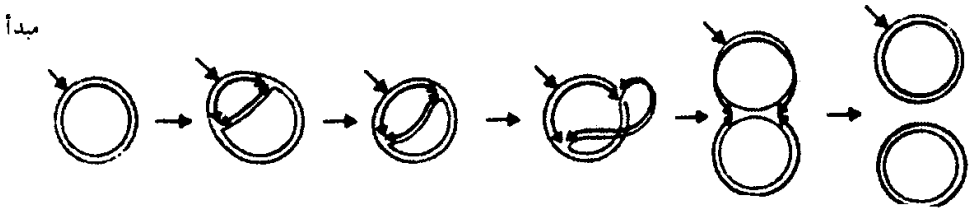
1- Chromatine Replication Zone

همانندسازی DNA میتوکندریی: DNA میتوکندری همانند DNA باکتری‌ها دو زنجیره‌ای و حلقوی (بسته) است. در یاخته‌های گیاهی گاهی DNA میتوکندریی بسیار بزرگتر از DNA باکتری‌ها است و ضمن جداسازی قطعات غیرحلقوی از آن ایجاد می‌شود. برای DNA میتوکندری به دلیل وابستگی‌هایی به غشاء داخلی و نیز سرعت همانندسازی که دارد ساختمان نوکلئوئیدی منظور می‌شود. اصول همانندسازی DNA میتوکندریی شبیه باکتری‌ها است. آنزیم مسئول همانندسازی برای DNA میتوکندریی DNA پلیمراز γ است که به وسیلهٔ ژنوم هسته‌ای کُد می‌شود و در سیتوپلاسم آماده می‌گردد، سپس وارد میتوکندری می‌شود و همانندسازی را انجام می‌دهد. این آنزیم تقریباً کوچک است و ساختمان ساده‌ای دارد.

همانندسازی DNA میتوکندریی الزاماً با تقسیم میتوکندری وابسته نیست، به همین دلیل در یک میتوکندری می‌تواند تا چندین نسخه از ژنوم به‌صورت جدا از هم یا به‌صورت کلافی به‌هم پیچیده وجود داشته باشد که آن را کونکاتامر[1] نامند. برای همانندسازی DNA میتوکندریی دو ناحیه شروع تشخیص داده شده است.

همانندسازی DNA حلقوی به روش تتا (θ)

همان‌گونه که شرح داده شد در پروکاریوت‌ها یک ناحیه شروع همانندسازی وجود دارد که از آنها همانندسازی به روش دو جهتی و با ایجاد دو چنگال همانندسازی متقابل صورت می‌گیرد، در نتیجه پس از شروع و مقداری ادامه همانندسازی، وجود یک حباب همانندسازی شکلی شبیه تتا (θ) ایجاد می‌کند (شکل ۱۵-۲۹). کروموزوم باکتری را در این حالت کروموزوم تتا نامند. ضمن همانندسازی DNA حلقوی به روش دوسویه، دو چنگال همانندسازی یکی در جهت چرخش عقربه‌های ساعت و دیگری در جهت عکس آن پیش می‌روند و در نهایت در فاصله ۱۸۰° از ناحیه شروع همانندسازی به یکدیگر می‌رسند. همان‌طور که قبلاً شرح داده شد پایان همانندسازی در DNA حلقوی به ترتیب‌های ویژه نوکلئوتیدی نیاز ندارد. برای جداسازی دو مولکول DNA حلقویِ در هم رفته، دخالت توپوایزومراز II لازم می‌باشد.



شکل ۱۵-۲۹. دیاگرامی از مراحل پی‌درپی همانندسازی دو سویه در باکتری

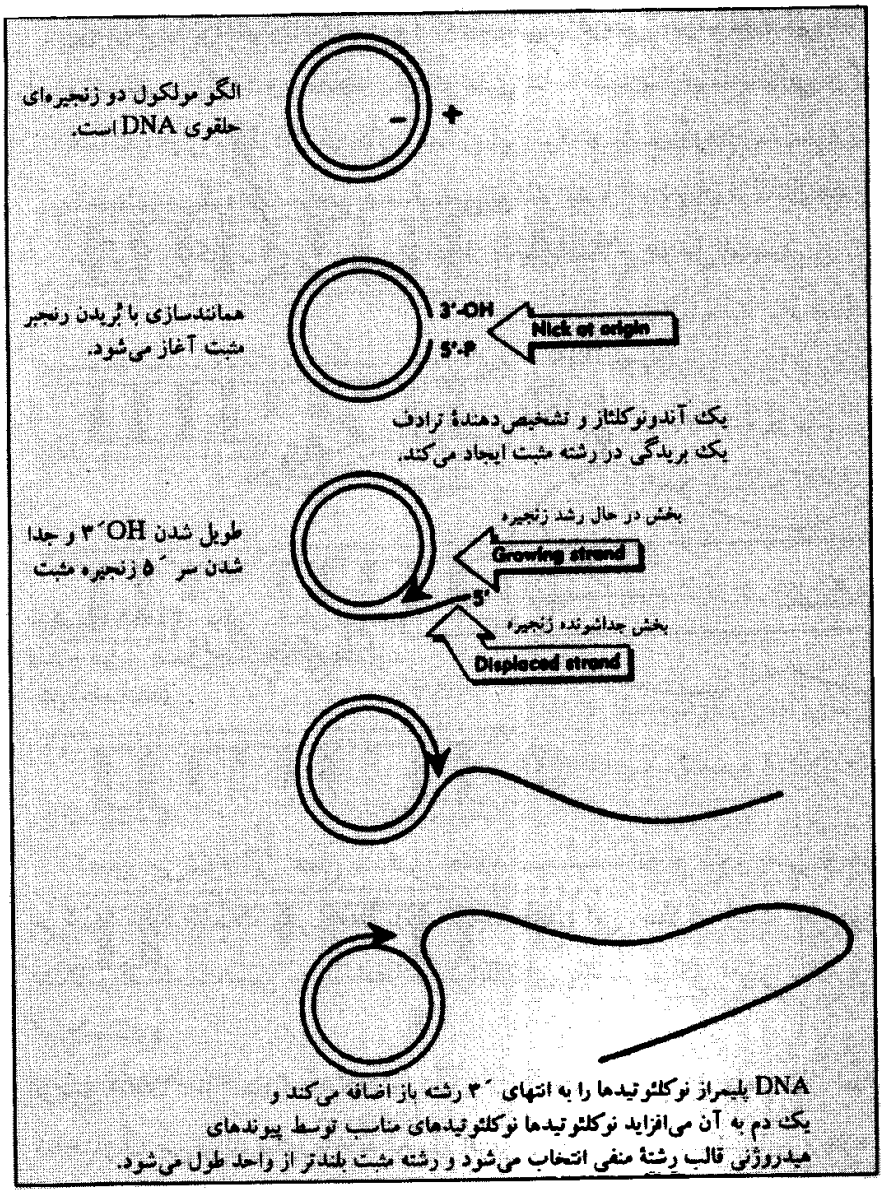
همانندسازی به روش حلقه چرخان[2]

DNA بسیاری از ویروس‌ها، پلاسمید و فاکتورهای جنسی F[3] برخی باکتری‌ها و DNA هنگام برخی تشدیدهای ژنی[4] به روش حلقه چرخان یا دایره غلتان تکثیر می‌شود.

در این روش ابتدا در ناحیه شروع همانندسازی، یکی از دو زنجیره (+) با آنزیمی اختصاصی (یک آندونوکلئاز) که هنوز ناشناخته است برش داده می‌شود، سپس انتهای ´۵ رشته بریده شده آزاد می‌گردد و انتهای ´۳OH به‌عنوان جایگاه افزوده شدن نوکلئوتیدها در اختیار DNA پلیمراز III قرار می‌گیرد. بنابراین برای شروع عمل به پریماز نیاز نمی‌باشد. DNA پلیمراز III و پروتئین‌های همراه آن به‌تدریج و با افزودن نوکلئوتیدهای جدید به سر ´۳OH رشته رویی (+) را جدا کرده، رشته منفی را دور می‌زنند و با افزودن نوکلئوتیدها به انتهای ´۳ زنجیره مثبت موجب

1- Concatamers 2- Rolling Circle 3- Fertillity 4- gene amplification

آزادشدن انتهای ´۵ آن می‌گردند. این بخش با پروتئین‌های SSBP پوشیده می‌شود (ظاهراً به نظر می‌رسد که همانندسازی با چرخش حلقه منفی انجام شده و به همین دلیل همانندسازی به روش حلقه چرخان نامیده شده است) (شکل ۱۵-۳۰). رشته منفرد DNA آزاد شده که همان رشته + یا رشته پیشرو است دو سر انجام دارد، یا به همان ترتیبی که در مورد همانندسازی رشته پیرو شرح داده شد، همانندسازی می‌کند و به DNA دو رشته‌ای تبدیل می‌شود و یا به همان صورت تک رشته‌ای باقی می‌ماند. این وضع به ساختار ژنتیکی ویروس اصلی وابسته است. همانندسازی DNA در باکتریوفاژ ۱۷۴ × ϕ که دارای DNA حلقوی تک رشته‌ای است به روش حلقه چرخان صورت می‌گیرد.



شکل ۱۵-۳۰. همانندسازی DNA به روش حلقه چرخان (برای توضیح به متن مراجعه شود).

اصلاح عوامل[1] ضمن همانندسازی

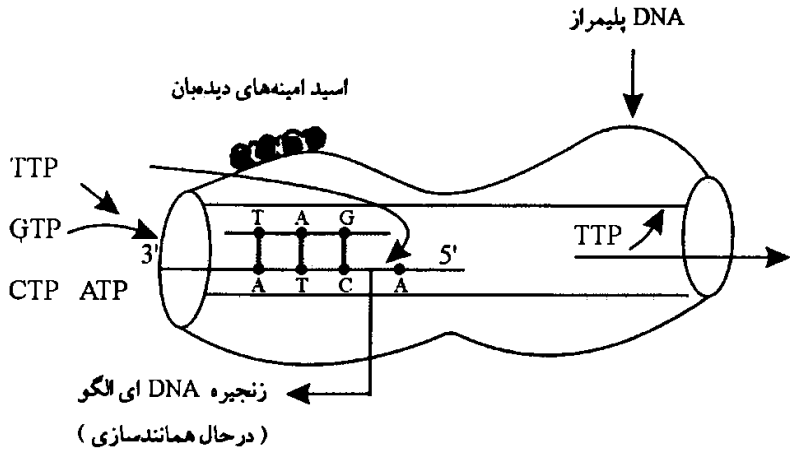
از آنجا که مولکول DNA از مولکول‌های اصلی زیستی است و هرگونه تغییر آن می‌تواند موجب بروز تغییرات ناخواسته در یاخته باشد و حتی منجر به مرگ جاندار شود، ضمن همانندسازی با پدیدهٔ «اصلاح عوامل» تا حداکثر امکان از بروز خطا در همانندسازی جلوگیری می‌شود. اصلاح عوامل به کمک آنزیم DNA پلیمراز و در دو مرحله

1- Proof reading

انجام می‌شود:

۱-گزینش نوکلئوتیدها به طرز صحیح و متناسب با نوکلئوتیدهای زنجیره در حال همانندسازی. نظر این است که برخی از اسیدهای آمینه تشکیل دهنده آنزیم DNA پلیمراز در حکم دیده‌بان‌هایی عمل می‌کنند که از ورود نوکلئوتیدهای نامتناسب (خارج از نوبت) جلوگیری می‌کنند و بنابراین نوکلئوتیدها را به دو نوبت و متناسب با نوکلئوتیدی که بایستی همانندسازی شود انتخاب کرده و به درون کانال همانندسازی می‌پذیرند.

۲- بازرسی (کنترل) دوباره و اخراج نوکلئوتیدهای نامناسب: این عمل که به اصطلاح در کانال همانندسازی آنزیم DNA پلیمراز انجام می‌شود بر این بنا است که اگر نوکلئوتید وارد شده به کانال همانندسازی مناسب باشد، بی‌درنگ با نوکلئوتید مکمل خود که بایستی رونویسی شود، شناسایی شده، بین آنها پیوندهای هیدروژنی برقرار و مستقر می‌گردد و چنانچه نوکلئوتیدی نامناسب باشد شناسایی و گرفته نمی‌شود و بنابراین در کانال همانندسازی سرگردان می‌ماند. تماس این نوکلئوتید سرگردان با بدنه کانال همانندسازی موجب برقراری نشانه‌ای می‌گردد که منجر به شناسایی نوکلئوتید و اخراج آن از کانال همانندسازی به وسیله آنزیم DNA پلیمراز می‌گردد. شکل ۱۵-۳۱ نمایی ساده از پدیده اصلاح عوامل است.



شکل ۱۵-۳۱. نمای ساده‌ای از پدیده اصلاح عوامل ضمن همانندسازی (شرح در متن آمده است).

تصور می‌شود این عمل با دقتی حدود $\frac{1}{100000}$ انجام شود یعنی از هر ۱۰۰۰۰۰ نوکلئوتید که همانندسازی می‌شود ممکن است یکی خطا باشد گرچه ظاهراً این خطا کم است اما چون تعداد نوکلئوتیدهای مولکول DNA بسیار زیاد است همین میزان خطا می‌تواند برای یاخته مشکل آفرین باشد و بایستی به روش‌های ترمیم DNA اصلاح شود.

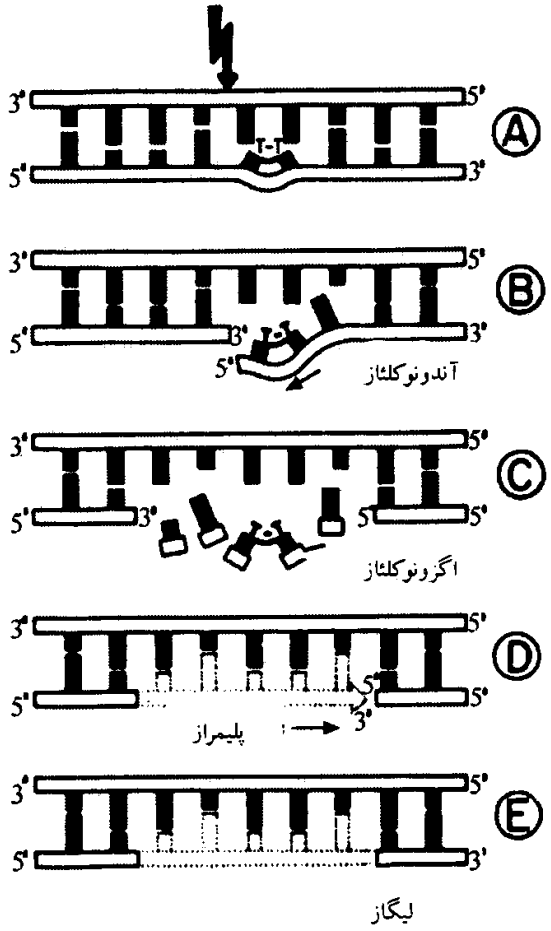
ترمیم DNA[1]: از آنجا که DNA در حکم مرکز اطلاعات و واسطه انتقال اطلاعات یاخته است، هرگونه تغییر در ساختار آن می‌تواند برای یاخته تحول آفرین و جهش‌زا باشد. بنابراین وجود راه‌هایی برای ترمیم و نگهداری آن ضروری است. عوامل مختلف محیطی از جمله عوامل شیمیایی مثل برخی داروها، اکسیدنیتر و عوامل فیزیکی مثل پرتوهای فرابنفش و اشعه X می‌توانند تغییرات قابل توجهی را در ساختار DNA ایجاد کنند. برای مقابله با این تغییرات ترمیم DNA به صورتی فعّال و پویا ضرورت دارد. برخی از راه‌های ترمیم DNA به شرح زیر است:

۱- ***ترمیم به روش باز فعال‌سازی نوری***[2]: تحت تأثیر پرتوهای فرابنفش (حتی پرتوهای فرابنفش موجود در نور خورشید) دو مولکول مجاور از باز تیمین در یک رشته به‌هم متصل می‌شوند. این اتصال موجب تغییر شکل مولکول دو

1- DNA repair 2- Photoreactivation

زنجیره‌ای در محل آسیب‌دیده می‌شود. این تغییر را دیمری شدن نوری[1] گویند. ایجاد دیمر تیمین مانع همانندسازی و رونویسی می‌شود و بایستی ترمیم گردد. برای ترمیم، آنزیم ویژه‌ای محل حضور دیمر تیمین را شناسایی می‌کند و به آن متصل می‌شود. مجموعهٔ DNA - آنزیم خاصیت جذب نور دارد و با جذب نور واکنش تشکیل دیمر تیمین در جهت معکوس انجام می‌شود و دو باز تیمین از هم جدا می‌شوند. به دلیل فعال شدن این واکنش در اثر نور، آن را باز فعال‌سازی نوری نامند؛ زیرا این واکنش تنها در برابر نور انجام می‌شود. در صورتی که به یاخته‌ها، پرتوهای فرابنفش تابانیده شود و سپس در تاریکی قرار گیرند، دیمرهای تیمینی ترمیم نخواهند شد و یاخته‌ها می‌میرند. در بیماری گزرودرماپیگمنتازوم[2] که یک بیماری ارثی است، آنزیم ترمیم‌کنندهٔ دیمرهای تیمین وجود ندارد، در نتیجه این افراد به شدت آمادگی ابتلاء به سرطان به ویژه سرطان‌های پوستی را دارند.

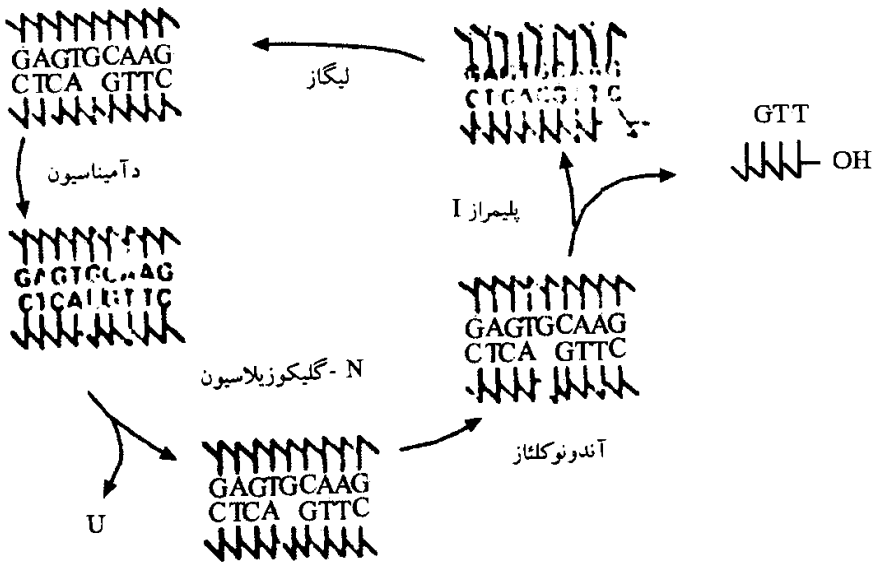
۲-*ترمیم با برش دادن*[3]: این عمل نیز هنگامی صورت می‌گیرد که تحت تأثیر عوامل محیطی به ویژه پرتوها (از جمله پرتوهای فرابنفش) اتصال‌های دیمری بین بازهای پیریمیدینی مجاور هم که روی یک زنجیره جای دارند، برقرار گردد. در این حالت یک آندونوکلئاز جایگاه دیمر را شناسایی می‌کند و آن را از سر به طرف ´۵ می‌برد. سپس یک اگزونوکلئاز سر به طرف ´۳ محل آسیب‌دیده را می‌برد، پس از آن DNA پلیمراز محل فاصله ایجاد شده را با نوکلئوتیدهای مناسب جایگزین می‌کند و در انتها بخش نوسازی شده به کمک لیگاز به زنجیره می‌چسبد (شکل ۱۵-۳۲).



شکل ۱۵-۳۲. ترمیم به روش برش دادن بخش آسیب‌دیده (توضیح در متن آمده است).

۳- *ترمیم با تغییر بازها*[4]: هر یک از بازهای آدنین، گوانین و سیتوزین دارای یک عامل آمینی ($-NH_2$) هستند. در برخی موارد در اثر واکنش‌های هیدرولیز، این عامل آمینی برداشته می‌شود که آن را بی‌آمین‌شدن هیدرولیزی (Hydrolytic deamination) نامند. با این عمل، آدنین به هیپوگزانتین، گوانین به گزانتین و سیتوزین به اوراسیل تبدیل می‌شود. برای برداشته شدن این بازهای بی‌آمین شده از مولکول DNA، آنزیم‌ها خاصی موسوم به DNA گلیکوزیلاز به کار گرفته می‌شوند. برای هر باز بی‌آمین شده، آنزیم خاصی لازم است. برای مثال باز اوراسیل به وسیلهٔ اوراسیل N گلیکوزیلاز برداشته می‌شود. این آنزیم‌ها نوکلئاز نیستند و در نتیجه فعالیت آنها مولکول DNA نمی‌شکنند، بلکه پیوند گلیکوزیدی بین قند دزوکسی ریبوز و باز آلی گسسته می‌شود و باز آلی خارج می‌گردد. با این عمل یک جایگاه خالی ایجاد می‌شود که اگر مربوط به سیتوزین باشد آن را جایگاه آپیریمیدین و اگر مربوط به آدنین و

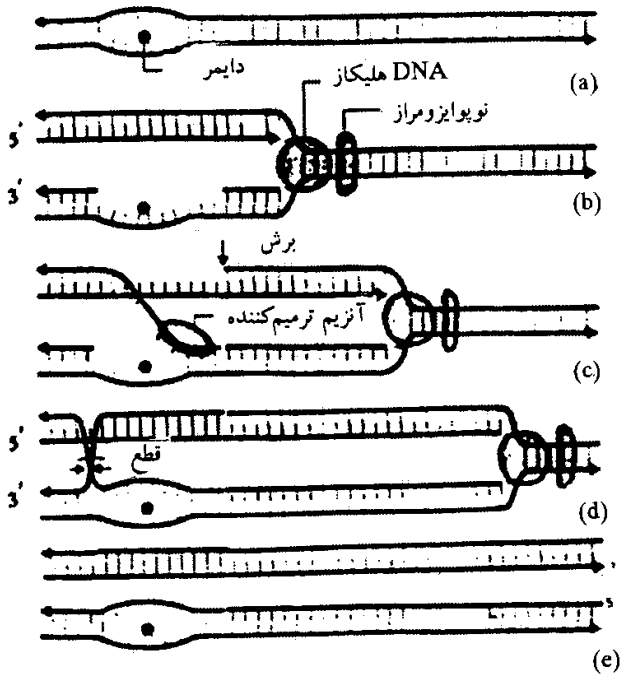
1- Photodimerization
2- Xerodermapigmentasome
3- Excision repair
4- Hydrolytic deamination



شکل ۱۵-۳۳. ترمیم با تغییر بازهای بی‌آمین شده

گوانین باشد آن را جایگاه آپورین نامند. پس از برداشته شدن باز بی‌آمین شده به وسیلهٔ N − DNA گلیکوزیلاز، یک آندونوکلئاز ویژه محل خالی را شناسایی و رشته DNA را به اندازه یک باز برش می‌دهد. سپس DNA پلیمراز محل را پر می‌کند و لیگاز شکاف رشته را می‌بندد (شکل ۱۵-۳۳).

۴- ***ترمیم پس از همانندسازی***[1]: زمانی که به دلیل وجود دیمر بازی در یکی از زنجیره‌ها، همانندسازی آن با مشکل مواجه شود، رشته والدی طبیعی برش داده می‌شود و به کمک آنزیم ترمیم‌کننده به منطقه مکمّل خود بر روی زنجیره نوساخت (خواهری) متصل می‌شود (شکل ۱۵-۳۴). سپس با اضافه شدن نوکلئوتیدهای مناسب به انتهای آزاد ´۳ بریده شده (توسط DNA پلیمراز) فضای خالی پر می‌گردد. در این حالت دو رشته DNA به‌صورت ضربدری با یکدیگر تلاقی کرده‌اند (شکل ۱۵-۳۴) که به وسیلهٔ آنزیم ترمیم‌کنندهٔ دیگری در محلّ این تلاقی بریده می‌شوند، انتهاهای آزاد دوباره به یکدیگر متصل می‌شوند و دو مارپیچ مضاعف (دو مولکول دو زنجیره‌ای) که مستقل از یکدیگر هستند به وجود می‌آیند. دیمر بازی باقیمانده در یکی از زنجیره‌ها (شکل ۱۵-۳۴) با روش برش دادن ترمیم می‌گردد.



شکل ۱۵-۳۴. چگونگی ترمیم پس از همانندسازی (شرح در متن آمده است).

تقسیم یاخته[2]

به منظور بقا و تداوم نسل جانداران تک یاخته‌ای، تشکیل توده یاخته‌ای، تشکیل بافت‌ها و اندام‌ها، امکان رشد و ترمیم در جانداران

1- Postreplication repair 2- Cell division

پریاخته‌ای، تقسیم یاخته‌ای ضروری است. همان گونه که در صفحات قبل اشاره شد در پیکر یک جاندار پریاخته‌ای سازمان یافته، در هر لحظه، تعداد زیادی از یاخته‌ها می‌میرند و به وسیله یاخته‌های جدید حاصل از تقسیم یاخته‌ای جایگزین می‌گردند. در یوکاریوت‌ها برای تقسیم یاخته‌ای دو فرایند اساسی را که اغلب وابسته به‌هم هستند، در نظر می‌گیرند: یکی تقسیم هسته[1] که می‌تواند به روش میتوز[2] یا میوز[3] باشد و دیگری تقسیم سیتوپلاسم که آن را پلاسمودیرز[4]، سیتودیرز[5] و یا سیتوکینز می‌نامند. گرچه در اغلب موارد به دنبال تقسیم هسته، سیتوپلاسم نیز تقسیم می‌شود و در نتیجه دو یاخته جدید (یاخته‌های دختر) از تقسیم یاخته اولیه (یاخته مادر) به وجود می‌آیند. اما این وضع حالت همیشگی نیست و در موارد زیادی به دنبال تقسیم هسته، الزاماً سیتوپلاسم تقسیم نمی‌شود. برای مثال در یاخته‌های عضلانی مخطط انسان که ساختارهایی سنوسیتی هستند، یا در بافت آلبومن گیاهان نهاندانه، قبل از جداربندی یاخته‌ها و نیز هنگام تشکیل پهنک (پروتال) در تخمک بازدانگان حقیقی (مخروطیان) در مرحلهٔ تشکیل پهنک سنوسیتی، تقسیم‌های پی‌درپی هسته‌ای، در سیتوپلاسمی که تقسیم نمی‌شود صورت می‌گیرد و ساختارهای سنوسیتی را به وجود می‌آورد. در این بحث ابتدا فرایند کلی میتوز و سپس میوز را بررسی می‌کنیم.

میتوز

میتوز از پدیده‌های بسیار جالب و قابل مشاهده به کمک میکروسکوپ‌های نوری در یاخته‌های زنده است که با متراکم شدن کروموزوم‌های دو کروماتیدی، تفکیک کروماتیدهای خواهر هر کروموزوم، تسهیم کروموزوم‌های هر یاخته به دو دسته یکسان (به دلیل تفکیک کروماتیدهای کروموزوم‌ها)، انتقال هر دسته به یک قطب از یاخته و در نهایت تشکیل دو هسته هم ارزش با یکدیگر و مشابه با هسته یاخته مادری همراه است.

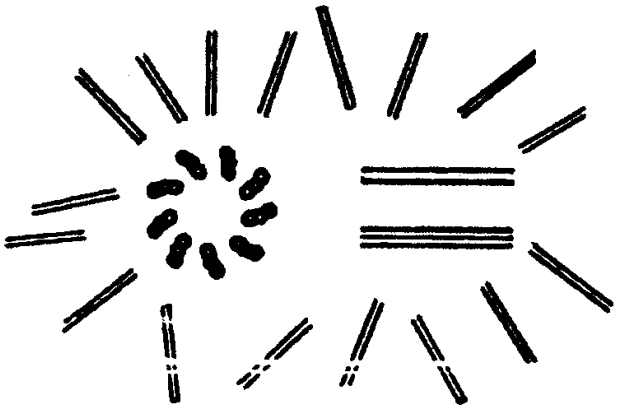
میتوز پدیده‌ای ممتد (پیوسته) است که، برای سهولتِ بررسی به چند مرحله که هر یک با ویژگی‌های خاصی از وضع کروموزوم‌ها و جایگزینی آنها در یاخته و نیز با تحولاتی در سیتوپلاسم همراه است، تقسیم شده است. این مراحل به ترتیب عبارتند از: پروفاز، متافاز، آنافاز و تلوفاز. هر مرحله خود می‌تواند به بخش‌های دیگری (اوایل، اواسط، اواخر) تقسیم شود.

۱- **پروفاز**: این مرحله که طولانی‌ترین مرحله میتوز است با تحولات عمده‌ای در سیتوپلاسم و هسته همراه است. در شروع پروفاز، یاخته‌های حیوانی که دیواره اسکلتی ندارند کم‌وبیش کروی یا بیضی شکل می‌شوند، هسته اغلب موقعیت مرکزی پیدا می‌کند. پوشش هسته‌ای به خوبی قابل تشخیص است. در سیتوپلاسم دو دیپلوزوم قابل مشاهده می‌شوند. هر دیپلوزوم از مجموعه دو سانتریول که به حالت زاویه دارد و تقریباً عمود بر هم قرار گرفته‌اند تشکیل شده است. دو سانتریول هر دیپلوزوم به وسیله ابری (توده‌ای) از مواد بی‌شکل و اساساً پروتئینی احاطه شده است (شکل ۱۵-۳۵). این ماده یک مرکز سازماندهی میکروتوبولی است، زیرا می‌تواند تجمع میکروتوبول‌های سیتوپلاسمی را هدایت کند. این ماده را نام‌های متفاوت سانتروزوم یا سانتروسفر نیز می‌نامند. اطراف سانتروزوم به وسیله میکروتوبول‌های شعاعی، بیش‌وکم طویل، کم‌شمار و بسیار ناپایدار احاطه شده است. ترکیب اصلی که در ماده یا ناحیهٔ دور (پیش) سانتریولی یافت می‌شود، توبولین گاما (γ) است که با توبولین آلفا و بتا متفاوت است و به‌صورت عاملی برای پلیمریزاسیون توبولین‌ها عمل می‌کند. همچنین مشخص شده که برخی پروتئین‌ها تنها هنگام میتوز پدیدار می‌شوند؛ این پروتئین‌ها نیز در پلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها و تشکیل دوک دخالت دارند. برخی از این مولکول‌ها به طور معمول در هسته جای دارند و از زمانی

1- Caryokinesis 2- Mitosis 3- Meiosis 4- Plasmodierese 5- Cytodierse

که پوشش هسته‌ای شکسته (خُرد می‌شود) به سانتروزوم می‌پیوندند، نقش آنها هنوز به خوبی مشخص نیست.

همانندسازی سانتروزوم‌ها در مرحله S انجام می‌شود. دو سانتریول یک دیپلوزوم به‌تدریج از هم جدا می‌شوند و در تماس با هر کدام پیش سانتریول بسیار کوتاهی تشکیل می‌شود. چگونگی این پدیده هنوز به خوبی شناخته نشده است. طویل شدن این پیش سانتریول‌ها در طول مرحله S و G_2 دنبال می‌شود.

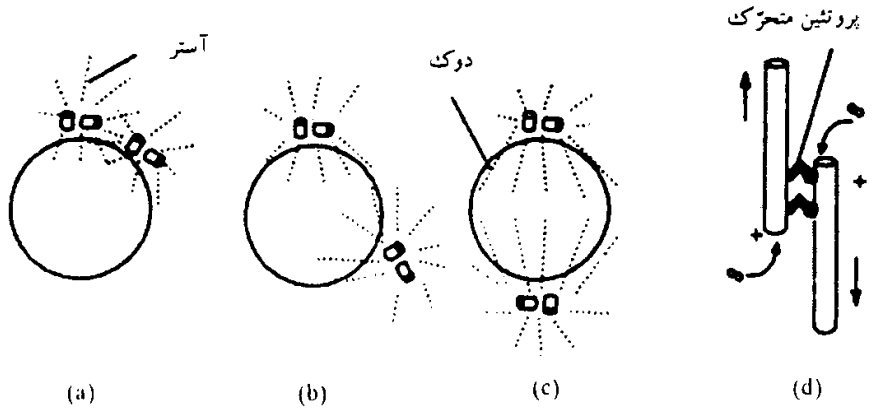


شکل ۱۵-۳۵. دیپلوزوم. دو سانترویول، تقریباً عمود برهم در وسط یک ماده متراکم قرار دارند، این ماده مرکز سازماندهی ریزلوله است.

وقتی که یاخته وارد میتوز می‌شود، ریزلوله‌های سیتوپلاسمی به‌تدریج خراب می‌شوند، یاخته شکل ویژه خود را از دست می‌دهد و بیش‌وکم کروی می‌گردد.

حالت سانتروزوم‌ها به‌صورت همزمان تغییر می‌یابد، ماده دور سانتریولی بیشتر می‌شود، میکروتوبول‌های اطراف آن کوتاه‌تر و پرشمار می‌شوند، این میکروتوبول‌ها که خیلی پایدارتر هستند به حالت ماده شعاعی اطراف دیپلوزوم‌ها را احاطه کرده و آستر[1] (ساختار شبیه ستاره) را تشکیل می‌دهند.

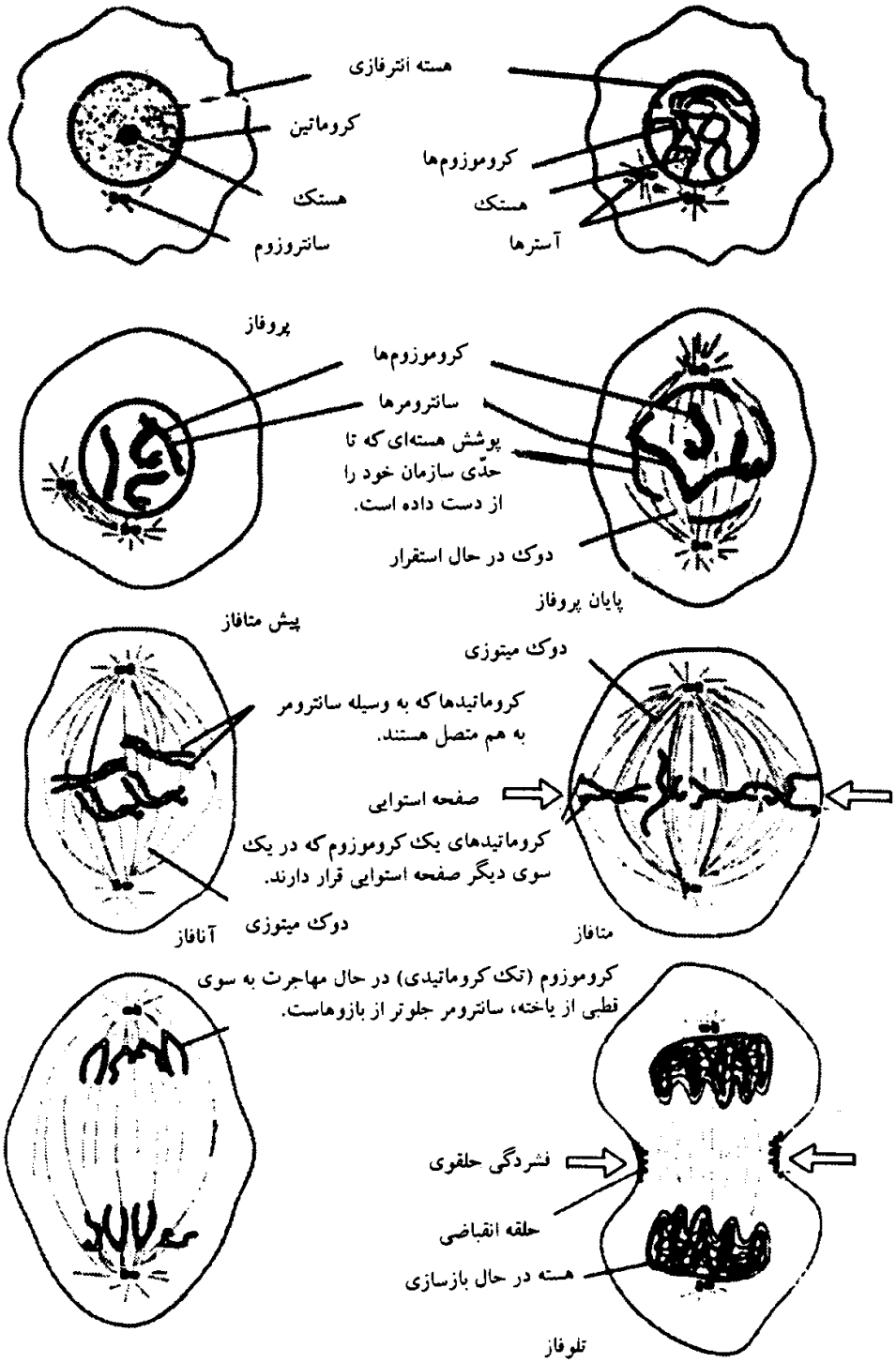
وقتی تراکم کروموزوم‌ها شدت می‌گیرد، دو آستر تفکیک می‌شوند (شکل ۱۵-۳۶)، در اطراف هسته که پوشش آن شروع به تحلیل رفتن می‌کند، جابه‌جا می‌شوند و در جایگاه‌های یاخته‌ای متقابلی قرار می‌گیرند. در طول این مهاجرت، اغلب ریزلوله‌های آستری متراکم می‌شوند و به‌صورت دسته‌های ریزلوله‌ای در می‌آیند که بیش و کم هسته را احاطه می‌کنند: این مجموعه دوک میتوزی است که هنوز هم آن را دوک آکروماتیک[2] می‌نامند زیرا ریزلوله‌هایی که آن را تشکیل می‌دهند، رنگ‌های معمول مورد استفاده برای مشاهدات با میکروسکوپ‌های نوری را به خود نمی‌گیرند.



شکل ۱۵-۳۶. مهاجرت دیپلوزوم‌ها و تشکیل دوک میتوزی. a) تا c) جابه‌جای دیپلوزوم‌ها. d) این جابه‌جایی نتیجه دخالت پروتئین‌های حرکتی (جنبشی) و پلیمریزاسیون ریزلوله‌ها است. پیکان‌ها جهت جابه‌جایی ریزلوله را نشان می‌دهند.

به نظر می‌رسد که دور شدن دیپلوزوم‌ها از یکدیگر نتیجه برهم‌کنش ریزلوله‌هایی که آنها را احاطه کرده‌اند (ریزلوله‌های آستری) و نیز طویل شدن ریزلوله‌هایی باشند که بین آنها سازمان می‌یابند و آنها را ریزلوله‌های

1- Aster 2- Achromatic



شکل ۱۵-۳۷. نمایی از مراحل تقسیم یاخته‌ای

قطبی یا ممتد نامند. آلکالوئیدها از جمله کولشی‌سین و مواد مخدر مهارکنندهٔ پلیمریزاسیون ریزلوله‌ها، جابه‌جایی دیپلوزوم‌ها را متوقف می‌سازند؛ پروتئین‌های حرکتی (جنبشی) نیز در جابه‌جایی دیپلوزوم‌ها دخالت می‌کنند (شکل ۱۵-۳۶).

پروفاز با تحولات عمده‌ای در وضع هسته نیز همراه است (شکل ۱۵-۳۷)، این مرحله با تراکم تدریجی کروموزوم‌ها همراه است و وقتی این تراکم شدید شد، لامینا متلاشی می‌شود و پوشش هسته‌ای سازمان خود را از دست می‌دهد به‌طوری که از اواسط پروفاز پوشش هسته‌ای قطعه‌قطعه می‌شود و در پایان پروفاز تنها قطعات کوچکی از آن در سیتوپلاسم قابل تشخیص است. با تحلیل رفتن تدریجی پوشش هسته‌ای، شیره هسته با سیتوزول آمیخته می‌شود. تصور می‌شود که برهم‌کنش‌های مواد شیره هسته و سیتوزول در ایجاد نشانه‌هایی

برای سازمان یافتن رشته‌های دیگری از دوک تقسیم که آنها را رشته‌های کینه‌توکوری یا رشته‌های کروموزومی نامند، مؤثر هستند. در پایان پروفاز، کروموزوم‌ها بسیار متراکمند، شکلشان تا حدّی زیادی مشخص است و گرچه دو کروماتید تشکیل دهنده هر کروموزوم قابل تشخیص هستند اما به‌طور فشرده‌ای به‌هم چسبیده‌اند.

در پروفاز به دلیل تراکم شدید کروماتین، رونویسی RNAها به‌تدریج کاهش می‌یابد؛ RNAهای ریبوزومی رونویسی نمی‌شوند و این وضع موجب تحلیل رفتن و سپس ناپدید شدن هستک‌ها می‌شود.

خُرد شدن پوشش هسته‌ای به ریزلوله‌های دوک امکان می‌دهد فضایی را که قبلاً به وسیله شیره هسته اشغال شده بود، در اختیار بگیرند و به این ترتیب مرحلهٔ جدیدی آغاز می‌شود که آن را پیش متافاز[1] نامند. این مرحلهٔ گذرا با جابه‌جایی ابتدا نوسان‌دار و سپس جهت‌دار کروموزوم‌ها همراه است که موجب می‌شود کروموزوم‌ها در سطح میانی یاخته قرار گیرند (شکل ۱۵-۳۷).

۲- ***متافاز:*** در این مرحله دو دیپلوزوم در دو قطب مقابل یاخته قرار گرفته، اطراف هر کدام رشته‌های دوکی و بینابین آنها رشته‌های دوکی قطبی یا ممتد کشیده شده است. پوشش هسته‌ای محو شده و کروموزوم‌های دو کروماتیدی در وسط دوک در امتداد صفحه فرضی به اسم صفحه متافازی یا صفحه استوایی[2] قرار می‌گیرند. کروموزوم‌ها به‌صورت حلقه‌ای بیش‌وکم منظم با فاصله برابر از دو قطب دوک قرار می‌گیرند. دو کروماتید هر کروموزوم در این مرحله موقعیت خاصّی دارند، این کروماتید از هم مشخص شده و به‌طور نسبی از هم جدا شده‌اند؛ انتهای پسین آنها بیش‌وکم به سوی قطب‌های دوک متوجه است در حالی که ناحیه سانترومر که محل اتصال دو کروماتید است به سوی بخش میانی در صفحه استوایی قرار دارد (شکل ۱۵-۳۷). این حالت را **نظم متافازی** کروموزوم‌ها می‌نامند.

۳- ***آنافاز:*** آنافاز مرحله‌ای کوتاه است که ضمن آن تفکیک ماده ژنتیکیِ همانندسازی شده در ناحیه سانترومر صورت می‌گیرد و به اصطلاح سانترومر به دو بخش تقسیم می‌شود. هر نیمه سانترومر همراه یک کروماتید و کینه‌توکور وابسته به آن، یک کروموزوم آنافازی (کروموزوم پسر) را تشکیل می‌دهد. دو کروموزوم آنافازی حاصل از تفکیک کروماتیدی خواهر هر کروموزوم به سوی قطبین دوک مهاجرت می‌کنند و آرایش آنها به نحوی است که همواره ناحیه کینه‌توکور و سانترومر متصل به آن، زودتر از بازوهای کروموزوم‌ها به قطبین می‌رسند به‌طوری که کروموزوم‌های آنافازی اشکال خمیده‌ای شبیه عدد ۷ و در نیمه مقابل یاخته شبیه ۸ به خود می‌گیرند (شکل ۱۵-۳۷). در پایان آنافاز در هر قطب یاخته دسته‌ای از کروموزوم‌های پسری مجتمع هستند که تعدادشان با تعداد کروموزوم‌های یاخته مادری برابر و همان ۲n است اما هر کروموزومی تک کروماتیدی است. دو قطب در شرایط طبیعی تعداد و ارزش کروموزومی کاملاً یکسانی دارند.

۴- ***تلوفاز:*** در این مرحله تراکم کروموزوم‌های مجتمع شده در هر قطب به‌تدریج کاهش می‌یابد و مجموعهٔ پوشش هسته‌ای لامینا در اطراف توده کروموزومی شروع به سازمان‌یابی دوباره می‌کنند و هسته‌ها بازسازی می‌شوند. با از سرگیری رونویسی‌ها، در اطراف هر یک از سازمان‌دهندگان هستکی که بر روی تعداد زیادی از کروموزوم‌ها پراکنده‌اند، هستک جدیدی بازسازی می‌شود؛ در اغلب موارد این هستک‌های کوچک با هم ادغام می‌شوند و به‌صورت تعداد محدودی هستک و یا یک هستکی در می‌آیند. به هر حال، تعداد هستک‌ها در هر هسته جدید با هسته مادری برابر است.

مجموعه پدیده‌هایی که شرح داده شد تقسیم هسته‌ای یاکاریوکینز است که اغلب با تقسیم یاخته همراه است. در

1- Prometaphase 2- Equatorila Plaque

یاخته‌های جانوری، تقسیم یاخته (سیتودیرز)، از اواخر آنافاز با تشکیل یک فشردگی حلقوی، عمود بر محور طولی دوک میتوزی شروع می‌شود. همزمان با تشکیل این فشردگی حلقوی، از تراکم ریبوزوم‌ها، حفره‌های سیتوپلاسمی قطعاتی از شبکه آندوپلاسمی در بخش میانی یاخته، مجموعه‌ای به اسم جسم میانی[1] شکل می‌گیرد و فشردگی حلقوی میانی به روش به سوی مرکز و به سوی جسم میانی پیش می‌رود تا سرانجام سیتوپلاسم نیز به دو بخش تقسیم شود و دو یاخته جدید از هم جدا شوند. در جریان این تحولات، دوک میتوزی به‌تدریج تحلیل می‌رود و از ذخیره توبولینی که به این ترتیب آزاد می‌شود، اسکلت یاخته‌ای بازسازی می‌شود. یاخته‌های دختری حالت کروی خود را از دست می‌دهند و به شکل ویژه خود در می‌آیند.

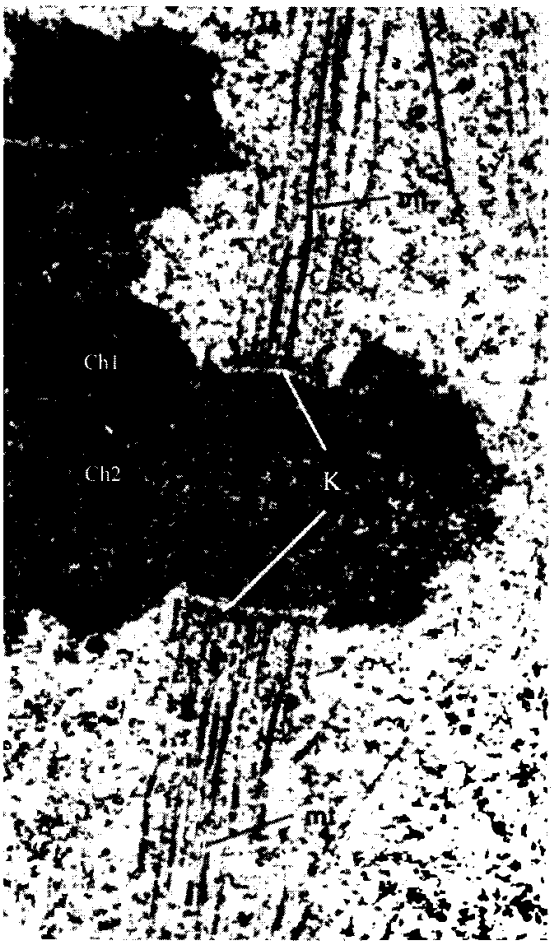
تقسیم یاخته‌ای که شرح کلی آن داده شد، پدیده‌ای بسیار پیچیده است و برخی مسایل آن بایستی مورد بررسی دقیق‌تری قرار گیرد:

الف - آرایش کروموزوم‌ها در امتداد صفحه متافازی

آرایش کروموزوم‌ها با نظم متافازی یک پدیده اساسی است که کروماتیدهای خواهری را برای مهاجرت به سوی دو قطب مقابل دوک و تشکیل دو دسته کروموزومی یکسان در قطبین یاخته آماده می‌سازد. این پدیده که بسیار سریع است، برپایه برهم‌کنش ریزلوله‌های تشکیل شده از سانتروزوم‌ها و کینه‌توکورها استوار است. کروموزوم‌های فاقد کینه‌توکور به رشته‌های دوک متصل نیستند و به قطبین مهاجرت نمی‌کنند. کینه‌توکورها دو فعالیت دارند. از یک سو مراکز سازمان‌دهنده ریزلوله‌ها هستند، این نقش آنها را می‌توان با قرار دادن کروموزوم‌ها در شرایط آزمایشگاهی و در محیط غنی از توبولین به اثبات رسانید، اما به نظر می‌رسد در یاخته این عمل آنها چندان قوی نیست. از سوی دیگر کینه‌توکورها ساختارهایی هستند که انتهای تعدادی از ریزلوله‌های دوکی به آنها ختم می‌شود؛ تعداد این ریزلوله‌ها متغیّر است (شکل ۱۵-۳۸) و به تعداد پروتئین‌های پذیرنده بستگی دارد.

ریزلوله‌های متصل شده به کینه‌توکور تمایل به کشیدن کینه‌توکور به سوی قطبی دارند که از آن منشأ گرفته‌اند. نیروی کششی که به کینه‌توکور وارد می‌شود به فاصله‌اش از قطب دوک وابسته است: هرچه این فاصله بیشتر باشد نیرو شدیدتر است و هرچه فاصله کم‌تر شود، نیروی کششی نیز کاهش می‌یابد.

قرار گرفتن کروموزوم‌ها در صفحه استوایی در



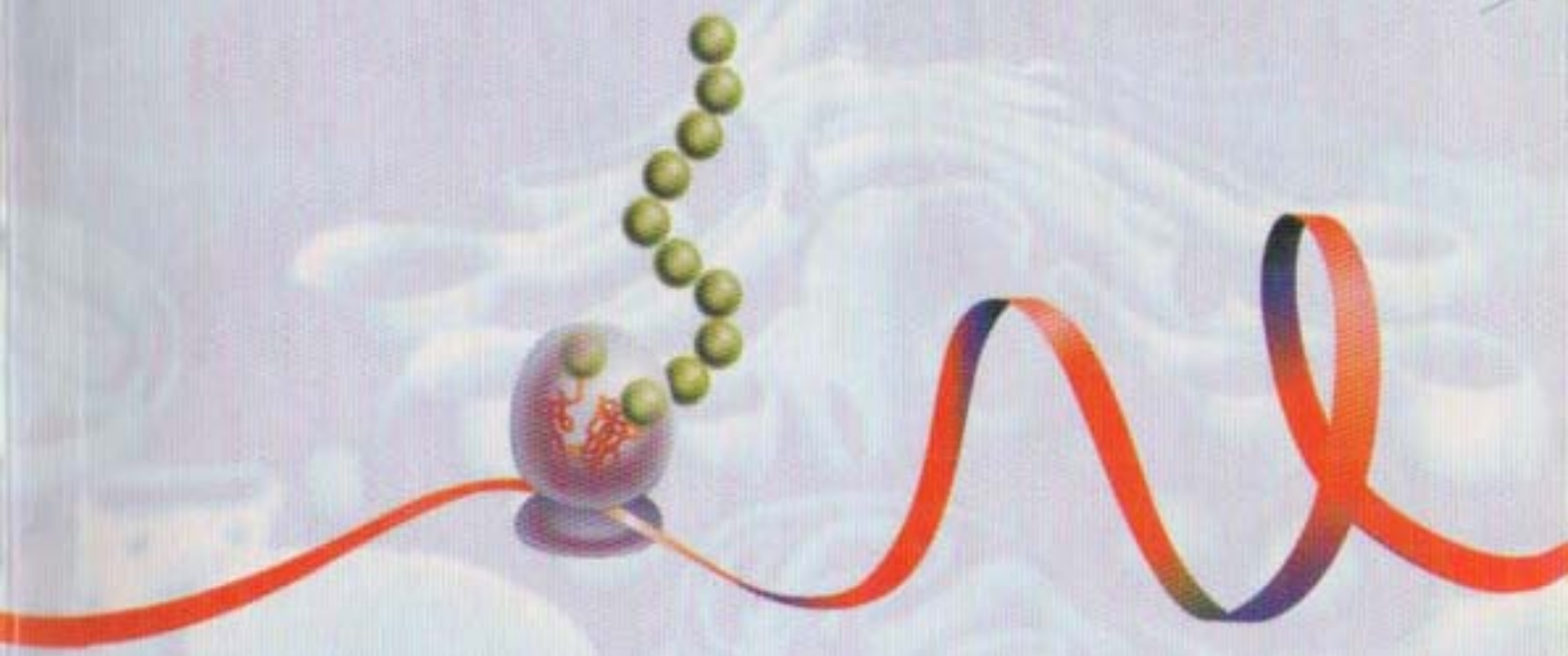
شکل ۱۵-۳۸. ریزلوله‌ها و کینه توکور در یک جلبک. یاخته در متافاز است. کروماتیدها Ch_1 و Ch_2 از ناحیهٔ سانترومر به‌هم چسبیده‌اند. در طرفین سانترومر، کینه توکور که به ریزلوله‌های دوکی (mt) ایجاد شده از دو قطب متصل هستند، به خوبی دیده می‌شوند (۳۱۰۰۰×) (برگرفته از پژوهش‌های M.J.SCHIBLER و همکاران ۱۹۸۷).

1- Midebokie

Cell & Molecular Biology

A. MAJD Ph.D. S.M.A. SHARIATZADEH Ph.D.

13th Print



ISBN 964-7006-35-7

9789647006354

آییژ